

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук**

На правах рукописи

БЕЛОЗЕРОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

**Синтез и биологическая активность природного
лигнана севанола и его аналогов**

Специальность 1.4.9. – «биоорганическая химия»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Кублицкий Вадим Сергеевич

Москва – 2021г.

Содержание

1. Введение.....	4
2 Литературный обзор	8
2.1 Лигнаны и их химическое строение	8
2.2 Биосинтез лигнанов в природе	14
2.3 Синтетические пути получения лигнанов	17
2.3.1 Окислительная димеризация	17
2.3.2 Механизм реакции окислительной димеризации	24
2.4 Синтез лигнанов с применением различных методов классической циклизации и нефенольной окислительной димеризации	26
2.5 Биологическая активность лигнанов	34
2.6 ASIC каналы и их роль в патофизиологических процессах.....	37
2.6.1 Функционирование ASICs ионных каналов	40
2.6.2 Регуляция ASICs ионных каналов	44
2.6.3 Физиологическая и патофизиологическая роли ASIC каналов.....	54
2.7 Заключение.....	56
3. Обсуждение результатов	57
3.1 Синтез синтетического аналога природного лигнана севанол (s706).....	59
3.1.1 Синтез три-третбутилового эфира изолимонной кислоты 3.	61
3.1.2 Синтез сложного эфира три-третбутилового эфира изолимонной кислоты и кофейной кислоты 4.	66
3.1.3 Окислительная димеризация три-третбутилового изоцитрата кофейной кислоты 4 как ключевая стадия синтеза севанола.....	73
3.2 Синтез аналогов севанола.	80
3.2.1 Синтез аналогов севанола: изосеванол s706, s354, s788, s874.	83
3.2.2 Синтез производных и аналогов севанола: s590, s296.	86
3.2.3 Синтез производных и аналогов севанола: s414, EA.	88
3.3 Биологическая активность синтетического севанола и его аналогов.	90
3.3.1 Изучение и сравнение биологической активности синтетического аналога севанола (s706), диастереомера севанола (Isosevanol) и мономера севанола (s354).....	92
3.3.2 Изучение и сравнение ASIC1a и ASIC3 ингибирующей активности синтетического севанола и его аналогов.	95
3.3.3 Анальгетическая активность севанола s706	101

4	Экспериментальная часть.....	104
4.1	Материалы и оборудование	104
4.2	Синтез.....	105
4.2.1	Получение три-третбутилового эфира изолимонной кислоты 3.....	105
4.2.2	Получение сложного эфира три-третбутилового эфира изолимонной кислоты и кофейной кислоты 4.....	107
4.2.3	Получение севанола s706 и его аналогов s788, s874, s590, s414, EA...121	
5.	Выводы	131
6.	Благодарности.....	132
7.	Список работ, опубликованных по теме диссертации.....	133
8.	Список сокращений и условных обозначений.....	134
9.	Список литературы.....	135

1. Введение

В последние десятилетия наблюдается повышенный интерес к биологическим веществам, выделенным из различных природных ресурсов. Значительный интерес проявляется к выделенным из растений полифенольным соединениям, называемые лигнанами и неолигнанами [1]. В природе лигнаны и неолигнаны биосинтетически образуются в процессе оксидативной димеризации различных фенолов, содержащих пропанольную группу. В царстве растений известно около нескольких тысяч представителей этого класса фенольных соединений самой различной химической структуры [2]. Их обнаруживают в виде вторичных метаболитов практически во всех морфологических частях растений, включая ксилему, корни, листья, цветы, плоды, корневища, стебли и семена. Чаще всего они играют важную роль в защитной функции сосудистой системы растений [3], что, вероятно, обуславливает их биологическую активность в живых организмах. На данный момент известны примеры противоопухолевой, противовоспалительной, противовирусной, цитотоксической, антимитотической, противогрибковой, антиангиогенной, гепатопротекторной, антигипертензивной, седативной, инсектицидной, антагонистической и сердечно-сосудистой активности [4,5]. Именно это делает данные соединения привлекательными объектами для дальнейшей химической модификации основы природной структуры с целью разработки наиболее эффективных лекарственных средств.

Одной из насущных задач медицинской химии является поиск и создание новых фармацевтических препаратов, обладающих низкой токсичностью и высокой активностью в системе живых организмов как в нормальном, так и патологическом состояниях. Одними из значимых лекарственных средств в жизни человека являются нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), обладающие противовоспалительным и анальгезирующим действием. Данная группа препаратов угнетает синтез простагландинов (ПГ) из арахидоновой кислоты путем ингибирования фермента циклооксигеназы (ПГ-синтетазы). Широкое распространение НПВП заставило обратить внимание на побочные эффекты этих препаратов. Наиболее часто встречаются эффекты, направленные на пищеварительный тракт и почки. Именно поэтому применение НПВП все более ограничивается с каждым годом, и необходимым представляется поиск активных соединений, обладающих подобными свойствами и не вызывающих деструктивное воздействие на человеческий организм.

В качестве перспективных фармакологически активных соединений для медицинского применения можно рассматривать лигнаны и их производные. Одним из

таких веществ является новый представитель подгруппы лигнанов - севанол. Севанол был выделен сотрудниками лаборатории Нейрорецепторов и Нейрорегуляторов ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН из чабреца *Thymus Armeniacus*, произрастающего вблизи озера Севан в Армении, в процессе исследования компонентов, отвечающих за противовоспалительную и анальгетическую активность. Севанол входит в подгруппу лигнанов с фенилдигидронафталиновым скелетом, являющимся производным кофейной кислоты. В результате проведенных анализов методом ЯМР-спектроскопии и LC-ESI-MS масс-спектрометрии была установлена его структура [6]. Это вещество представляет собой сложный эфир эпифиловой кислоты и двух остатков изолимонной кислоты. Севанол проявляет высокую анальгетическую активность в тестах *in vivo*. В дозах 1–10 мг/кг севанол значительно подавляет как тепловую гиперчувствительность, вызванную воспалительным процессом, так и острую боль, развивающуюся в ответ на введение кислоты. Можно предположить, что севанол является одним из основных компонентов, определяющих известные анальгетические свойства чабреца.

В связи с этим разработана и оптимизирована методика синтеза севанола, изучение влияния структурных модификаций на проявляемые противовоспалительные и анальгетические свойства, а также изучение механизма лиганд-рецепторного взаимодействия могут иметь практическое применение в области создания новых безопасных лекарственных препаратов, обладающих обезболивающим и противовоспалительным действием.

Таким образом, целью данной диссертационной работы является структурно-функциональное изучение севанола и его модифицированных аналогов. В рамках поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Методом полного синтеза подтвердить структуру природного лигнана севанола.
2. Оптимизировать разработанный метод синтеза севанола для проведения дальнейших биологических тестов *in vitro*, *in vivo* и доклинического испытания этого анальгетического препарата.
3. Синтезировать модифицированные аналоги севанола и изучить характеристики их взаимодействия с ASIC-каналами.
4. Исследовать влияние структуры севанола и его аналогов на эффективность ингибирования ASIC-токов с помощью электрофизиологических методов.

В результате проведенной работы впервые был получен синтетический аналог природного соединения севанол, оптимизирована методика его синтеза, позволяющая производить севанол как лекарственный препарат в полупромышленных масштабах. Также были синтезированы его аналоги, отличающиеся количеством карбоксильных групп на основном дигидронафталиновом скелете молекулы. С использованием полученных структурных аналогов было проведено изучение лиганд-рецепторного взаимодействия, влияния функциональных групп на эффективность ингибирования ASICs каналов и проявление биологической активности этих соединений. Кроме того, в результате проведенного литературного поиска и анализа данных о разработках новых лекарственных препаратов были предложены модификации севанола, возможно также обладающие биологической активностью.

Синтез соединений был проведен с использованием стандартных методов органической химии, очистка и выделение целевых продуктов была проведена с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии. Все полученные интермедиаты и продукты были идентифицированы с применением методов ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Исследования биологической активности соединений в качестве ингибиторов ASIC каналов были проведены с использованием электрофизиологических методов лабораторией Нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН. Тесты на животных с целью изучения анальгетической активности проводились в ФИБХ РАН. Изучение лиганд-рецепторного взаимодействия на модели ASIC1a канала было проведено совместно с сотрудниками лаборатории Нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН с использованием расчетов и компьютерного моделирования при участии сотрудников лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН.

Положения, выносимые на защиту:

1. Путем полного синтеза подтверждена предполагаемая структура представителя класса дигидронафталинового лигнана севанола: (1S,2S)-тритретбутил 1-(((1R,2S)-3-(((2R,3R)-1,5-дитретбутоксидигидрокси-3-карбонил)-1,5-диоксипентан-2-ил)окси)карбонил)-1-(3,4-дигидроксифенил)-6,7-дигидрокси-1,2-дигидронафтален-2-карбонил)пропан-1,2,3-трикарбоксилат.
2. Оптимизированный метод синтеза севанола, позволяющий провести полномасштабные биологические исследования соединения *in vitro* и *in vivo*.

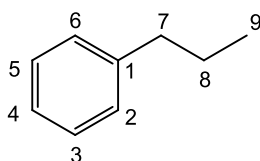
3. Модификация структуры севанола приводит к образованию аналогов, также обладающих эффектом ингибирования кислото-чувствительных ионных каналов (ASIC).
4. Структурно-функциональные исследования лиганд-рецепторного взаимодействия, показывают влияние стереоизомерии и функциональных групп в молекуле севанола и его аналогов на эффективность проявляемой ингибирующей способности по отношению к ASIC-каналам.

Основные положения диссертационной работы были представлены на международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова», а также на международной конференции VII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry и 44th FEBS Congress. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах. По результатам проведенного исследования синтетического подхода к синтезу дигидронафталиновых лигнанов был получен 1 патент.

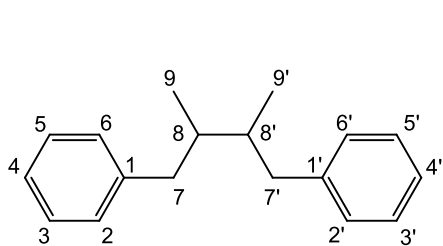
2. Литературный обзор

2.1 Лигнаны и их химическое строение

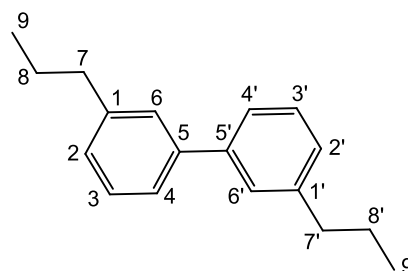
Термин «лигнан» впервые был введен Гавортом в 1948 году для описания группы димерных фенолпропаноидов, где два соединения с пропенилфениловой структурой соединяются их центральным атомом углерода С8, как показано на схеме 1. Позднее Готлиб в 1978 году предложил молекулы, состоящие из двух единиц фенолпропаноидов, соединяющихся другим способом. Например, молекулы, сочетающиеся через С5-С5' получили название «неолигнаны» (схема 1). Лигнаны обнаружены более чем в 60 семействах сосудистых растений и могут быть выделены из самых различных частей растения, смол и экссудатов ксилемы [7]. Большинство известных природных лигнанов окисляются в положении С9 и С9' [1].



фенилпропаноидная субъединица



структура лигнана



структура неолигнана

Схема 1. Структура молекулы лигнана.

Группу лигнанов по положению кислорода в скелете молекулы и типу циклизации можно разделить на 8 основных подгрупп: фурофураны, фураны, дибензоилбутаны, дибензоилбутиролактоны, арилтетралины, арилнафталины, дибензоилциклооктандиены и дибензоилбутиролактоны [8]. На схеме 2 отображены представители различных подгрупп лигнанов. Лигнаны каждой подгруппы существенно различаются по степени окисления ароматического кольца и пропиловой части молекулы. Среди подгрупп фуранов, дибензоилбутанов и дибензоилоктадиенов лигнаны могут подразделяться на «лигнаны с С9(9')-кислородом и «лигнаны без

С9(9')-кислорода». Следует отметить, что кроме структурных различий, лигнаны также проявляют существенные различия в своем энантиомерном составе [9]. Таким образом, их метаболиты могут быть найдены в виде чистых энантиомеров и в виде энантиомерных смесей, в том числе рацематов [10].

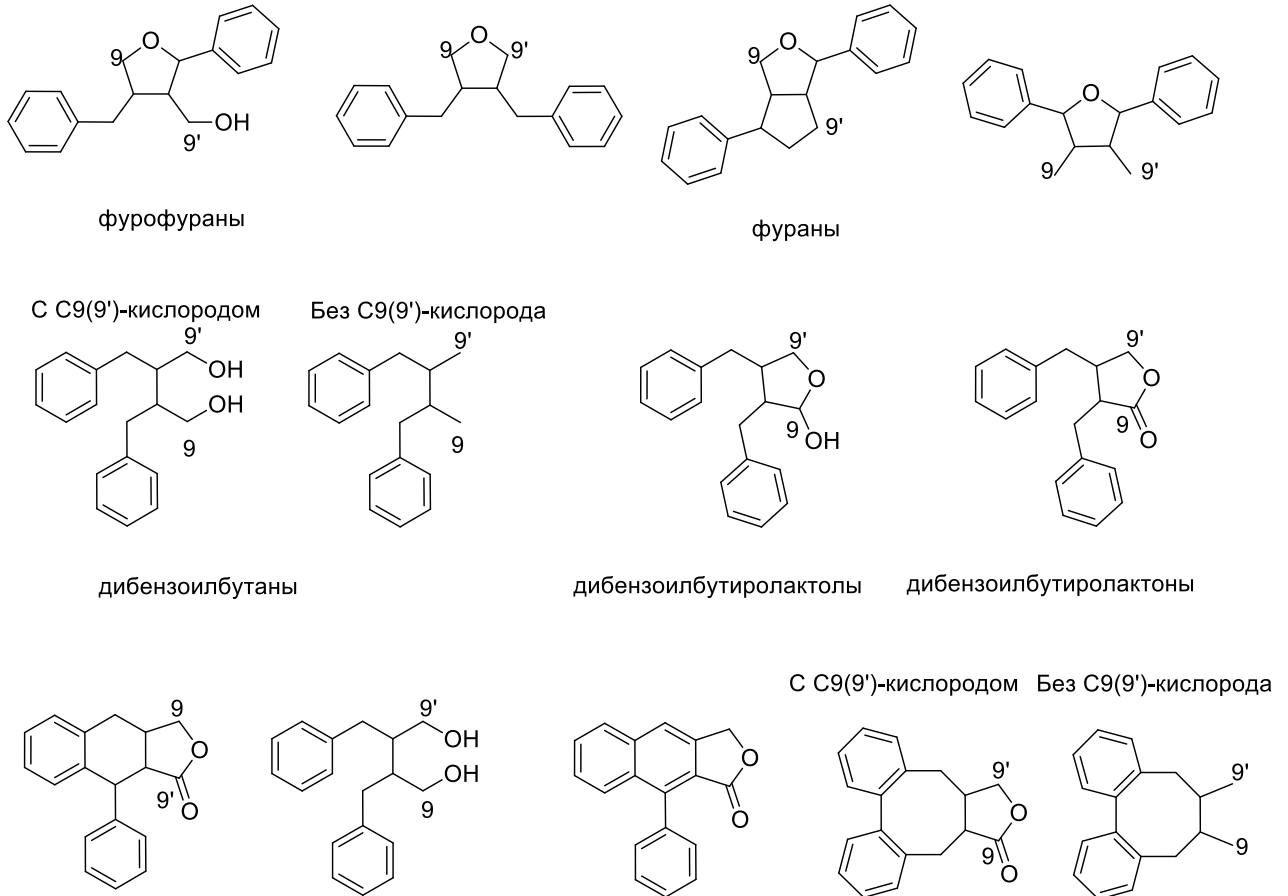


Схема 2. Основные подгруппы лигнанов.

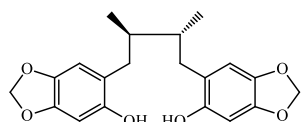
Лигнаны являются хорошо растворимыми в воде соединениями, которые встречаются во всех органах растений, однако наиболее часто их можно обнаружить в семенах, цветках, корнях, древесине и деревянистых стеблях растений класса однодольных. Они могут существовать как в свободной форме, так и в форме гликозидов. Также известно, что лигнаны локализируются вместе с эфирными и жирными маслами и смолами. Иногда лигнаны можно рассматривать в качестве боковой ветви образования лигнина. А именно, их появление приурочено к древесным растениям и их одревесневающим частям, но не к травянистым растениям или их органам [11]. В

таблице 1 отображены подгруппы лигнанов и соответствующие места их локализации в растении (схема 3).

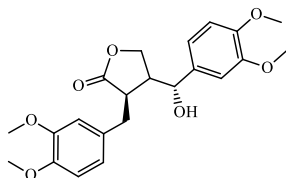
Таблица 1. Подгруппы лигнанов и соответствующие места их локализации в растениях.

Место локации в растении	Лигнан [ссылка]	Подгруппа лигнана	Растительный источник
Корневище	Saururin B [12]	дibenзоилбутаны	<i>Saururus chinensis</i>
	Tupichilignan [13]	дibenзоилбутиролактоны	<i>Tupistra chinensis</i>
Корень	Endiandrin B [14]	дibenзоилбутаны	<i>Endiandra anthropophagorum</i>
	Burselignan [15]	арилнафталины	<i>Bursera tonkinensis</i>
Надземные части	Seselinone [16]	тетрагидрофураны	<i>Seseli annuum</i>
	Acutissimalignan [17]	дibenзоилбутиролактоны	<i>Phyllanthus acutissima</i>
Семена	Vitexdoin A,B,C,D,E [18]	арилнафталины	<i>Vitex negundo</i>
	Cuscutoside C, D [19]	фуурофураны	<i>Cuscuta chinensis</i>
Кора	9-O- α -L-arabinopyranoside of (-)-isolariciresinol [20]	арилнафталины	<i>Walsura yunnanensis</i>
Стебель	Piperphilippinin [21]	дibenзоилбутиролактоны	<i>Piper philippinum</i>
	Propinquinan E [22]	дibenзоциклооктадиены	<i>Schisandra propinqua</i>
Плод	Vitecannaside A, B [23]	арилнафталины	<i>Vitex Cannabifolia</i>
	Chushizisin G [24]	тетрагидрофураны	<i>Broussonetia papyrifera</i>

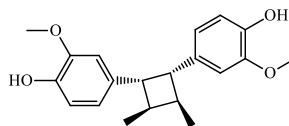
Лист	Manglieside E [25]	тетрагидрофураны	<i>Manglietia phuthoensis</i>
	Furfuracin [26]	арилнафталины	<i>Knema Furfuracea</i>



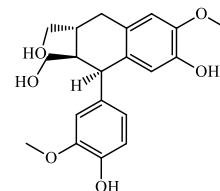
Saururin B



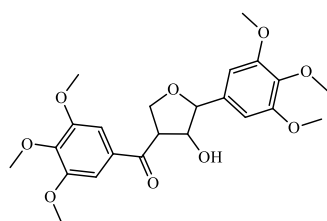
Tupichilignan



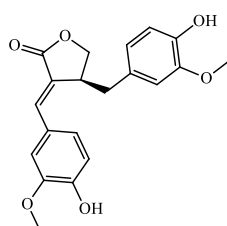
Endiandrin B



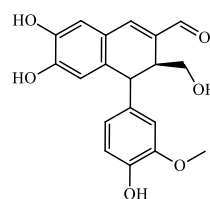
Burselignan



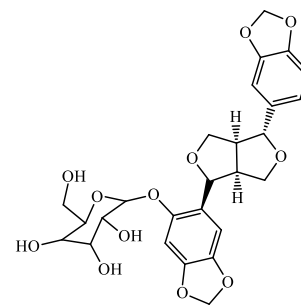
Seselinone



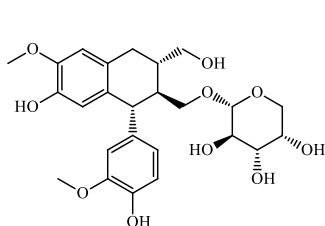
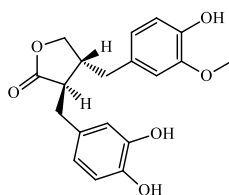
Acutissimalignan



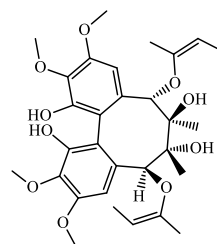
Vitexdoin A



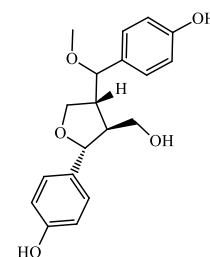
Cuscutoside C

9-O- α -L-arabinopyranoside of (-)-isolariciresinol

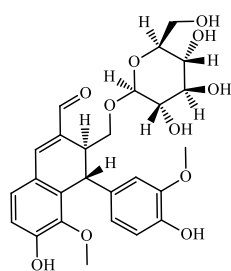
Piperphilippinin



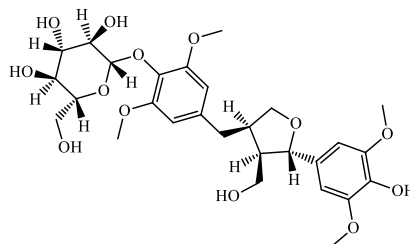
Propinquanin E



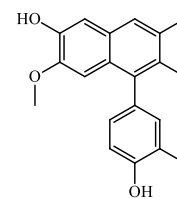
Chushizisin G



Vitecannaside A



Manglieside E



Furfuracin

Схема 3. Примеры различных подгрупп лигнанов, отображенных в таблице

1.

Также лигнаны были обнаружены у некоторых животных, в том числе и в человеческом организме. В 80-ых годах Сетчел с соавторами установили присутствие лигнанов с 2,3-дibenзоилбутановым скелетом в качестве основы молекулярной структуры в экстракте мочи крыс, человека и некоторых видов обезьян. В отличие от описанных растительных лигнанов соединения животного происхождения имеют гидроксильную группу только в мета-положении ароматического кольца (схема 4) [27].

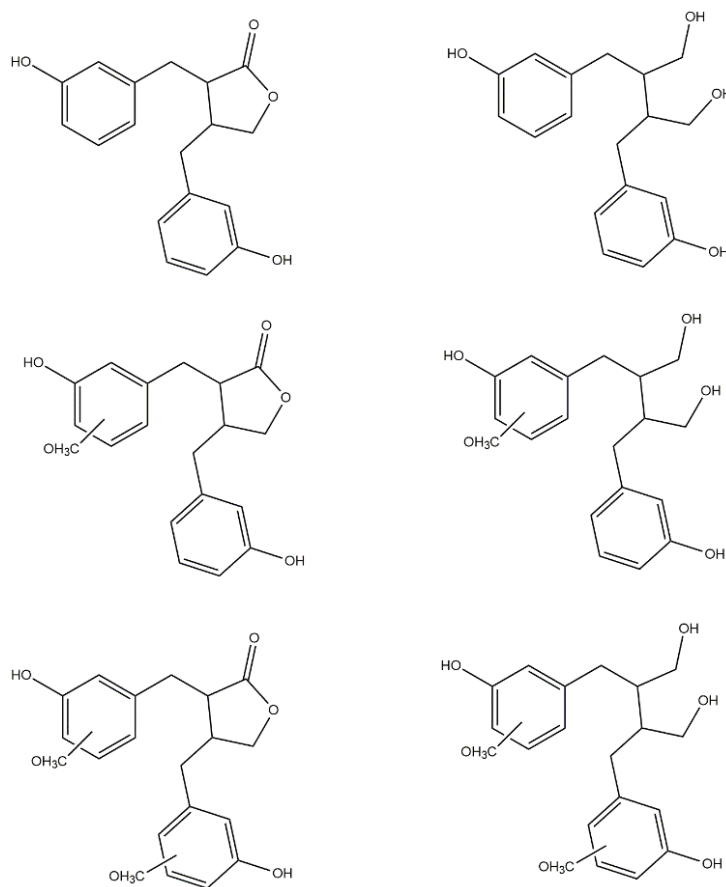


Схема 4. Химические структуры лигнанов, полученных из экстрактов мочи некоторых видов обезьян, человека и крысы.

2.2 Биосинтез лигнанов в природе

Лигнаны представляют собой производные коричной кислоты, получаемой в процессе метаболизма из фенилаланина. На начальной стадии шикиматного пути хоризмовая кислота трансформируется в префеновую кислоту путем перегруппировки Кляйзена, в результате которой происходит перенос производного фосфоенолпирувата к углероду с карбоксильной группой в присутствии фермента хоризматмутазы (КФ.5.4.99.5). Таким образом, формируется основной скелет фенилаланина. Затем в результате переаминирования фенилпирувата под действием аминотрансферазы образуется арогеновая кислота, которая далее претерпевает дегидратационное декарбоксилирование до получения необходимого для биосинтеза лигнанов фенилананина [28,29]. Биосинтез кониферилового спирта начинается с дезаминирования фенилаланина до образования коричной кислоты с последующим гидрокселированием с помощью цитохрома P450 и циннамат 4-гидроксилазы до п-кумаровой кислоты и последующим окислением до кофейной кислоты. Дальнейшие восстановления соединений эфира коэнзима А и соответствующего альдегида в присутствии никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН) приводят к получению ключевого кониферилового спирта (схема 5).

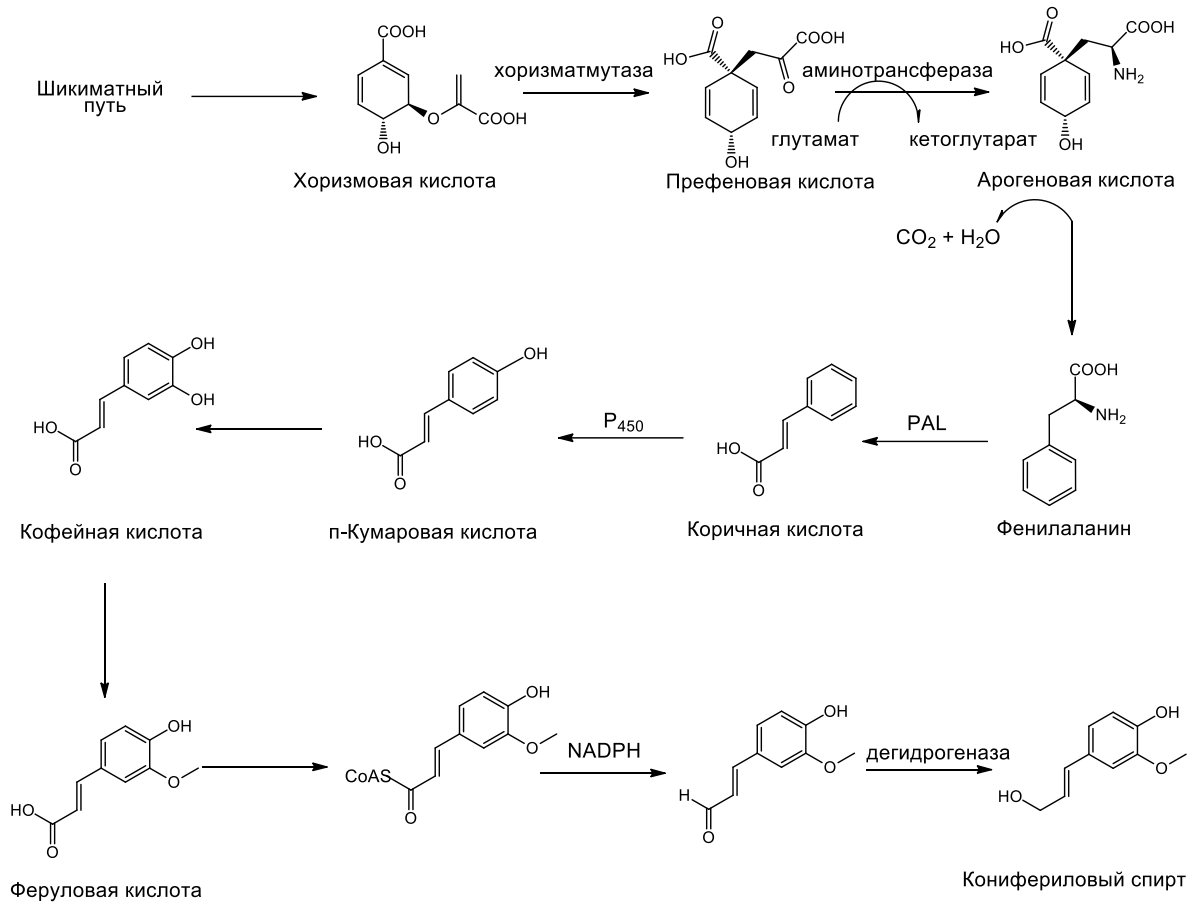


Схема 5. Биосинтез кониферильного спирта.

Лигнаны образуются в результате энантиоселективной димеризации двух единиц пропенилфенольных производных. Большинство лигнанов содержат кислород в позиции C9(9'), в то время как фурановые, дибензоилбутановые и дибензоциклооктадиеновые производные отличаются отсутствием кислорода в данном положении. В зависимости от строения скелета соединения различаются биосинтетические пути их образования. Так для лигнанов с 9(9')-кислородом характерна димеризация из двух молекул кониферильного спирта [1]. Для аналогичных соединений без 9(9')-кислорода была предложена версия сочетания пропенилфенолов, например, изоевгенола, как было предложено О. Готлибом в 1972 году [10]. Подобная теория была подтверждена в дальнейших исследованиях биосинтеза подобных лигнанов [30,31].

На схеме 6 представлены возможные пути биосинтеза различных лигнанов, обобщенные Сузуки и соавторами [32].

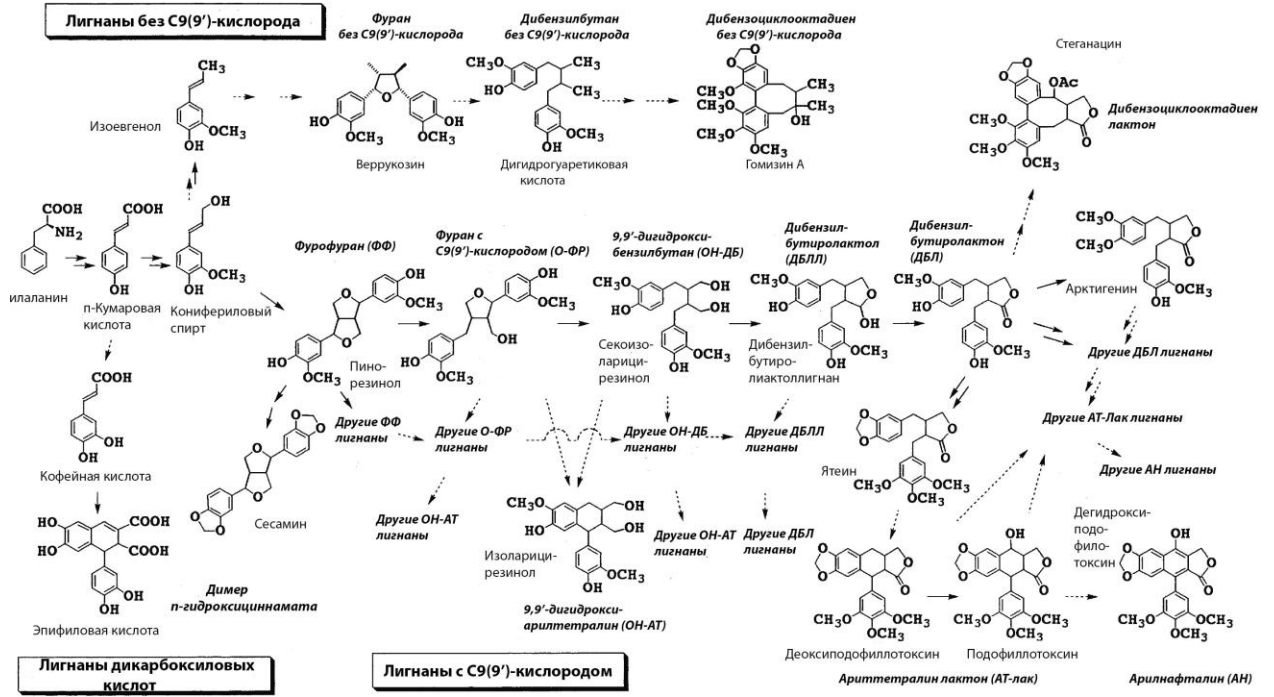


Схема 6. Вероятные биосинтетические пути образования различных типов лигнанов [32]. Стрелками обозначены экспериментально установленные пути, пунктирными линиями – предположительный механизм димеризации пропенилфенольных прекурсоров и модификации димеризованных предшественников, основанный на сравнении изученных химических структур.

2.3 Синтетические пути получения лигнанов

Обзоры за последние десятилетия описывают огромное множество различных подходов для рацемического или энантиоселективного синтеза аналогов растительных лигнанов. В общем случае ключевой стадией является димеризация двух мономеров, являющихся производными кониферилового спирта. Стратегия синтеза необходимых для исследования лигнанов отличается от способа построения основного скелета молекулы в природе путем биосинтеза. В настоящее время опубликовано большое количество разнообразных элегантных путей получения данных соединений. К классическим путям можно отнести окислительную димеризацию, реакцию Дильса-Альдера и конденсацию Штоббе. Новыми методами синтеза лигнанов являются такие методы, как нефенольная окислительная димеризация, реакция циклоприсоединения к хинонам монокетала и сопряженное присоединение [33].

2.3.1 Окислительная димеризация

Первые попытки синтеза лигнанов путем окислительной димеризации коричных производных включали в себя окислительное сочетание фенолов и их эфиров в присутствии различных ферментов. Так из производных коричных спиртов под каталитическим действием энзимов, выделенных из *Caldariomyces fumago* [34] и других грибов [35], были получены синтетические аналоги пинорезинола и сирингарезинола соответственно (схема 7). Соединения получались в виде рацемической смеси изомеров и с достаточно небольшим выходом ввиду образования побочных продуктов реакции.

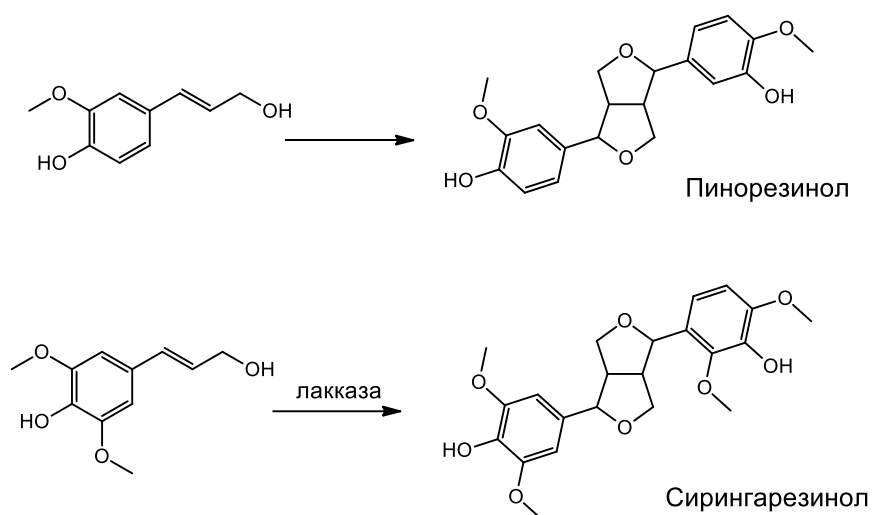


Схема 7. Биомиметический подход получения аналогов природных лигнанов.

Однако с практической точки зрения наиболее результативными оказались методы окислительной димеризации производных эфиров коричных кислот с использованием в качестве катализаторов неорганических соединений. В процессе

исследования методов получения аналогов синтетических лигнанов распространено использование в качестве окислительных агентов таких соединений, как FeCl_3 , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, Ag_2O , MnO_2 , H_2O_2 , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_4$, различные пероксидазы [33].

В настоящее время большое количество исследований посвящено влиянию окислителя на эффективность реакции окислительного сочетания. Так в работе Маеды с соавторами упорядочено влияние некоторых из них на димеризацию метил (*E*)-3-(4,5-дигидрокси-2-метоксифенил) пропионата [36]. При использовании Ag_2O в условиях реакции в смеси бензол-ацетон при комнатной температуре происходило преимущественное образование побочных продуктов, в то время как выход дигидронафталинового производного был достаточно низким (28%). Для более точного разделения продуктов с помощью колоночной хроматографии полученные соединения подвергли ацилированию в присутствии пиридина. На схеме 8 подробнее описаны возможные побочные продукты реакции окислительной димеризации в присутствии Ag_2O .

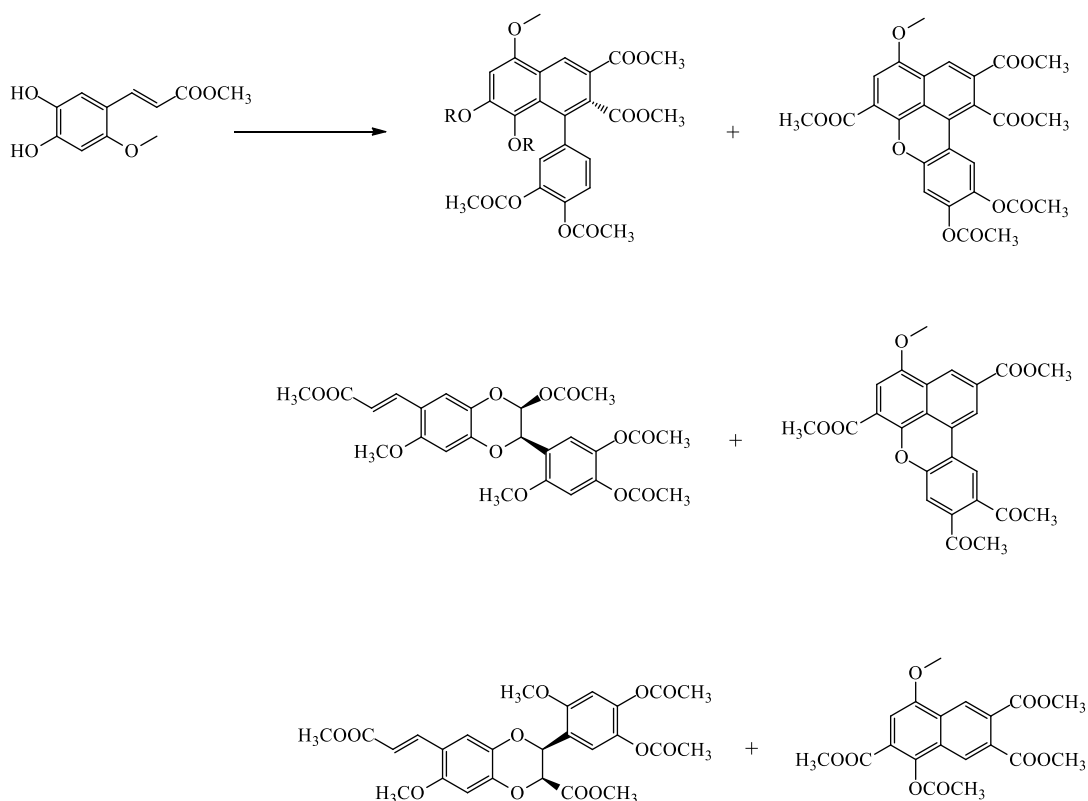


Схема 8. Возможные продукты реакции окислительной димеризации в присутствии Ag_2O .

В более поздних попытках использования данного метода димеризации фенолпропаноидов было также подтверждено, что использование Ag_2O приводит к образованию сложной реакционной смеси, из которой с трудом можно выделить

необходимый продукт. Так попытки димеризации в хлористом метиле с двумя эквивалентами оксида серебра при комнатной температуре приводили к преимущественному образованию неолигнанов вместо лигнанов. Выход 1,2-дигидронафталинового производного при этом составил менее 1%. Направленность этой реакции в сторону образования неолигнанов также была подтверждена Лемьером с соавт [37].

Позднее в этой же работе было установлено, что присутствие ионов Mn^{2+} стабилизирует направление димеризации в сторону образования бензоксантиновых производных. Так, Дакино с соавторами в 2009 году провели реакцию окислительного сочетания фенэтилового эфира кофейной кислоты в хлористом метиле в присутствии 10 эквивалентов MnO_2 в течение 4 часов при комнатной температуре. После исследования реакционной смеси при помощи HPLC-UV было установлено содержание двух основных продуктов: дигидронафталинового производного и бензоксантинового (схема 9). После очистки на силикагеле при помощи колоночной хроматографии было получено 16.5% от общего выхода первого соединения и 48% второго. При изменении растворителя на хлороформ соотношение полученных веществ изменилось в пользу бензоксантинового производного (51%), в то время как арилдигидронафталинового лигнана образовалось всего 7%. К подобному результату привело использование $Mn(OAc)_2$ вместо MnO_2 . Дигидробензофурановых неолигнанов в реакционной смеси не наблюдалось при подобных условиях.

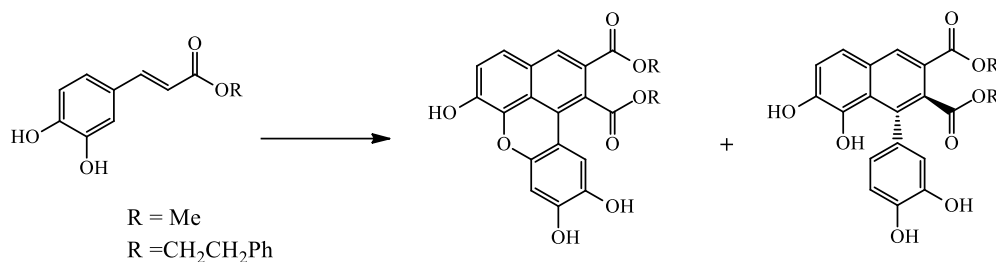


Схема 9. Окислительная димеризация в присутствии MnO_2/CH_2Cl_2 или $CHCl_3$, а также $Mn(OAc)_3/CHCl_3$ при RT в течение 4-6 часов.

Чтобы сместить направленность реакции в сторону получения бензоксантиновых лигнанов, было использовано 4 эквивалента ацетата марганца $Mn(OAc)_3$ в хлороформе. Большое количество окислителя приводило к осмолению реакционной смеси и сокращению выхода продуктов реакции. В результате данных условий образовывалось 71% бензоксантинового лигнана и 22% арилдигидронафталинового производного (схема 9) [38]. В 2015 году был опубликован синтез трех арилнафталиновых производных (ретроджастидин В, джастидин Е и хеллоксантин) с использованием ацетата марганца в качестве окисляющего реагента [39]. В данной публикации димеризации подвергался карбонитрил, полученный путем конденсации Кнёвенагеля α -циано-эфира с альдегидом, выход которого составил 67%. Далее полученный в результате димеризации интермедиат был восстановлен до необходимого исследуемого лигнана (схема 10).

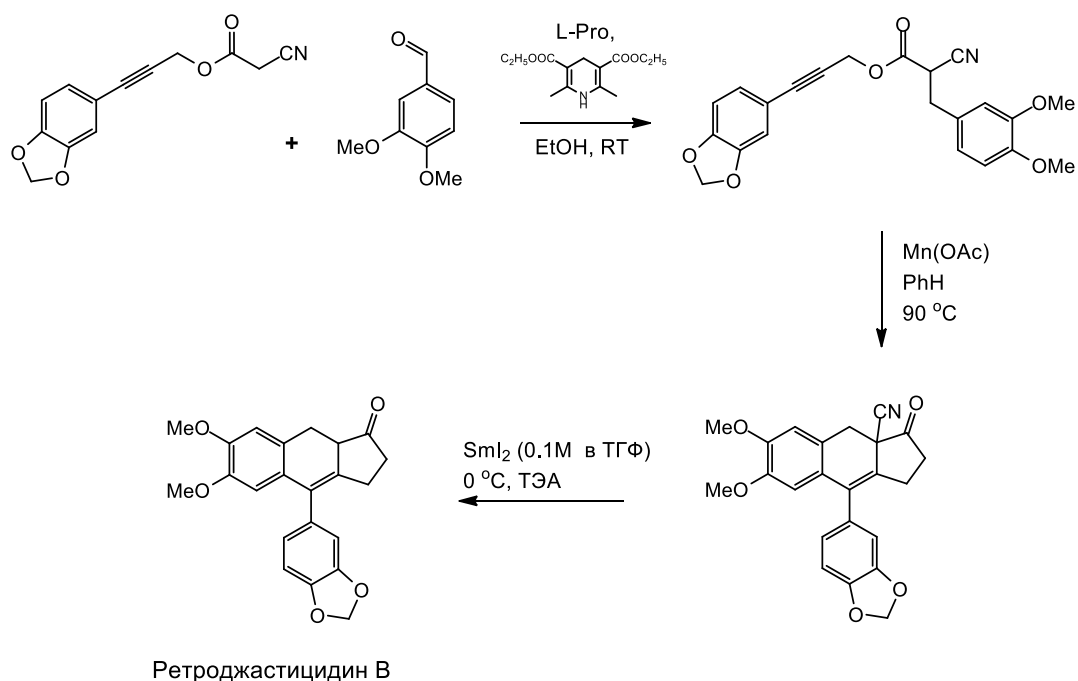


Схема 10. Схема синтеза ретроджастидина В с использованием $Mn(OAc)_3$ в качестве окислителя на стадии димеризации карбонитрила.

Также известно применение водного раствора 0.1 М $KMnO_4$ в качестве окислителя. В данном случае окислительное сочетание происходило из кофейной кислоты в дистиллированной воде в присутствии 0,2 эквивалентов перманганата калия. В качестве побочного продукта в реакции образовывалось 1,2-дигидронафталиновое соединение с потерей одной карбоксильной группы. Выходы данной реакции наблюдались достаточно низкие [40] (схема 11).

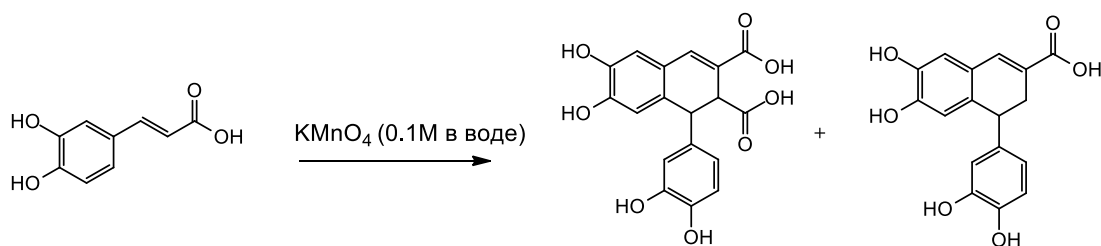


Схема 11. Димеризация кофейной кислоты в присутствии KMnO_4 в качестве окислителя.

В ходе исследования Маеды влияния окислителей на ход димеризации также был изучен гексацианоферрат калия $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Окислительное сочетание в присутствии 1.2 эквивалентов $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и 5 эквивалентов карбоната натрия позволяло получить 20% арилдигидронафталинового производного и по 2% бензоксантиновых в качестве побочных продуктов. В то же время при использовании аналогичного количества гексацианоферрата калия и 1.5 эквивалента 1% раствора карбоната натрия в хлороформе при комнатной температуре удалось выделить лишь 13% арилдигидронафталинового производного. В качестве побочных продуктов оказались бензоксантиновое и нафталиновое производные [36] (схема 8).

Гексацианоферрат калия также используется в схеме получения синтетических лигнанов для получения неолигнанов, которые в дальнейшем трансформируются в арилдигидронафталиновый продукт путем реакции Фриделя-Крафтца в присутствии AlCl_3 [41]. Полученный продукт может быть модифицирован в дальнейшем с целью синтеза необходимых аналогов природных соединений, обладающих биологической активностью. На схеме 12 показан синтетический путь образования димерных продуктов. Окислительное сочетание защищенного фенилпропаноидного производного проводилось в двухфазной системе бензол-вода в присутствии 5,5 эквивалентов KOH и 2.5 эквивалентов $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в инертной среде при комнатной температуре в течение 30 минут. Выход составил 92%.

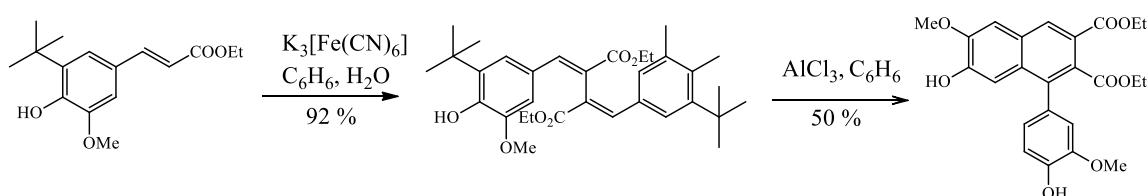


Схема 12. Применение метода Фриделя-Крафтца для синтеза природных лигнанов

В качестве катализаторов для окислительной димеризации также известно использование пероксида водорода и пероксидазы хрена (HRP). Так в 2002 году группой японских ученых был получен американол А и изоамериканол А [42]. В качестве исходного материала использовали производные кофейной кислоты, которые при комнатной температуре в присутствии H_2O_2 вводили в реакцию в фосфатном буфере (0.1M, pH 6.0) с 18% диоксана и HRP в качестве катализатора. Основными продуктами реакции являлись бензодиоксановые производные, представляющие собой целевые природные лигнаны. Арилдигидронафталиновые производные оказались в минорном количестве и обнаруживались лишь в качестве побочных продуктов (схема 13). Более поздние работы подтвердили полученный результат использования в качестве катализаторов HRP в присутствии пероксида водорода [43].

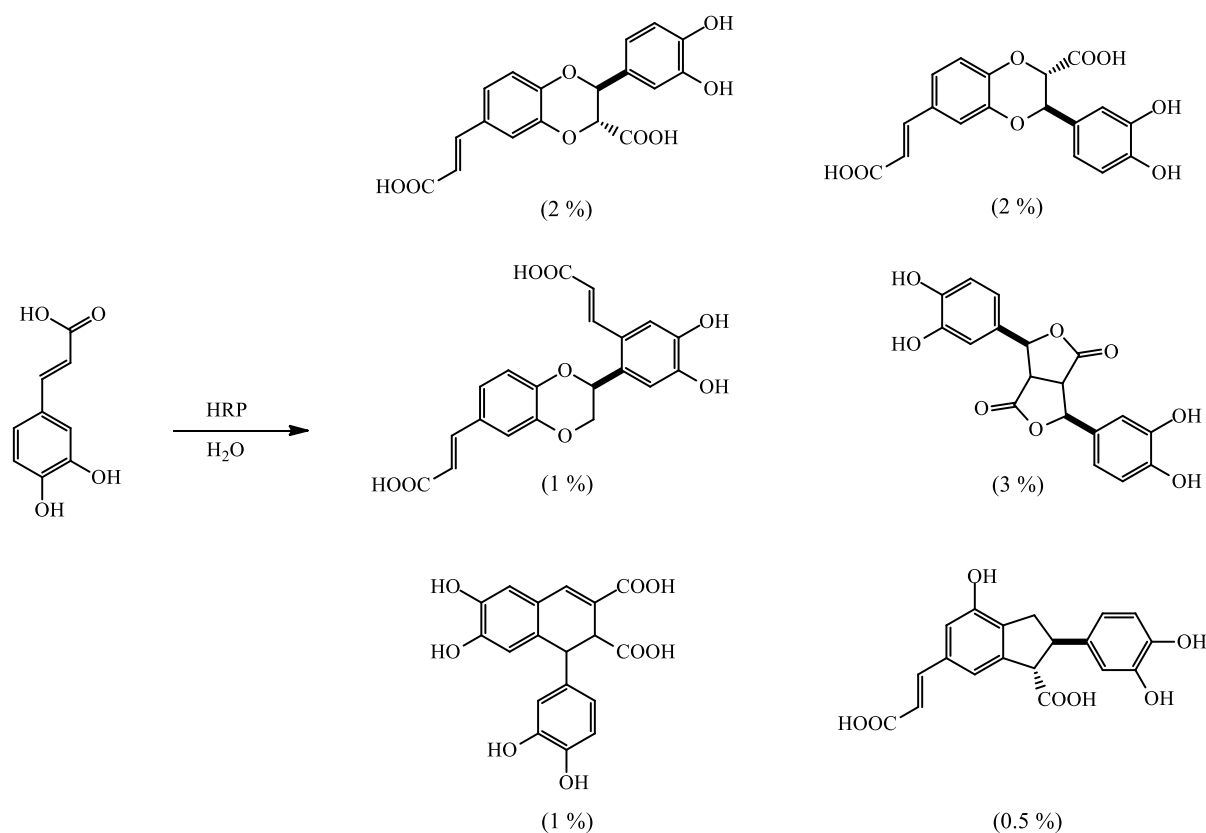


Схема 13. Продукты реакции окислительного сочетания кофейной кислоты в присутствии HRP и H_2O_2 .

Еще одним альтернативным методом окислительной димеризации является окисление кофейной кислоты кислородом при $\text{pH} \sim 8.5$ [44]. Описанные продукты, полученные данным методом, являются идентичными описанному выше способу димеризации с использованием HRP (схема 13). К сожалению, точных выходов по полученным соединениям не было опубликовано. Однако, согласно данным, подобный метод обладает достаточно низкой селективностью и не является пригодным для направленного получения необходимого продукта реакции окислительного сочетания.

Наиболее распространенным способом синтеза арилдигидронафталиновых производных стал метод окислительной димеризации в присутствии FeCl_3 . Так в 1989 году впервые был получен рабдозин в виде рацемической смеси [45]. В качестве исходного материала использовали метилкаффеат (схема 14). Далее проводили реакцию окислительного сочетания в ацетоне при комнатной температуре в присутствии $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Выход составил 28%. Позднее в 1997 году Богуки с соавторами провели исследование получения рабдозина в различных условиях (изменяли растворители, количество FeCl_3) [46]. Самыми оптимальными условиями для димеризации оказалась смесь ацетон-вода в соотношении 2:1 и 2.2 эквивалента FeCl_3 . В то же время использование в качестве растворителя ТГФ привело к уменьшению селективности и скорости реакции. В ходе реакции образовывались арилдигидронафталиновые производные в виде смеси диастереомеров в качестве основных продуктов реакции и бензоксифурановые в качестве минорных продуктов.

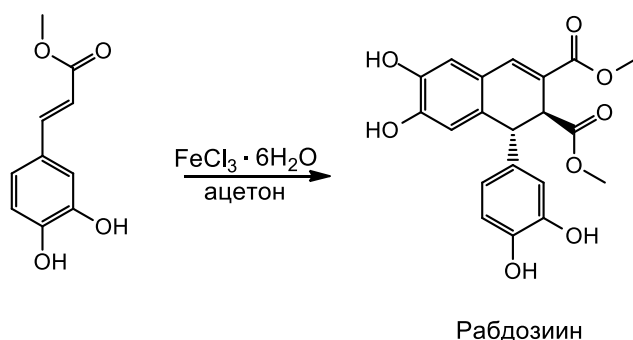


Схема 14. Синтез рабдозина с использованием димеризации метилкаффеата в присутствии $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

2.3.2 Механизм реакции окислительной димеризации

Несмотря на большое количество опубликованных ранее механизмов окислительной димеризации, редко встречаются описания, подтвержденные экспериментальными данными или соответствующими расчетами. В ходе исследования биомиметических методов синтеза природных и «неприродных» лигнанов Дакино с соавторами предложили свою гипотезу процесса протекания реакции окислительного сочетания на основе выполненных экспериментальных расчетов [38]. Исходя из данных после отщепления атома водорода от п-фенольной группы производного коричной кислоты образуется феноксирадикал с неподеленной электронной парой в β -положении. Таким образом появляется возможность сочетания с аналогичным β -радикалом (8-8' сочетание) с образованием бис-хинонметида **A**. Его таутомер **B** вступает в внутримолекулярную циклизацию (6-7'), т. е. происходит электрофильное замещение в бензольном кольце (S_EAr) в позиции 6 активированного ароматического кольца [47]. В результате циклизации образуется арилдигидронафталиновый продукт (схема 15).

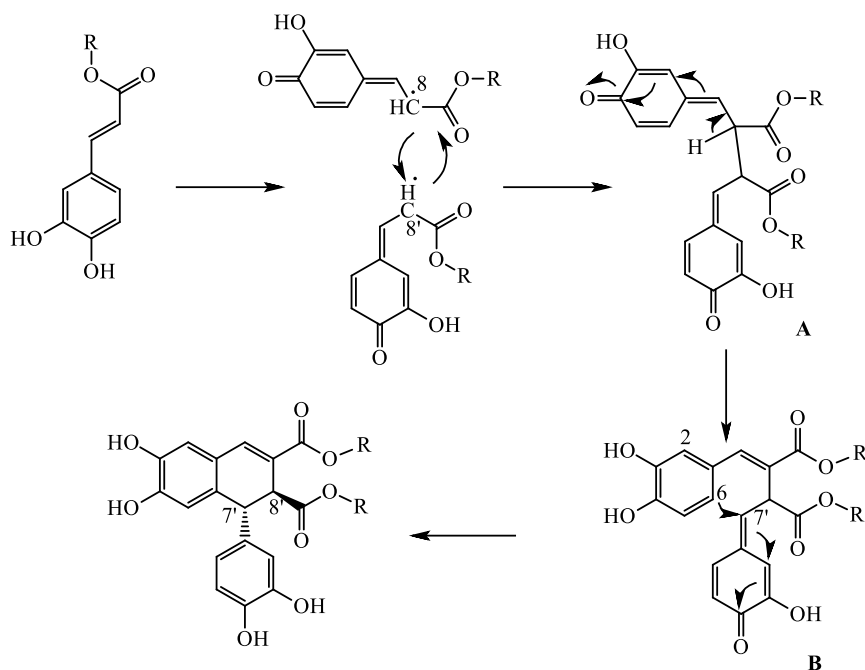


Схема 15. Механизм образования арилдигидронафталиновых производных.

Процесс образования бензоксантиновых производных менее очевиден. Маеда с соавторами предложил возможный механизм данного пути окислительной димеризации, но он не описывал достоверно процесс образования продукта [47]. В упомянутой выше работе Дакино опубликовал альтернативную гипотезу, подтвержденную расчетными данными, имеющимися в статье. По этому механизму,

отображенному на схеме 16, димерные продукты получают в результате того же 8-8' сочетания через интермедиат **A'**. Различие пути образования продукта реакции заключается в расположении мета-гидроксигруппы по отношению к пропениловой цепи молекулы, т. е. при *экзо*-расположении образуется арилдигидронафталинное производное через интермедиат **B** (схема 15), в то время как при *эндо*-расположении происходит образование бензоксантинового соединения через интермедиат **B'** (схема 16).

Стоит отметить, что соединения **A** (схема 15) и **A'** (схема 16) являются геометрическими изомерами и могут находиться в растворе совместно с другими возможными *E/Z* стереоизомерами. Интермедиаты **B** (схема 15) и **B'** (схема 16) являются конформационными изомерами и могут легко взаимозаменяться. Стадия 2-7' внутримолекулярной циклизации очень похожа на подобную в схеме 15 и ведет к образованию интермедиата **C'** (схема 16), который представляет собой арилдигидронафталин. Последующие окислительные превращения ведут к последовательному образованию интермедиатов **D'** и **E'**. Интермедиат **E'** вступает в дальнейшую реакцию циклизации путем нуклеофильной атаки 3-ОН в позиции 5' хинонметида и превращается в следующий интермедиат **F'**, который впоследствии таутомеризуется в бензоксантиновый продукт [38].

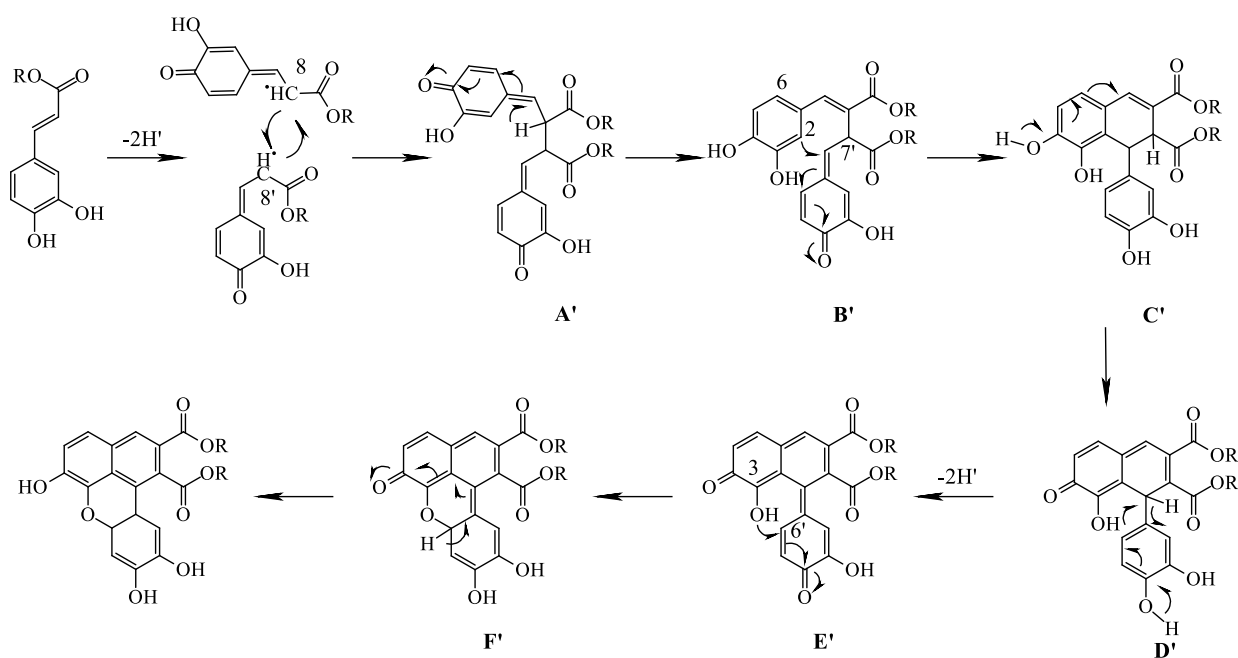


Схема 16. Механизм образования бензоксантиновых производных.

2.4 Синтез лигнанов с применением различных методов классической циклизации и фенольной окислительной димеризации

Классическим подходом к циклизации фенилпропаноидных субъединиц принято считать проведение димеризации пропенилфениловых мономеров в присутствии того или иного окислителя. Однако данный способ получения целевых лигнанов часто сопровождается невысокими выходами ввиду образования большого количества побочных продуктов. Нежелательные продукты реакции, которые приводят к сложностям выделения необходимого соединения из реакционной смеси, возможно избежать используя альтернативные методы получения лигнанов путем конденсации или циклизации. Также подобные методы используются в качестве промежуточных стадий с целью получения аналогов природных соединений [41,48].

Одним из таких методов является конденсация Штоббе, которая используется в большинстве случаев для построения базового скелета будущего лигнана [49-52]. Так Кромби с соавторами продемонстрировали синтез кубенина и его производных в 1969 году. Подобный способ был использован для получения различных изомеров диметилового эфира дигидрогиарретинової кислоты, а также синтеза арилтетралинов, ниртетралина и гипофиллантина [53]. Структура последних соединений, найденных в листьях тропического растения *Phyllanthus niruri*, была объектом исследования долгие годы. Синтез этих бензилбутиролактонов был осуществлен конденсацией соответствующего ароматического альдегида с диметилсукцинатом в метаноле с NaOMe. Циклизация полученных лактонов протекала при комнатной температуре при обработке трифторуксусной кислотой (ТФУ). Далее соединения восстанавливали с использованием LiAlH_4 и метилировали с целью получить аналоги природного соединения, а именно арилтетралины [54]. На схеме 17 отображен пример использования конденсации Штоббе в качестве вспомогательной реакции для формирования скелета лигнана. В то же время группа японских ученых использовала конденсацию бензофенового производного с целью получить арилнафталиновый лактон [55].

Стоит отметить, что 2,3-добензилиденсукцинаты могут быть получены конденсацией Штоббе, однако на данный момент не найден подход конденсации соединений, имеющих незащищенные ОН-группы в фенольных структурах. Возможно, наличие гидроксильной группы на исходном альдегиде мешает эффективной конденсации. Известно, что всегда можно защитить гидроксильные группы введением подходящих защитных групп, но дальнейшее их удаление может значительно

уменьшить общий выход реакции и вероятно может привести к образованию побочных продуктов, уменьшая эффективность данного метода.

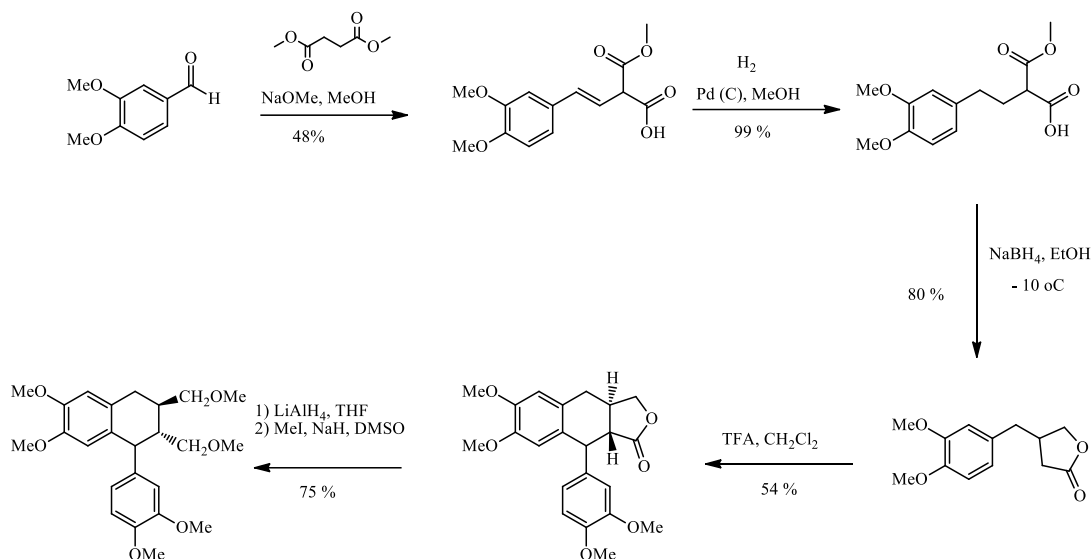


Схема 17. Получение (+)-филтетралина, выделенного из листьев *Phyllanthus niruri*, с использованием метода конденсации Штотбе.

Именно поэтому в работе Ванга с соавторами, упомянутой выше, была предложена альтернативная методика использования реакции Фриделя-Крафтца для циклизации промежуточного соединения в необходимый лигнан [41] (схема 12). Реакция Дильса-Альдера также используется для синтеза арилнафталиновых и арилтетралиновых лигнанов. Впервые эта методика, включающая циклизацию ангидрида ацетиленовой кислоты, была применена для синтеза лигнанов тайванина С и дегидроотобаина в 60-70ых годах [56-59]. На схеме 18 отображен пример использования реакции Дильса-Альдера для получения лигнанов.

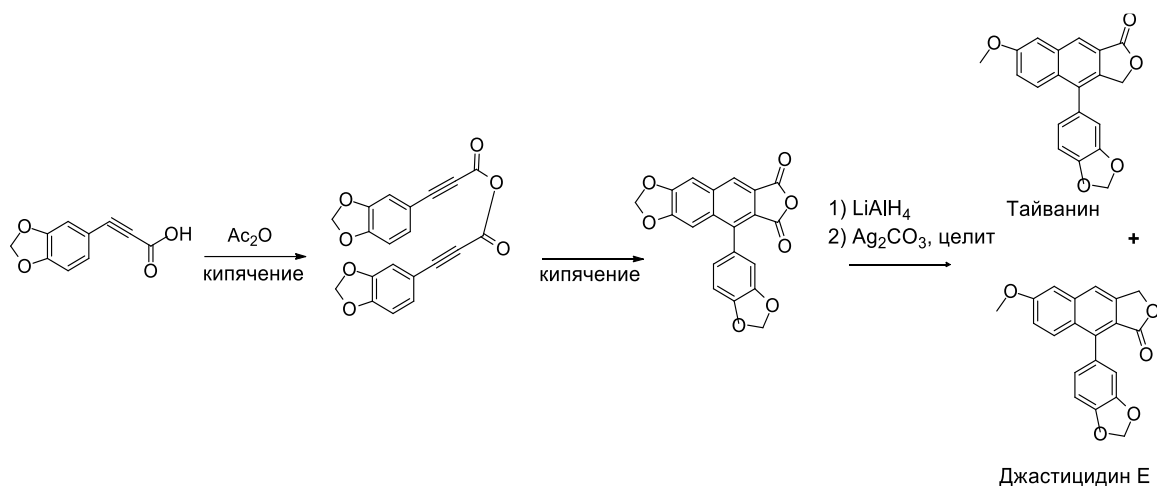


Схема 18. Использование реакции Дильса-Альдера для получения тайванина и джастидина Е.

В 2009 году Денг с соавторами опубликовали асимметричный полный синтез (-)-пликтатовой кислоты [60]. Внутримолекулярная реакция Фриделя-Крафтца в присутствии трифторметансульфоновой кислоты (TfOH) приводила к формированию шестичленного цикла, который трансформировался в диол в результате силилирования и реакции Барбье в присутствии $\text{SmI}_2/\text{NiI}_2$ (схема 19). После окисления Флеминга-Тамао-Кумада был получен продукт, который затем после гидратации и полного дибензилирования позволял получить лигнан пликтатовой кислоты [61,62].

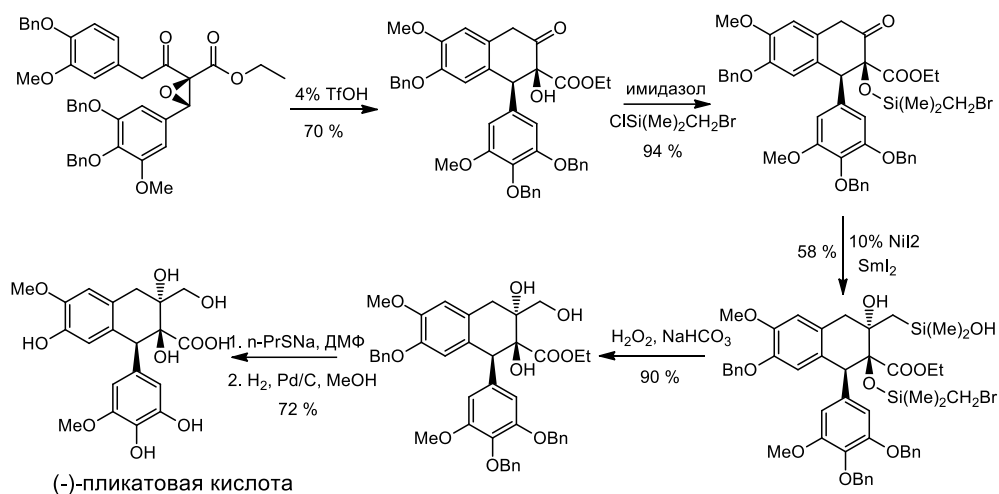


Схема 19. Схема синтеза (-) - пликтатовой кислоты.

Стратегия стереоселективной перегруппировки аза-Кляйзена, разработанная в 2011 году Баркером с коллегами, с последующей циклизацией в необходимый лигнан успешно применялась для асимметричного синтеза (-)-циклогалгравина и (-)-пикнантулигенов А и В (схема 20) [63].

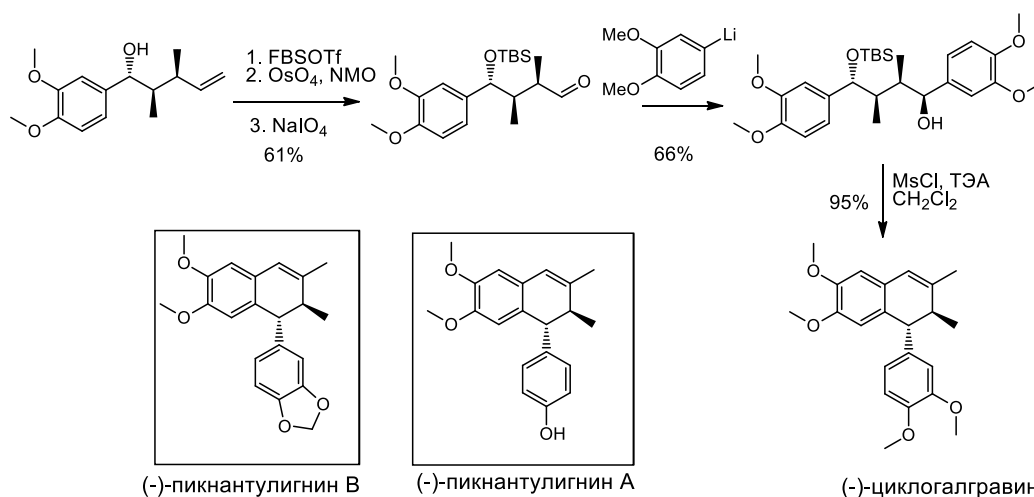


Схема 20. Схема получения (-)-циклогалгравина.

В 2012 году Хонг с соавторами опубликовали энантиоселективный полный синтез (+)-галбулина, в котором для получения необходимого скелета молекулы использовали

метод органокалитических асимметричных каскадных альдольных конденсаций по Михаэлю [64] (схема 21). Подобная же стратегия с использованием домино-реакций была опубликована совсем недавно в 2018 году Ишибаши с соавторами для полного синтеза (+/-)-изоларицирезинола [65].

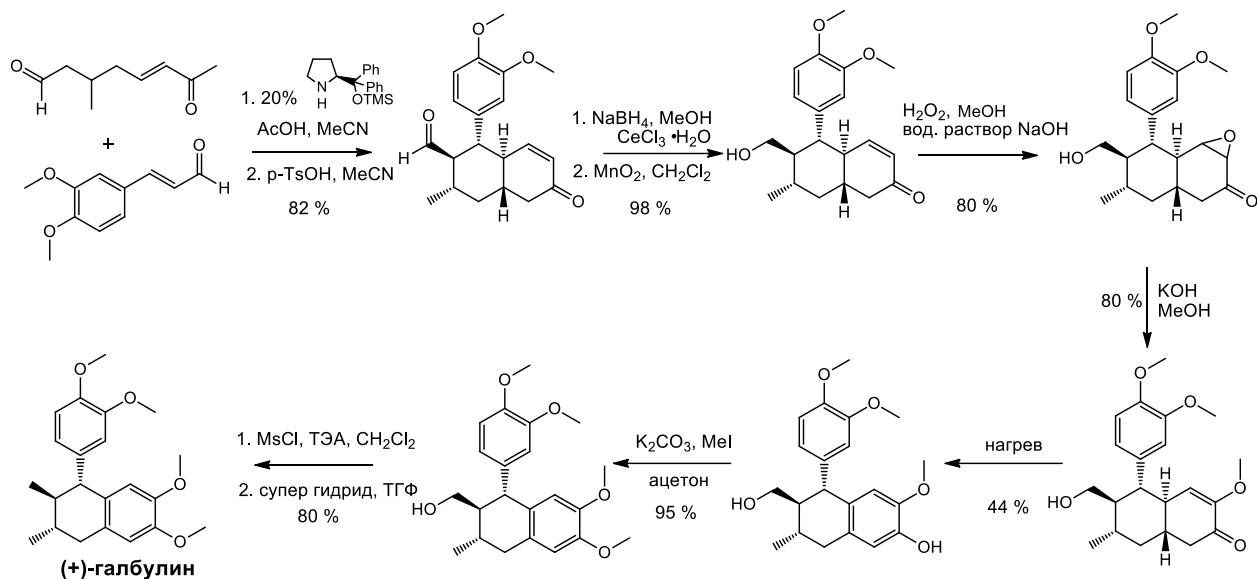


Схема 21. Схема получения (+)-галбулина.

Стратегия с использованием радикальной циклизации Уино-Сторка с последующей перегруппировкой скелета молекулы, позволяющей получить необходимый нафталиновый лигнан сацидумлигнан А была опубликована в 2013 году [66] и отображена на схеме 22.

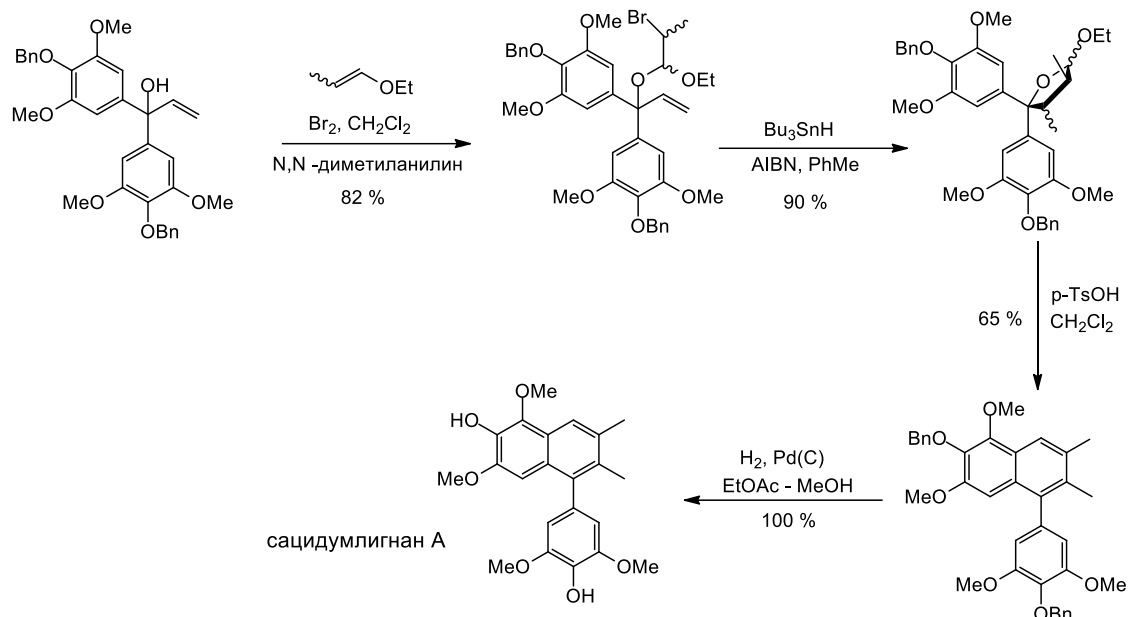


Схема 22. Схема синтеза сацидумлигнана А.

Популярным методом синтеза арилнафталиновых производных являются реакции кросс-сочетания, когда происходит конденсация двух различных органических фрагментов. Одним из примеров успешного применения данной методики является полный синтез серии лигнанов, производных джастицидина, опубликованный в 2017 году. Авторы использовали в своей работе аннелирование Хаузер-Крауса в присутствии LiHMDS в ТГФ с последующим кросс-сочетанием Сузуки-Мияура (Схема 23) [67].

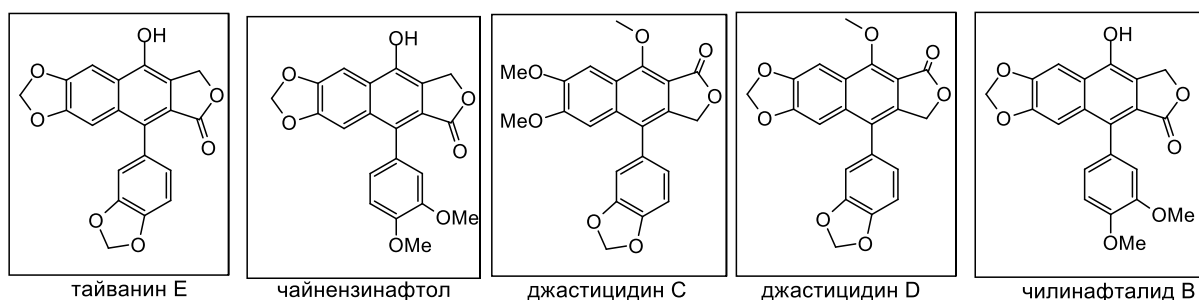
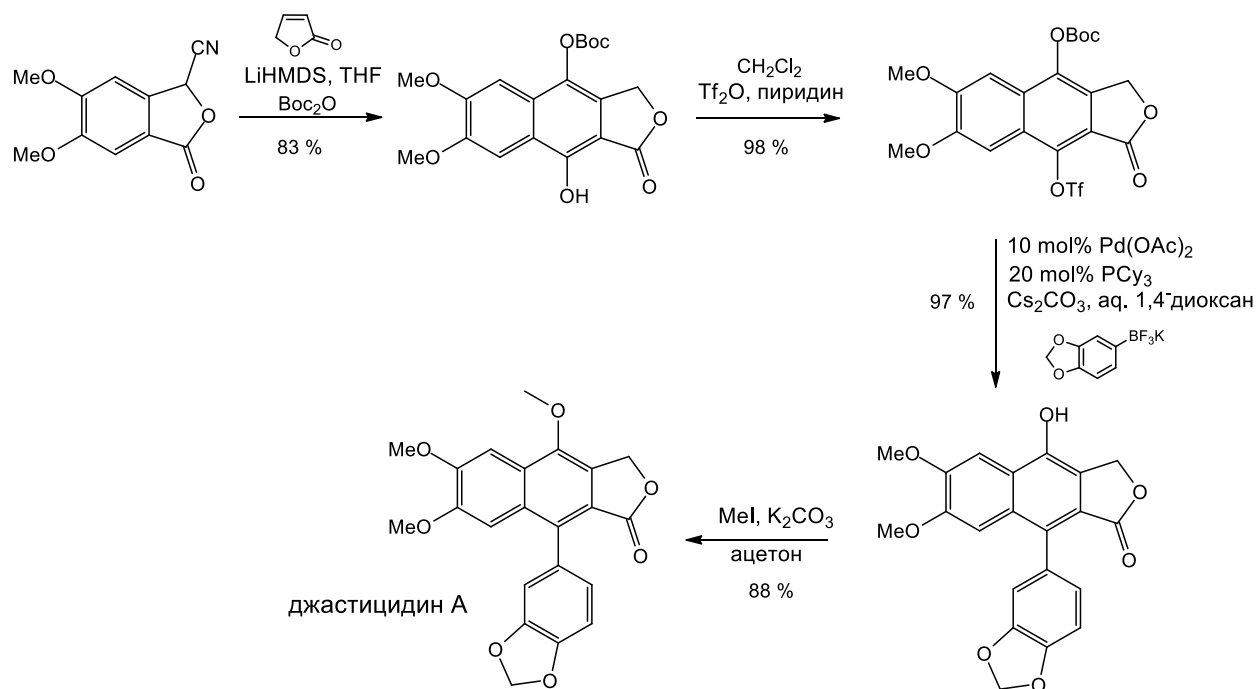


Схема 23. Синтез серии семи арилнафталиновых производных лигнанов с использованием реакции кросс-сочетания Сузуки-Мияура.

Интересной методикой получения некоторых лигнанов является «нефенольная» окислительная димеризация. Ключевой стадией является образование связи арил-арил путем окислительного сочетания и дальнейшая циклизация с образованием тетралиновых лигнанов. В качестве исходных реагентов обычно используют производные коричневых кислот, как и в случае окислительной димеризации [68-70]. В качестве вспомогательных реагентов применяются трифторацетаты Tl(III), тетрафторбораты и прочие кислоты Льюиса. Пример использования данной методики был приведен Кенде в 1976 году при синтезе стеганола и изостеганола [68,69]. Позднее Пелтер с соавторами описали общую методику получения арилтетралиновых лигнанов, сравнив метод окислительной димеризации и метод нефенольной окислительной димеризации [70]. Хинонметидовый кеталь получали из соответствующей 4-арилбутановой кислоты. Кислоту восстанавливали до спирта, а затем через

метилование с дальнейшей обработкой LiBr в ацетоне получали 4-арилбутилбромид. Кватернизация с трифенилфосфином давала соль фосфония, которая вступала в реакцию Виттига с 4,4-диметоксициклогекс-2,5-диеноном. В результате конденсации образовывался необходимый хинонметидный кеталь, который в дальнейшем подвергался обработке TFAA или BF₃. При обработке TFAA в качестве побочного продукта образуется продукт элиминирования, использование BF₃ существенно увеличивает выход необходимого продукта. Подробнее такой метод нефенольной окислительной димеризации для синтеза продуктов, подобных лигнанам циклооливилу и лионирезинолу, отобразен на схеме 24.

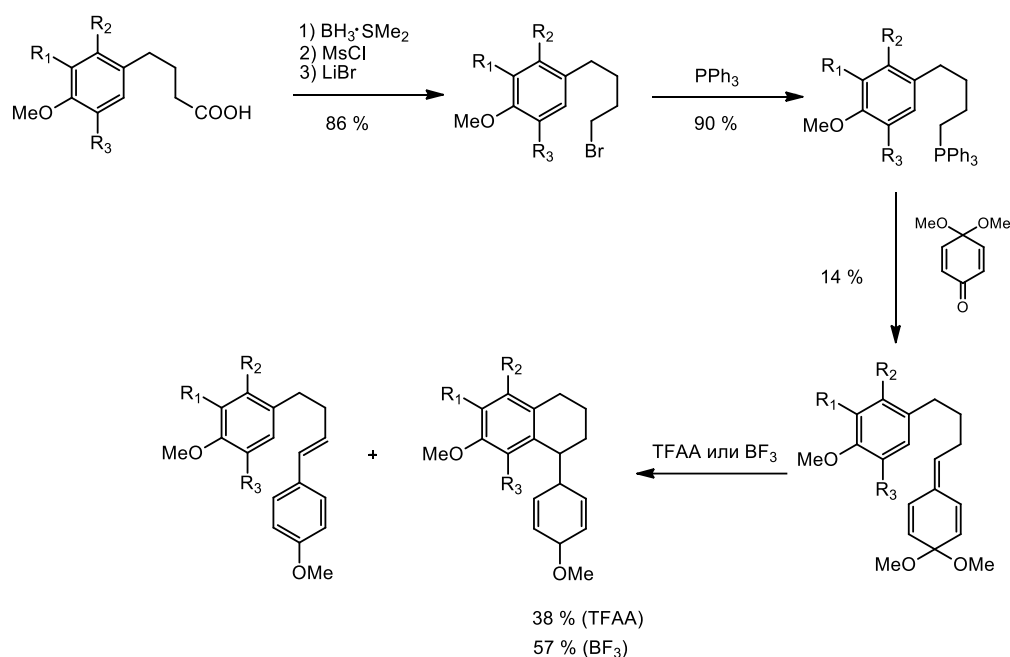


Схема 24. Нефенольная окислительная димеризация на примере методики получения циклооливила или лионирезинола.

В литературных обзорах о методах синтеза лигнанов и неолигнанов также встречаются самые разнообразные способы, такие как альдольный метод синтеза, перегруппировка и циклоприсоединение, 1,4-присоединение ацильного аниона к α,β -ненасыщенным карбонильным производным, фотоциклизация под действием УФ-света [33]. Каждый метод отличается своими ключевыми стадиями и выходами по отношению к целевому лигнану. Выбранная стратегия димеризации может значительно повлиять на направленность реакции по отношению к синтетическому получению того или иного класса природных лигнанов. Важным моментом, влияющим на выход окислительного сочетания, также является наличие подходящих защитных групп на ключевом интермедиате перед стадией димеризации. После тщательного обзора

существующих публикаций, посвященных синтезу разнообразных лигнанов, важным является наблюдение, что для синтеза дигидронафталиновых лигнанов целесообразнее использовать методы окислительной димеризации. В случае использования методов нефенольной димеризации преобладающим продуктом реакции являлись арилнафталиновые производные.

2.5 Биологическая активность лигнанов

Большая часть лигнанов, демонстрирующая интересную биологическую активность, были выделены из растений, чаще всего используемых в народной медицине и в качестве так называемых нутрицевтиков (биологически активных добавок). За последнее время систематизировано большое количество данных, показывающих широкий спектр влияния полифенольных молекул на физиологические процессы внутри организма млекопитающих [71]. Также известно токсическое действие данных соединений на грибы, насекомых и мелких позвоночных [72]. В таблице 2 собраны опубликованные примеры лигнанов, показывающие различную биологическую активность.

Таблица 2. Разнообразие биологической активности лигнанов.

Биологическая активность	Организм	Подгруппа лигнана	Ссылка
Противовирусная	Саурин В	дibenзоилбутаны	[12]
	Акутиссималигнан В	дibenзоилбутиролактоны	[17]
	Сеселинон	тетрагидрофураны	[16]
	Рубризандрин С	дibenзоциклооктадиены	[64]
Цитотоксическая	Ханултарин	дibenзоилбутаны	[65]
	Филлантусмин А	арилнафталины	[66]
Антиоксидантная	Актаэалактон	дibenзоилбутиролактоны	[67]
	Тареннанозиды А	арилнафталины	[68]
	Берхемол 9- <i>O</i> -рамнопиранозид	тетрагидрофураны	[69]
Антимикробная	6-метоксидифиллин	арилнафталины	[70]
	нор-изогуацин	арилнафталины	[71]
Противовоспалительная	Лигнаны из <i>Peperomia duclouxii</i>	арилнафталины	[72]
	Оливил 9- <i>O</i> - <i>b</i> - <i>d</i> -ксилопиранозид	тетрагидрофураны	[69]

Противоаллергенная	Кадсуралигнан А, В	дибензоциклооктадиены	[73]
Антимитотическая	Эпипофиллотоксин	арилтетралины	[74]
Антимитотическая	Пикроподофиловая кислота	арилтетралины	[74]
Инсектициды	Кобузин	тетрагидрофураны	[75]
Седативная	Сирингарезинол	тетрагидрофураны	[76]

Достаточно трудно выделить общие структурные характеристики, которые могли бы объяснить ту или иную биологическую активность лигнанов. Однако Макрай с соавторами в 1983 году в своем обзоре попробовали установить некоторые закономерности. Они заметили, что соединения, обладающие противоопухолевой активностью, чаще всего имеют в своей структуре пятичленное лактоновое кольцо, 3,4,5-триметоксифенильные группы, метилendiокси-функцию или две замещенные фенильные группы, разделенные четырехуглеродной цепью [72]. Данное наблюдение подтверждают исследования активности дигидробензофуранового лигнана на клетки раковой опухоли [86]. Наличие лактонового кольца также оказалось важным в процессе антимитотической активности для связывания с тубулином и препятствию формирования микротрубочек. Замещение его на фуран приводило к снижению биологической активности молекулы [87].

Позднее Жанг с соавторами обобщили соотношение структура-активность для соединений лигнанов [4] (схема 2):

- 1) дибензоилбутановые лигнаны проявляют такие активности, как антивирусная, антиоксидантная, и цитотоксический эффект;
- 2) дибензоилбутиролактоны, в добавление к той же активности, что и дибензоилбутаны, демонстрировали еще противораковую и противолейшманиозную активности;
- 3) арилнафталиновые производные проявляют, как правило, антибактериальную активность, ингибируют NO-продукцию, цитотоксическую, антивирусную активность, противовоспалительную, а также являются хорошими антиоксидантами;
- 4) тетрагидрофураны показывают большое разнообразие биологической активности, включая цитотоксическую, антиоксидантную, трипаноцидную, анти-HIV-1, а также увеличивают рост и дифференциацию остеобластов, проявляют эффект ингибирования простагландинов и цитохрома;

5) фуурофураны являются ингибиторами NO-продукции, вируса табачной мозаики и раковых клеток, а также проявляют СРЛ-активность;

6) дибензоциклооктадиены проявляют противовирусную активность, цитотоксическую и антиоксидантную, антиагрегантную активность.

2.6 ASIC каналы и их роль в патофизиологических процессах

До недавнего времени противовоспалительная и обезболивающая активность лигнанов не связывалась со способностью влиять на ионные каналы типа кислоточувствительные ионные каналы (acid-sensing ion channel, ASIC). Было известно, что лигнаны способны модулировать воспаление и болевые сигналы с помощью нескольких механизмов: модуляция активации иммунных клеток через интерференцию сигнального пути NF- κ B, подавление провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6, TNF α , HMG1, TGF β 1, и рецепторов цитокинов TNF α R1, TGF β R1, подавление активности и уровней фермента циклооксигеназы [88]. Для того, чтобы понять, насколько эффективно лигнаны могут облегчать боль и воспаление, блокируя проводимость ASIC-каналов, следует более детально рассмотреть структуру и функцию этих каналов.

Такие патофизиологические процессы, как воспаление, ишемия, инфекция и повреждение тканей, могут вызывать в организмах ощущение боли и сопровождаться местным ацидозом [89-91]. Протон-чувствительные ионные каналы (ASICs) являются натриевыми каналами, которые экспрессируются в центральной и периферической нервной системе. Впервые рецепторы, чувствительные к экстрацеллюлярному снижению pH, были обнаружены в 1980 году О.Криштаем с коллегами и более подробно охарактеризованы лабораторией Лаздунского в 1997 году [92,93]. На данный момент ASICs представляют собой биологическую мишень для дизайна новой группы анальгетиков. Они регулируют изменение кислотно-щелочного равновесия в тканях путем открытия канала вследствие изменения физико-химических характеристик среды [94]. Таким образом, ASICs вовлечены во многие физиологические и патофизиологические процессы, такие как ишемия мозга, болевая чувствительность при ишемии и воспалении, вкусовая чувствительность, механорецепция, ноцицепция, формирование и передача болевого импульса [95-99].

ASIC каналы относятся к семейству амилорид-чувствительных дегенерин/эпителиальных (DEG/ENaC) Na⁺-каналов [99,100]. У млекопитающих было обнаружено четыре ASIC гена (*ACCN 1-4*), кодирующие, по крайней мере, 6 субъединиц: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 и ASIC4. В человеческом организме обнаружены изоформы ASIC3a, ASIC3b и ASIC3c [92]. Эти субъединицы образуют функциональные ионные каналы в виде гомо- или гетеротримеров. Каналы разного субъединичного состава различаются по условиям активации, ионной селективности, кинетике и локализации (таблица 3) [102].

Таблица 3. Условия активации и локализация различных изоформ ASICs.

Субъединица	Изоформа	Синонимы	pH ₅₀ -чувствительность*	Распределение
ASIC1	ASIC1a	ASIC α , BNaC2 α	6.5-6.8	ЦНС, ПНС
	ASIC1b	ASIC β , BNaC2 β	6.1-6.2	ПНС
ASIC2	ASIC2a	MDEG1, BNaC1 α , BNC1	4.5-4.9	ЦНС, ПНС
	ASIC2b	MDEG2, BNaC1 β	нет применения	ЦНС, ПНС
ASIC3		DRASIC, TNaC	6.4-6.6	ПНС**
ASIC4		SPASIC	нет применения	ЦНС, ПНС

* значение pH, при котором происходит полумаксимальная активация канала

**ASIC3a, -3b, -3c проявляют низкий уровень экспрессии в ЦНС [103]

Таким образом, ASIC1a, ASIC2a, ASIC2b, и ASIC4 обнаруживаются в центральной (ЦНС) и периферической нервной системе (ПНС), в то время как ASIC1b и ASIC3 – преимущественно в ПНС. Исключением являются изоформы ASIC3 человека, обнаруживаемые в ЦНС, однако проявляющие низкий уровень экспрессии [103,104]. В ПНС ASICs были обнаружены в соматических клетках и сенсорных нервных окончаниях. В центральных нейронах ASIC1a преимущественно располагается в соматических клетках и дендритах, где он колокализуется с постсинаптическим маркером PSD95 [105,106].

Дальнейшее подробное рассмотрение особенностей функционирования и регуляции ASICs как одной из перспективной мишени терапевтического лечения болевых и воспалительных синдромов требует общего понимания структуры канала, представленного на схеме 25. Все представители семейства DEG/ENaC имеют общую мембранную топологию. ASIC субъективности состоят из двух трансмембранных сегментов (TM1 и TM2), внутриклеточных амино- и карбокси- концевых участков и большой цистеин богатой экстрацеллюлярной петли, занимающей больше половины от массы белка [107]. Большая экстрацеллюлярная петля играет важную роль в регуляции и активации ASIC каналов. Домен N-концевого участка, примыкающий к TM1, отвечает за селективность канала к ионам Na⁺ [108]. Проводящая пора в мембране формируется путем непосредственных контактов TM1 и TM2 доменов всех трех субъективности. Домен TM2 участвует в образовании ворот десенситизации, где важную

роль играют аминокислотные остатки (а.о.) Asp433–Gly436, причем боковые группы Asp433 направлены в просвет поры [109]. Различные кристаллические структуры cASIC1 (куриного ASIC канала) показали, что канал состоит из трех субъединиц, расположенных вокруг центральной ионной поры (схема 25А). Топология ASIC канала имеет некоторое сходство с предплечьем и сжатой кистью, где сжатая кисть представляет собой экстрацеллюлярный участок, предплечье – трансмембранную часть, а запястье – трансмембранно-экстрацеллюлярный переход. Различные экстрацеллюлярные домены были названы: «запястье» (wrist), «ладонь» (palm), «палец» (finger), «кулак» (knuckle), « β -шар» (β -ball) и богатого цистинами домена «большой палец» (thumb). На схеме 25А и 25Б схематически изображена структура канала ASIC [110].

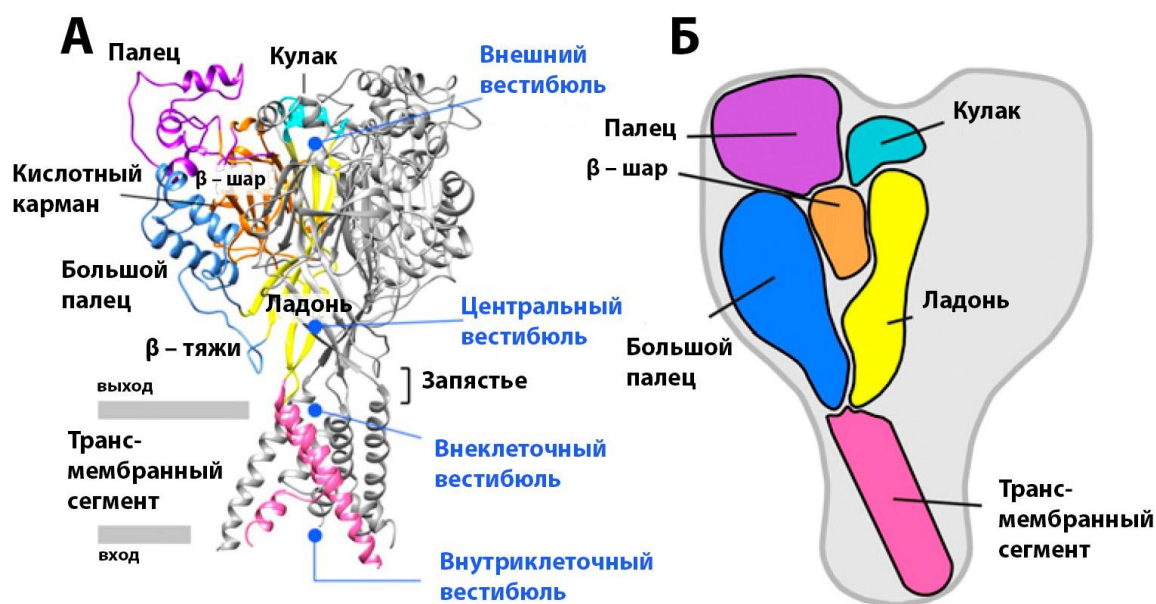


Схема 25. Структура ASIC канала. (А) Домены трансмембранного сегмента (розовый), ладонь (желтый), большой палец (голубой), палец (фиолетовый), β -шар (оранжевый), кулак (бирюзовый) [101]. (Б) Схема ASIC единицы с доменами, обозначенными соответствующими цветами.

Экстрацеллюлярная часть занимает 2/3 канала и содержит 7 α - спиралей (α 1-7), 12 β – тяжей (β 1-12) и 14 дисульфидных связей. На границе раздела «большой палец», «палец» и «ладонь» присоединяются ионы Cl^- , играющие важную роль в десенситизации ионного канала [112]. В области границы домена «большой палец» и «палец» одной субъединицы и домена «ладонь» другой происходит присоединение протонов к экстрацеллюлярной петле. Данная область представляет собой впадину,

богатую кислотными остатками, и вследствие этого называется «кислотный карман». «Кислотный карман» имеет функцию катионного резервуара, который концентрирует катионы вблизи поры ионного канала, что способствует лучшей проводимости сигналов.

ASICs также имеют внутриклеточные NH_2 - и COOH -концевые участки, которые не представлены в кристаллических структурах. Эти домены играют важную роль в канальном стробировании, ионном проникновении, внутриклеточных белок-белковых взаимодействиях и модуляции внутриклеточными молекулами [113].

2.6.1 Функционирование ASICs ионных каналов

На основе обобщения результатов многочисленных экспериментов был предложен следующий общий механизм открывания канала в ответ на изменение pH. При физиологическом pH каналы преимущественно находятся в состоянии покоя, пора закрыта для проникновения ионов, «кислотный карман» расширен. При понижении pH протонирование/депротонирование кислотных а.о. в домене «большой палец» может влиять на его взаимодействие а.о., находящимися в домене «палец», что приводит к перемещению домена «большой палец» и «кислотный карман» принимает сжатую конформацию, так как $\alpha 5$ поворачивается к кору канала, чтобы обеспечить карбоксил-карбоксилатное взаимодействие между доменом «большой палец» и «палец». Сигнал посредством домена «запястье» передается ТМ доменам, что приводит к изменению угла наклона спиралей, расширению внеклеточного участка поры, сужению в области селективного фильтра (самого узкого места канальной поры) и открыванию канала. Открывание поры приводит к тому, что карбонильные кислороды главной цепи, а также атомы кислорода боковых цепей остатков, таких как Asp433, выстраиваются вдоль оси симметрии третьего порядка на пути следования ионов натрия. Продолжительное действие низкого pH вызывает взаимное сближение домена «запястье» и соседних $\beta 1$ и $\beta 12$ тяжей, что приводит к закупорке центрального участка поры и закрытию ионного канала (процесс десенситизации) [109]. Йодер с соавторами в 2018 году предположили, что после возвращение к физиологическим значения pH электростатическое отталкивание, обусловленное депротонированием кислотных остатков, приводит к расширению «кислотного кармана». Это явление позволяет $\beta 11$ и $\beta 12$ тяжам вернуться к исходной конформации и восстановить протон-чувствительность ионного канала в состоянии покоя [125]. На схеме 26 представлена молекулярная модель механизма открывания ASIC1a канала в ответ на изменение pH среды.

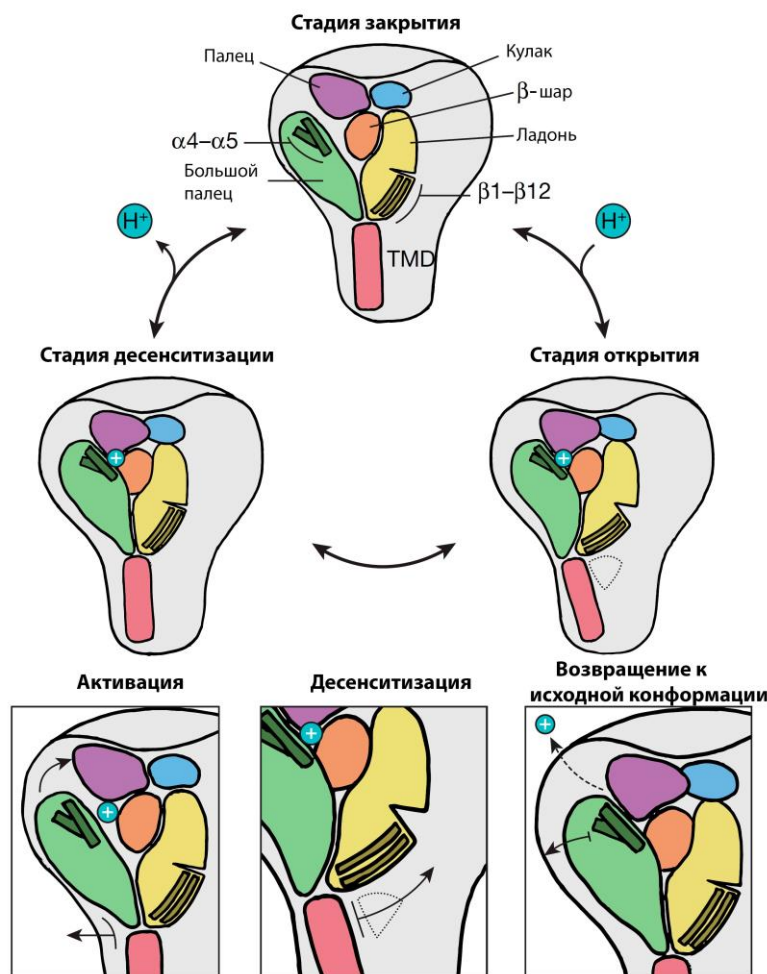


Схема 26. Цикл открывания ASIC1a канала в ответ на изменение pH [125].

На данный момент протоны являются единственным физиологическим активатором ASIC каналов. Остальные молекулы только влияют на эффективность открытия и десенситизации этих каналов. Например, было показано, что синтетическое соединение GMQ активирует ASIC3 при pH 7.4 [115]. Кроме того, токсин паука PcTx1 сдвигает pH-зависимость ASIC, ингибируя ASIC1a при физиологических условиях и активируя куриный ASIC1 и крысиный ASIC1b при pH 7.4 и слегка кислом pH, соответственно [115-119].

Кислотно-индуцированное открытие гомомерных ASIC каналов в большинстве случаев является быстрым, так как за ним сразу же следует десенситизация (Схема 27, А). Это может быть описано с помощью кинетической модели, включающей в себя стадии закрытого состояния, открытого состояния и десенситизации (схема 27, Б). Временные константы кинетики открытия канала 10 миллисекунд или менее были измерены для ASIC1a, ASIC1b и ASIC3 в условиях очень быстрого изменения раствора

при $\text{pH} \leq 6$. В большинстве опубликованных исследований, касающихся функционирования ASICs, данная наблюдаемая кинетика открытия канала, возможно, лимитируется скоростью изменения раствора. Самая быстрая десенситизация наблюдается в ASIC3 каналах, в то время как самая медленная в ASIC2a [120]. Активация ASIC3 с помощью $\text{pH} \sim 7$ и $\text{pH} \sim 5$ индуцирует постоянную компоненту тока в дополнение к быстрой. Постоянные недесенситизируемые токи были исследованы с помощью гетеромерных ASIC каналов [121]. ASIC3 человека активируется не только за счет внеклеточного подкисления, но и при защелачивании, которое может вызвать медленный ток ASIC3 канала [113].

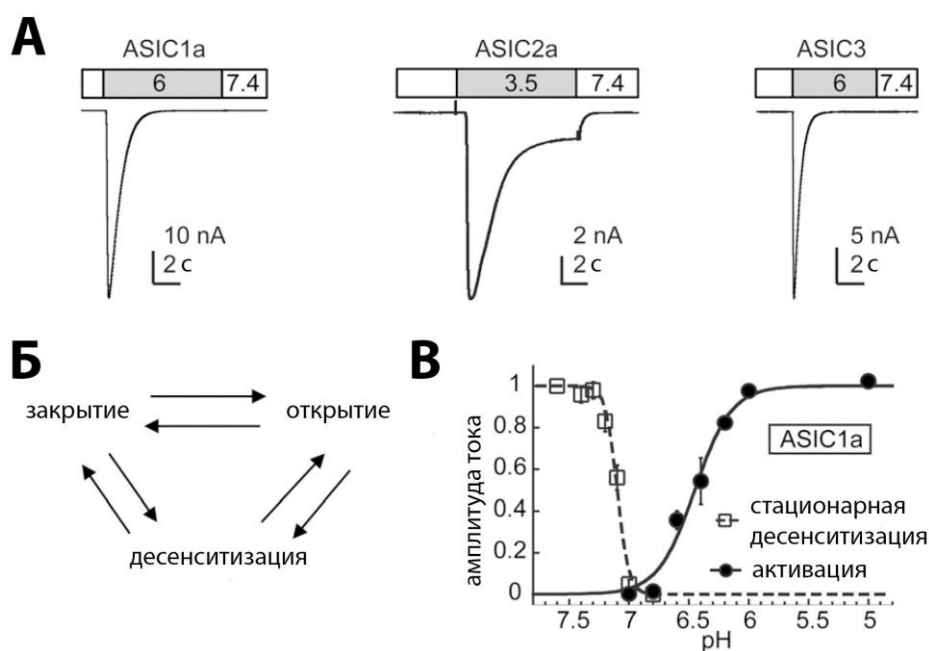


Схема 27. (А) Типичные кислотоопосредованные внутренние токи в клетках CHO, экспрессирующих соответствующие гомомерные ASICs; (Б) схема, иллюстрирующая кинетическую модель ASIC каналов, включающая в себя стадии закрытия, открытия и десенситизации; (В) График, иллюстрирующий простейшую модель функционирования ASIC каналов, включающий в себя стадии открытия, закрытия и десенситизации.

Вызываемые токи через ASIC-каналы являются Na-селективными с Na^+/K^+ коэффициентом проницаемости ~ 10 . Значение $\text{pH}_{50} \sim 6.5$ было измерено для каналов ASIC1a и ASIC3. Это говорит о том, что данные каналы активируются при значениях ниже $\text{pH} \sim 7$. ASIC1b имеет величину $\text{pH}_{50} \sim 6.1$, в то время как, ASIC2a требует более высокую концентрацию протонов для активации ($\text{pH}_{50} \sim 4.5$) (Схема 27, В) [101]. Если

ASIC-каналы подвергаются воздействию умеренно кислого pH, то они могут десенсibilизировать без видимого открытия, таким образом, переходя непосредственно из закрытого в десенсibilизированное состояние [120]. Данный процесс, аналогичный закрытому состоянию инактивированных потенциал-зависимых натриевых каналов, называется стационарной десенситизацией (SSD, steady-state desensitization). Активность ASIC-каналов также модулируется pH внутриклеточной среды. Было показано, что амплитуда ASIC-токов культивированных кортикальных нейронов снижалась путем внутриклеточного подкисления вследствие щелочного сдвига зависимости SSD и кислотного сдвига зависимости активации от pH [123].

2.6.2 Регуляция ASICs ионных каналов

Активность ASIC-каналов регулируется большим количеством модуляторов, таких как Ca^{2+} , Zn^{2+} , окислительно-восстановительные реагенты, нейропептиды, свободные радикалы, разнообразные низкомолекулярные компоненты, киназы и протеазы [100] и прочее. Далее рассмотрим каждый из разных групп модуляторов подробнее.

Дивалентные и поливалентные катионы

Внеклеточная концентрация Ca^{2+} влияет на pH-зависимость ASICs, так как происходит конкуренция между Ca^{2+} и H^+ за общий сайт связывания. Было показано, что увеличение концентрации Ca^{2+} в диапазоне от низких микромолярных значений до 10 mM сдвигает pH чувствительность активации ASIC1a и ASIC3 до более кислых значений pH [126]. Подобный эффект также наблюдался в присутствии других ди- и поливалентных катионов, таких как Mg^{2+} , Ba^{2+} и спермин. В дополнении к влиянию на процесс открытия каналов внеклеточная концентрация ионов Ca^{2+} также ингибирует максимальные значения тока путем блокирования поры при IC_{50} порядка миллимоль. В зависимости от pH условий увеличение концентрации Ca^{2+} может также или увеличивать амплитуду тока вследствие кислотного сдвига pH чувствительности SSD, или уменьшать ее вследствие сдвига pH чувствительности активации и блокирования поры [127].

Каналы ASIC1a могут ингибироваться наномолярной концентрацией Zn^{2+} , в то время как микромолярные концентрации ингибируют ASIC1b и ASIC3. Ингибирование ASIC1b и ASIC3 является pH-независимым, однако в случае активации канала ASIC1a при кислотном сдвиге pH присутствие Zn^{2+} способствует его ингибированию. Также модулирующее действие на ASIC каналы оказывает Cu^{2+} , уменьшая амплитуду токов ASICs и замедляя процесс десенситизации [128]. Gd^{3+} ингибирует быструю и медленную компоненты токов в ASIC3 и гетеромерных ASIC2a каналах [129].

Пептиды

FMRF-амиды (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) и подобные по структуре пептиды в избытке встречаются в нервной системе беспозвоночных, где они функционируют как нейротрансмиттеры и модуляторы. Подобные эндогенные пептиды также найдены в млекопитающих, и большую часть своих эффектов проявляют путем связывания с G-белковыми рецепторами. Данные пептиды способны модулировать активность ASIC1 и ASIC3, но никак не влияют на функционирование ASIC2. FMRF амиды модулируют активность ASICs напрямую, хотя точный сайт связывания до сих пор неизвестен [101].

К модулирующим пептидам также относят токсины из ядов: мамбалгины, пептид APETx2, PcTx1 и MitTx [130-133]. Динорфины и короткие RF-амидные пептиды сдвигают рН зависимость стационарной десенситизации до более кислых значений. RF-амиды также замедляют кинетику десенситизации и индуцируют медленную компоненту тока в некоторых ASICs [134]. Токсин MitTx, выделенный из яда змеи *Micrurus tener tener*, является агонистом ASIC каналов, в то время как PcTx1 и APETx2 ингибируют соответственно ASIC1a и ASIC3 каналы [109].

Низкомолекулярные компоненты

Низкомолекулярные соединения, участвующие в регуляции ASIC-каналов, представлены молекулами, принадлежащими к различным классам химических соединений, от относительно простых пирозинов и полифенольных кислот до более сложных гликозидов и хинолиновых алкалоидов [135]. Большинство этих лигандов были выделены из растительных источников, которые хорошо известны своими медицинскими свойствами и используются в народной медицине разных народов. Ввиду того, что исследуемое в данной диссертационной работе соединение севанол проявило ингибирующий эффект на ASIC-каналах, для более подробного понимания механизма лиганд-рецепторного взаимодействия, а также изучения потенциальной биологической активности этого лиганда стоит более подробнотрассмотреть представителей класса низкомолекулярных компонентов, способных к регуляции исследуемых ASIC каналов.

Амилорид является первым описанным соединением класса низкомолекулярных компонентов, ингибирующим ионные токи, проводимые ASIC-каналами, кроме того он представляет собой неспецифический блокатор ASICs ввиду демонстрации диуретической активности (схема 28) [93, 120, 136]. Однако постоянная компонента тока ASIC3 не чувствительна к действию амилорида [137]. Производные амилорида, такие как бензамил (бензиламилорид) и 5-(N-этил-N-изопропил)амилорид также являются низкоселективными обратимыми блокаторами ASIC-каналов. Аминокислоты, которые вероятно участвуют в блокировании амилоридом, локализованы во втором трансмембранном домене на внеклеточной стороне канала (схема 25) [138, 139]. В 2014 году было показано, что амилорид частично закупоривает пору куриного канала ASIC1a во внеклеточном преддверии, блокируя ионную проводимость за счет внедрения амидиногруппы в пору [140]. Также описано, что при высоких концентрациях амилорид проявляет дополнительный парадоксальный усиливающий эффект, способен открывать гомомерные ASIC3 каналы (EC_{50} 560 мкМ) и при

нейтральном pH синергетически усиливать активацию гетеромерных ASIC3/ASIC1b каналов. Также он способен вызывать ацидоз [137, 141, 93, 142]. Было показано, что этот активирующий эффект в противоположность ингибирующему эффекту полностью зависит от целостности домена, не воспринимающего протонный лиганд, присутствующий в канале ASIC3 [141]. Однако после ко-кристаллизации в кислотном кармане куриного ASIC1a канала были обнаружены две молекулы амилорида, что предполагает связывание амилорида с кислотным карманом и обоснование проявления им такого парадоксального активирующего эффекта [140].

Неохлорогеновая кислота (5-CQA) является фенольным соединением, представляющим собой сложный эфир, полученный конденсацией карбоксильной группы транс-кофейной кислоты с 5-гидрокси группой хинной кислоты (схема 28). На нейронах спинномозгового ганглия (DRG нейроны) крысы было продемонстрировано, что 5-CQA зависит от концентрации и обратимо ингибирует pH 5.5-индуцированный ток с IC_{50} 0.235 мкМ. Данное соединение также снижает чувствительность нейронов к различным активирующим значениям pH, не изменяя параметры pH_{50} и коэффициента Хилла (n_H) на кривой зависимости активации от pH. Местное введение 5-CQA в дозах 1 и 10 мкМ ослабляет боль, вызванную интраплантарным введением 20 мкл уксусной кислоты [143].

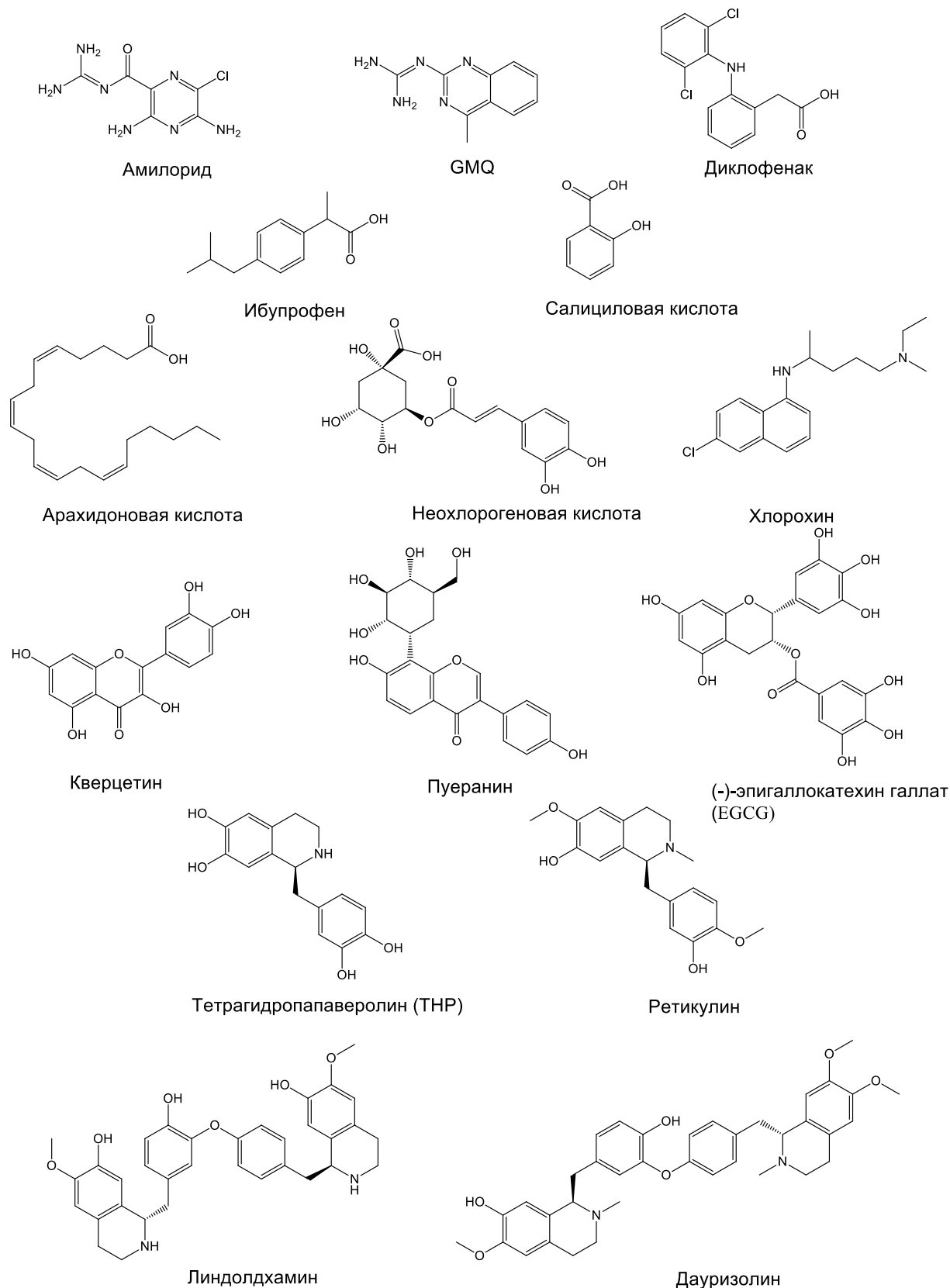


Схема 28. Химическая структура основных представителей низкомолекулярных модуляторов ASIC ионных каналов.

Хлорохин является противомаларийным препаратом из группы производных 4-аминохинолина, который первоначально был выделен из экстракта коры хинного дерева (схема 28). На ганглионарных нейронах сетчатки и на клетках СНО, экспрессирующих ASIC1a, было показано, что доза хлорохина обратимо ингибирует амплитуду тока, индуцированного рН 6,5 (IC_{50} 615,9 мкМ), а также вызывает значительную задержку в максимуме пика и в константе времени десенситизации [144]. На клетках СНО, экспрессирующих каналы ASIC3, и на DRG нейронах было показано, что хлорохин потенцирует медленную компоненту (EC_{50} 425,2 мкМ и pH 3,676), не влияя на быструю компоненту тока, активированного протонами. Используя сайт-направленный мутагенез, было продемонстрировано, что хлорохин может активировать каналы ASIC3, связываясь с непротонным лигандным сенсором в области «ладонь» [137].

Также в 2001 году в публикации Войлли с соавторами впервые была показана активность *НПВС* в качестве ингибиторов ASIC каналов [145-146]. НПВС подавляют действие циклооксигеназы, тем самым сокращая синтез простагландинов, арахидоновой кислоты и тромбксана, отвечающих за воспалительные процессы и ноцицепцию в живом организме. Было показано, что аспирин и салициловая кислота влияют на активность исключительно ASIC3 и никак не воздействуют на гомомерные каналы ASIC1a, ASIC1b и ASIC2: салициловая кислота способна ингибировать ток через каналы ASIC3, экспрессируемые в клетках COS с IC_{50} 260 мкМ, а также ток через гетеромерный ASIC3/ASIC2b в концентрации 500 мкМ [146]. Диклофенак замедляет процесс восстановления после стадии десенситизации, ингибирует гетеромерные ASIC1a/ASIC2a рецепторы и подавляет только медленную компоненту тока в ASIC3. Ибупрофен также проявлял ингибирующий эффект, но более слабый в сравнении с диклофенаком. И диклофенак, и ибупрофен ингибируют ASICs аллостерически, уменьшая максимальный ток, индуцированный протонами, и замедляют десенситизацию. Ранее было показано, что воспалительные процессы способствуют экспрессии ASIC-каналов [146]. Таким образом, НПВС могут предотвращать усиленную экспрессию ASICs в афферентных нейронах. В то время как ASIC1a ингибируется флурбипрофеном и ибупрофеном (IC_{50} 350 мкМ), быстрая компонента тока ASIC3 канала блокируется салициловой кислотой, аспирином и диклофенаком (IC_{50} 90 - 260 мкМ). Также было показано, что диклофенак (IC_{50} 500 мкМ) частично способен ингибировать ASIC2a каналы и гетеромерные ASIC1a/ASIC2a каналы. Путем аллостерического игибирования НПВС могут замедлять восстановление после

инактивации ASIC-каналов. Кроме того, не было обнаружено конкуренции между амилоридом и диклофенаком [145]. Ванг с соавторами в 2012 году опубликовали исследование, демонстрирующее, что НПВС способны ингибировать токи ASIC-каналов в культивированных нейронах мозга, тем самым уменьшая деполяризацию мембран, вызванную ацидозом. Данные результаты могут указывать на то, что для ингибирования ASIC-каналов центральной нервной системы могут потребоваться высокие дозы аспирина и салициловой кислоты в терапевтическом диапазоне [147].

В процессе воспалительной реакции и ишемии отмечено возрастание концентрации *арахидоновой кислоты* (АК), которая является ключевым воспалительным интермедиатом. АК представляет собой метаболит мембранных фосфолипидов, продуцируемый фосфолипазой А₂ (PLA₂) [148] (схема 28). Было показано, что в результате регуляции каналов АК происходит увеличение как быстрой, так и медленной компоненты тока ASICs [149]. Таким образом, АК усиливает активацию ASIC ионных каналов. Аминогликозиды, представляющие группу антибиотиков, наоборот обратимо уменьшают амплитуду ASIC-каналов и замедляют процесс десенситизации [150].

Также к низкомолекулярным компонентам, регулирующим ионные каналы ASIC, относят *GMQ* (схема 28). 2-гуанидин-4-метилквинолин (GMQ) активирует ASIC3 каналы при нейтральных значениях pH и вызывает при этом болевое ощущение, связанные с активацией афферентных нейронов [151]. Также было отмечено, что GMQ оказывает ингибирующее действие на ASIC1a, ASIC1b и ASIC2a.

Среди описанных низкомолекулярных компонентов, модулирующих активность ASIC-каналов, стоит так же отметить такие соединения как *линдолдхамин* (LIN), *тетрагидропаверолин* (ТНР), *дауризорин* (DAU) и *ретикулин* (схема 28). Линдолдхамин действует как агонист и положительный аллостерический регулятор hASIC3 и rASIC3 в широком диапазоне pH чувствительности. В том числе при pH > 7.4, когда протонная активация полностью отсутствует [152]. Еще одним представителем бисбензилизохинолиновой группы алкалоидов является дауризорин. Данное соединение отличается от LIN наличием дополнительных трех метильных групп. DAU оказывает потенцирующее влияние на токи ASIC1a, индуцированные pH 5.5, вызывая появление второй компоненты (EC₅₀~20мкМ). Также было показано, что DAU ингибирует SSD при EC₅₀~140 мкМ и n_H ~ 0.8. В результате DAU вызывает кислотный сдвиг как для кривой зависимости активации pH, так и для кривой SSD [153].

Ретикулин и тетрагидропапаверолин также активируют ASIC3 каналы при рН покоя ($\text{pH} \geq 7.4$). В дополнение к этому ТНР демонстрирует потенцирующий эффект при рН 5.5 в hASIC3 (ASIC3 человека) [153]. Оба соединения найдены в нервной системе млекопитающих, где они считаются важными прекурсорами в синтезе эндогенного морфина, который обладает анальгетическим эффектом. Ретикулин отличается от ТНР на три метильные группы и демонстрирует антиагрегатную активность. Также ретикулин вызывает периферическую вазодилатацию путем уменьшения амплитуды тока потенциал-чувствительных Ca^{2+} каналов L-типа [155]. Тетрагидропапаверолин, также известный как норлауданозолин, ингибирует митохондриальное дыхание, увеличивает выработку активных форм кислорода и уменьшает биосинтез допамина путем ингибирования тирозин гидроксилазы [156].

Из известных лигнанов, выделенных из растительных источников, стоит отметить (-)-эпигаллокатехин галлат (EGCG), который представляет собой сложный эфир эпигаллокатехина и галловой кислоты и был выделен из экстракта зеленого чая (схема 28). EGCG проявляет антиоксидантную активность, а также способность к индуцированию апоптоза и ингибированию роста раковых клеток различного вида [155, 156]. На клетках CHO, экспрессирующих различные изоформы ASIC, было показано, что EGCG дозозависимо и обратимо ингибирует амплитуду индуцированного рН 5.0 тока мышинового ASIC3 с IC_{50} 13 мкМ [157]. Следует отметить, что специфичность действия была проверена на изоформах, принадлежащих к различным видам, а именно ASIC1a человека, ASIC1b крысы и 2a и ASIC3 мыши. Таким образом, остается открытым вопрос о видовой специфичности действия EGCG. Исследование структурно-активной зависимости показало, что присутствие галлатной части, наличие 3-гидроксильной группы в пирогаллольной части и хиральность пирогаллольной части играют важную роль в активности молекулы [157].

К полифенольным соединениям, являющимися регуляторами ASIC, также относятся такие молекулы, как *кверцетин* и *пуэрарин* (схема 28). Кверцетин представляет собой пентагидроксифлавоноид и часто встречается в многих видах овощей и фруктов. Он обладает противовоспалительной, противоопухолевой, антибактериальной и противовирусной активностью [158]. На CHO клетках, экспрессирующих различные изоформы ASIC, кверцетин показал способность к ингибированию рН индуцированных токов с IC_{50} 2.4, 1.3 и 1.8 мкМ для ASIC1a, ASIC2a и ASIC3, соответственно [159]. Пуэрарин является флавоноидом, состоящим из гликозильной и гидрокиизофлавоноидной частей, встречается в бобовых растениях вида *Pueraria lobate*. Данное соединение

обладает противовоспалительной, анальгетической, нейропротективной, противоопухолевой и анти-оксидантной активностью [160]. Исследования на клетках гиппокампа крыс, а также на клетках СНО, экспрессирующих ASIC1a, показали, что пуэрарин обладает ингибирующим эффектом при значениях IC_{50} и pH 38.4 мкМ и 5.97 (клетки гиппокампа), а также 9.31 мкМ и 8.18 (клетки СНО). Кроме того, в присутствии пуэрарина наблюдалось ускорение десенсibilизации в обеих системах. Все вышперечисленное может объяснять цитопротекторный эффект, который пуэрарин (100 мкМ) проявлял на нейронах гиппокампа, снижая их смертность при воздействии кислого (pH 6.0) раствора [161].

Эндогенные ферменты.

Инсульт, черепно-мозговая травма и другие патологические состояния могут поставить под угрозу целостность гематоэнцефалического барьера и позволить протеазам из крови получить доступ к ЦНС [154]. Сериновые протеазы модулируют функцию различных ионных каналов, в том числе ASIC-каналов [162]. Трипсиновые и прочие сериновые протеазы сдвигают pH чувствительность стационарной десенситизации и активацию ASIC1a каналов к более кислым значениям. Это приводит к снижению ответа ASIC-каналов в физиологических значениях pH , однако увеличивает амплитуду токов в случаях снижения pH до слабокислых значений, например, при ишемии.

Активатор протеинкиназы C (PKC) 1-олеоил-2-ацетил-Sn-глицерол потенцирует токи ASIC2a только в присутствии белка, взаимодействующего с C-киназой 1 (PICK1). В ASIC1a, -2a и 2b были обнаружены сайты связывания с PICK1 [163]. Форбол, активирующий PKC, усиливает токи каналов ASIC2b/3 путем индуцирования сдвига pH чувствительности активации [164]. Для такого эффекта, который включает в себя фосфорилирование остатков ASIC3, требуется присутствие PICK1 и его сайта связывания на конце ASIC2b C. Базальная экспрессия ASIC3 в сенсорных нейронах зависит от активации нейротрофического рецептора тирозинкиназы типа 1 нейрональным ростовым фактором (НРФ), что, в свою очередь, приводит к активации пути фосфолипазы C / PKC [165]. В отличие от ASIC2, ASIC1a фосфолируется протеинкиназой A, а не протеинкиназой C [167].

В таблице 4 представлены описанные на данный момент регуляторы ASIC ионных каналов с указанием их эффекта модуляции и местом их действия [101].

Таблица 4. Регуляторы ASICs каналов и их физиологическая активность.

Класс	Пример	Эффект	Место действия	ссылка
Дивалентные катионы	Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Mg ²⁺	Сдвиг pH чувствительности активации и SSD к более кислым значениям, блокировка пор	Не известно для сдвига pH чувствительности, блокировка пор происходит на кислотных остатках в ASIC1a	[126-127]
	Zn ²⁺	Ингибирует ASIC1a, ASIC1b, ASIC3	Сайт ингибирования в домене "палец" ASIC1a	[168]
	Zn ²⁺	Активирует ASIC2-содержащие каналы	Сайт потенцирования в домене "палец" и "большой палец" ASIC2a	[169]
Полиамины	Спермин	Сдвиг pH чувствительности активации и SSD к более кислым значениям, усиление токов	Внеклеточное	[126], [170]
	Агматин	Активирует ASIC3 каналы	Домен "кисть"	[170]
Окислительные реагенты и свободные радикалы	H ₂ O ₂ , дитиотреито, NO	Усиливает токи путем восстановления, ингибирование ASIC каналов путем окисления	NO действует внеклеточно	[171-173]
Нейропептиды	FMRF-амиды, динорфины	Сдвиг pH чувствительности активации и SSD к более кислым значениям, усиление токов. Замедление кинетики десенситизации, индуцирование медленной компоненты тока. Исследован эффект только в ASIC1 и ASIC3.	Внеклеточное	[130], [134]
	MitTx1	Агонист ASIC каналов	Не известно	[109]

	РСТх1, АРЕТх2	Ингибирует ASIC1a и ASIC3	Домен "большой палец", "кислотный карман"	[109]
Регуляция белковыми взаимодействиями	Серотонин, агонисты каннабиондных рецепторов	Потенцирование или ингибирование, в зависимости от конкретного соединения	Действие через белок-белковое взаимодействие или напрямую ASICs	[174]
Протеазы	Трипсин, тканевый калликреин	Сдвиг pH чувствительности активации и SSD к более кислым значения в ASIC1a	Домен "палец" для трипсина	[162]
Киназы	РКА, РКС	Влияет на экспрессию и функционирование ASIC каналов	Внутриклеточный сайт фосфолирования	[164-165], [166]
Низкомолекулярные компоненты	Арахидоновая кислота	Усиление быстрой и медленной компоненты тока	Не известно	[149]
	НПВС	Ингибиторы ASIC каналов	Не известно	[146]
	Амилорид	Ингибирование токов, неспецифический блокатор ASIC каналов	Не известно	[138]
	Линдолдхамин	Активирует ASIC3 каналы	Не известно	[153]
	Тетрагидропаверолин, ретикулин	Активирует ASIC3 каналы при pH 7.8	Не известно	[153]

2.6.3 Физиологическая и патофизиологическая роли ASIC-каналов

Было показано, что в зависимости от области мозга ASIC-каналы промотируют или ингибируют синаптическую пластичность, а также оказывают влияние на процессы обучения и памяти. В виду того, что ASIC1a каналы частично экспрессируются в миндалевидном теле, была исследована их роль в поведенческих реакциях, связанных с чувством тревоги. Было показано, что ингибирование ASIC1a приводит к снижению тревожной активности у грызунов, тогда как чрезмерная экспрессия этих каналов приводила к росту чувства тревоги [175-176].

ASIC-каналы оказывают также существенный вклад как в механочувствительность, так и хемочувствительность. Нарушение экспрессии различных ASICs приводило к дефектам механотрансдукции в таких органах, как кожа, желудок, толстая кишка, внутреннее ухо, а также в артериальных барорецепторов [177]. В исследованиях также было показано участие ASIC3 каналов в процессах слухового восприятия и в восприятии осмотического давления [178-179]. Кроме того, было показано, что удаление гена, кодирующего ASIC, или его ингибирование демонстрировало защитный эффект в ряду нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и рассеянный склероз [103].

Роль ASIC-каналов как основного детектора боли, спровоцированной кислотными факторами, подтверждается следующими доказательствами:

- ASIC-каналы экспрессируются в периферических сенсорных нейронах, а также в ноцицептивных путях позвоночника (например, в заднем роге спинного мозга);
- гомомерные и гетеромерные ASICs расположены таким образом, что способны детектировать дифференциацию pH значений как в физиологическом, так и в патофизиологическом диапазонах;
- ингибирование ASIC-каналов приводит к уменьшению боли при болевых синдромах, как у животных, так и у людей.

Таким образом, локация и свойства ASIC ионных каналов говорят о том, что они принимают непосредственное участие в ноцицепции, восприятии болевых ощущений на физиологическом уровне. В настоящее время хорошо известно, что pH внеклеточной среды становится ниже семи при воспалениях, инфекциях, ишемии, гематомах и физической нагрузке [124]. Более того, такой ацидоз активирует ноцицепторы и вызывает боль у людей, которая может быть ослаблена ингибиторами DEG/ENaC. Недавнее исследование на крысах также позволяет предположить, что периферические ионные каналы ASIC3 являются важными сенсорами кожной кислотной боли как при

нормальных, так и при воспалительных состояниях [172]. Известно, что воспаление вызывает заметное увеличение экспрессии ASICs в первичных сенсорных нейронах. Уровень мРНК ASIC3 каналов увеличивается в 15 раз при воспалении, вызванном адьювантом Фрейнда (CFA) [140].

Также было изучено участие ASIC-каналов при воспалении, связанном с мышечной и суставной болью [180-185]. Экспрессия ASIC3 каналов возрастает в моделях мышечной и суставной боли с остеоартрозом, таким образом подтверждая идею использования ASIC3 каналов в качестве потенциальной мишени в борьбе с артритами [185].

Хроническую боль можно разделить на две категории: воспалительная и невропатическая. Воспалительная боль инициируется воспалением, связанным с повреждением ткани. Невропатическая боль определяется как боль, возникающая как прямое последствие поражения или заболевания, затрагивающего соматосенсорную систему. ASIC-каналы играют важную роль в болевом ощущении не только с точки зрения их периферической ноцицептивной функции, но также и их участия в развитии центральной сенситизации и болевой гиперчувствительности. Гомомерные ионные каналы ASIC1a активно экспрессируются нейронами спинного мозга. Их экспрессия усиливается при периферическом воспалении. Блокирование ионных каналов путем ингибирования или подавления их экспрессии заметно ослабляет термическую и механическую гиперчувствительность [186-187].

2.7 Заключение

Локальное падение рН детектируется первичными сенсорными нейронами, сигналы которых поступают в ноцицептивные пути центральной нервной системы и вызывают болевые ощущения в организме. Исследования на различных моделях боли показывают, что ASIC ионные каналы функционируют в качестве основных передатчиков боли, вызванной кислотными условиями. Таким образом, можно утверждать, что ASIC ионные каналы являются потенциальной терапевтической мишенью для обезболивающей и противовоспалительной терапии. На данный момент известно достаточно большое количество модуляторов проводимости протон-чувствительных ионных каналов (ASIC). Однако наибольший практический интерес представляют соединения с низкой молекулярной массой, как наиболее простые для введения препараты, так как первоочередная роль ASIC в ЦНС предполагает возможность простого способа введения (проходимость через гематоэнцефалический барьер). Кроме того, к недостаткам уже существующих на рынке противовоспалительных и обезболивающих препаратов относится развитие нежелательных побочных эффектов, привыкание и толерантность к используемому препарату, недостаточная эффективность при особо острых болях. Поиск селективных и высокоэффективных лигандов – ингибиторов канальной проводимости является перспективной и необходимой задачей в фармацевтическом сообществе. В виду того, что лигнаны демонстрируют широкий спектр биологической активности, в том числе способность к ингибированию протон-чувствительных ионных каналов, разработка лабораторных методов синтеза данных соединений является одной из перспективных задач в настоящее время. Изучение механизмов действия синтезируемых лигнанов и оптимизация методов их синтетического получения может внести значительный вклад в создание высокоэффективных лекарственных препаратов, обладающих анальгетическим и противовоспалительным действием.

3. Обсуждение результатов

Основной задачей диссертационной работы являлось получение природного лигнана севанола синтетическим путем, а также синтез его модифицированных производных для дальнейшего изучения вклада определенных функциональных групп в эффект ингибирования протон-чувствительных ионных каналов ASIC различных типов (ASIC1a, ASIC3) (схема 29). Также стало необходимым провести оптимизацию разработанного метода синтеза для наработки достаточного количества субстанции севанола для дальнейших доклинических испытаний будущего перспективного фармакологического препарата.

После проведения тщательного литературного поиска были обозначены основные проблемы, которые необходимо первоначально решить для разработки успешной схемы синтеза дигидронафталиновых лигнанов, к группе которых принадлежит исследуемое соединение (схема 29):

1) необходимо было выбрать ретросинтетический путь получения севанола исходя из присутствующих карбоксильных и гидроксильных групп;

2) необходимо было подобрать подходящие защитные группы для карбоксильных и гидроксильных групп исследуемого лигнана с целью проведения направленного синтеза требуемых интермедиатов;

3) необходимо подобрать наиболее эффективные условия для ключевой стадии димеризации полученных мономеров, в результате которой будет получено требуемое дигидронафталиновое соединение севанола или его производных.

Разработка эффективного метода полного синтеза, и создание с помощью него большого количества севанола и его аналогов позволили провести исследования ингибирующей активности молекул на ASIC1a и ASIC3, а также проследить зависимость ингибирующего эффекта от структуры исследуемых соединений. Кроме того, была детально изучена противовоспалительная и обезболивающая активность севанола и наиболее подходящее введение препарата на животных моделях совместно с коллегами из лаборатории Нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН.

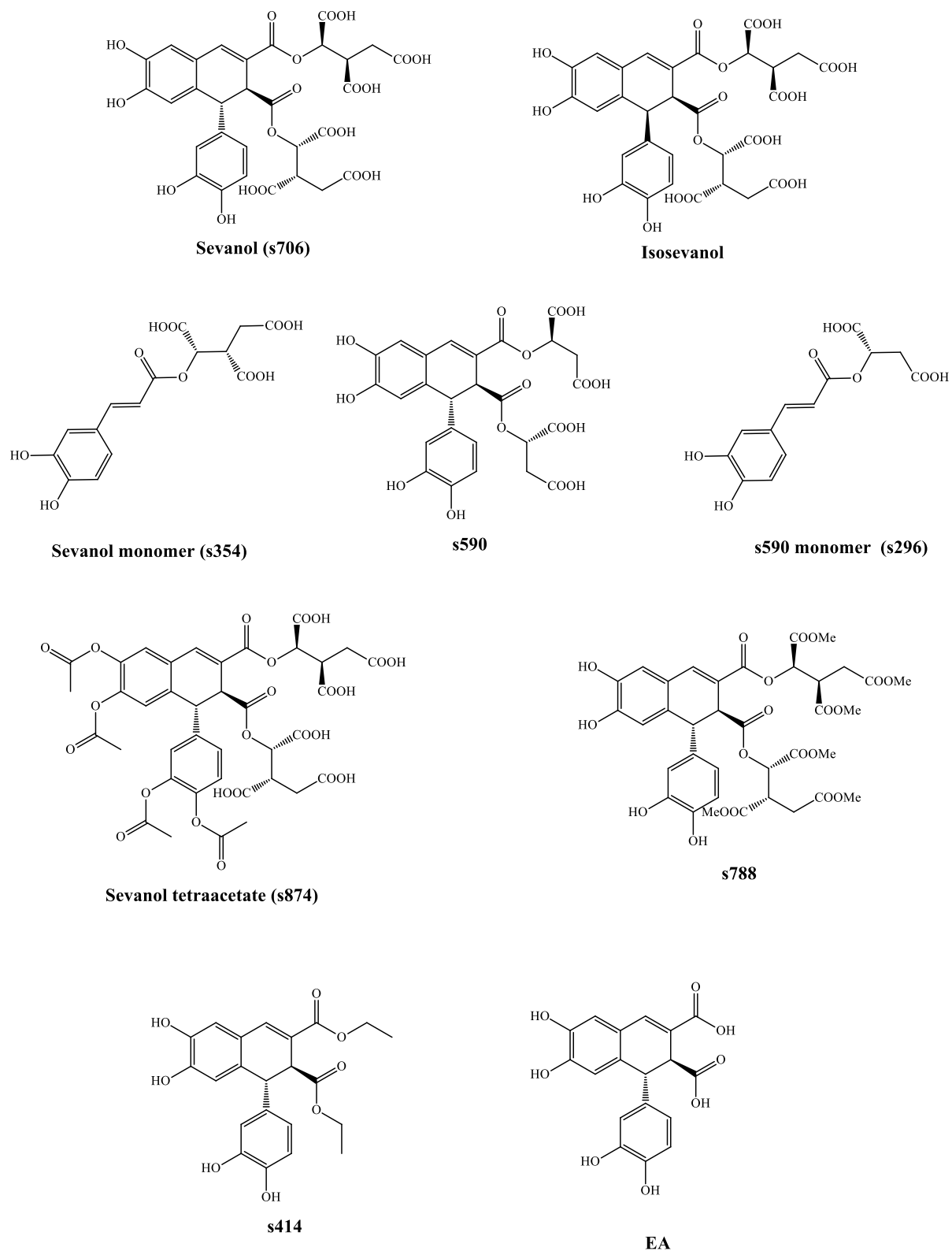


Схема 29. Пространственные структуры севанола и его аналогов, исследуемых в диссертационной работе.

3.1 Синтез синтетического аналога природного лигнана севанол (s706).

Лигнаны формируются в природной среде путем окислительной димеризации разнообразных фенольных производных. Таким образом, стратегия синтеза аналогов подобных природных лигнанов построена, как правило, на использовании в качестве ключевой стадии реакции окислительного сочетания в присутствии таких окислительных реагентов как FeCl_3 , Ag_2O , MnO_2 и прочих. Кроме того, при синтезе ключевых интермедиатов необходимо использовать систему ортогональных защитных групп (PG). Подобная методика позволяет оставлять защищенными определенные функциональные группы исследуемого соединения в условиях удаления других защитных групп. Также не менее важным фактом при синтезе природных соединений является изучение его абсолютной конфигурации, которое может влиять на биологическую активность.

Севанол (s706) формально представляет собой димер кофейной кислоты (1) и относится к дигидронафталиновому классу лигнанов. Исходя из проведенного литературного обзора синтетических методов, применяемых к синтезу подобных соединений, был выбран ретросинтетический путь, который включал последовательно получение третбутилового эфира изолимонной кислоты (3) и соответствующе защищенной кофейной кислоты (4). Далее планировалось провести окислительную димеризацию двух молекул эфира кофейной кислоты в соответствующих условиях последующим снятием защитных групп с карбоксильных частей севанола (Схема 30).

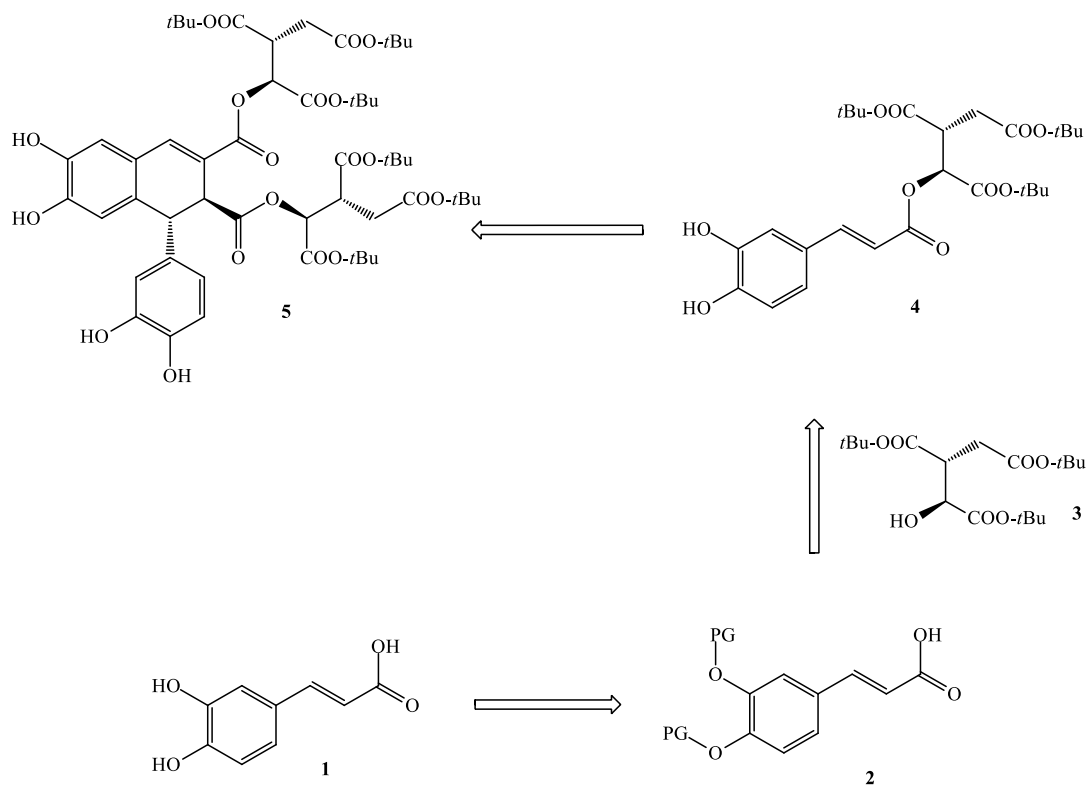


Схема 30. Ретросинтетический путь получения севанола (S706).

3.1.1 Синтез три-третбутилового эфира изолимонной кислоты **3**

Приняв во внимание трудности, с которыми сталкивались исследователи при синтезе подобных сложноэфирных лигнанов, необходимо было провести первичный анализ возможных защитных групп для ключевого интермедиата, представляющего собой трикарбоновую кислоту. Исходя из структуры севанола (**s706**), которая представляет собой дигидронафталиновый скелет с присоединенными к нему по сложноэфирным связям остатками изолимонной кислоты, очевидно, что снятие защитных групп после процедуры окислительной димеризации не должно приводить к гидролизу трикарбоновых кислот или восстановлению двойных связей в ароматической части молекулы. Таким образом, необходимо было избежать щелочных и восстановительных условий снятия защитных групп соединения **5**. В качестве претендентов для защиты гидроксильных групп изолимонной кислоты были выбраны кислото-чувствительные защитные группы. Чтобы избежать разрушения полученного в результате синтеза севанола (**s706**), необходимо было также выбрать такие защитные группы, которые было возможно удалить без сильного нагрева реакционной смеси. После тщательного анализа литературных данных на предмет получения продуктов, содержащих в своем скелете изолимонную часть, было решено, что самой подходящей защитой в данном случае является третбутиловый эфир, который необходимо ввести в молекулу изолимонной кислоты [188-192].

Первоначально для получения одного из ключевых интермедиатов **3** нами за основу была взята методика, опубликованная Ф. Кало с соавторами [191]. Метод синтеза третбутилового эфира изолимонной кислоты **3** состоял из семи последовательных стадий, где исходным соединением выступала природная (L)-яблочная кислота **9** (Схема 31). Общий выход по литературным данным составлял 17%.

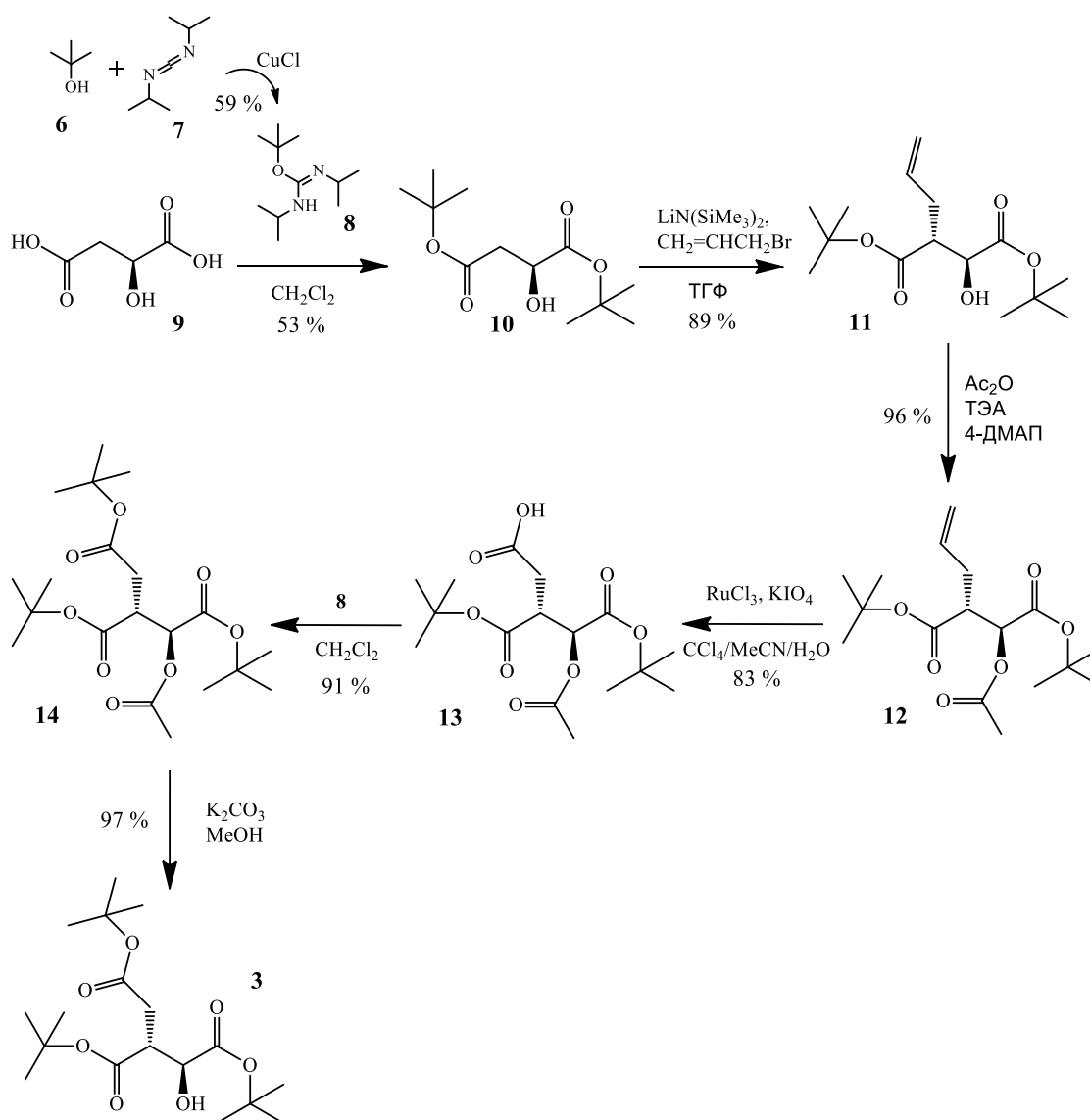


Схема 31. Синтез третбутилового эфира изолимонной кислоты 3 [191].

Первая стадия синтеза третбутилдиизопропилмочевины **8** как вспомогательного реагента для синтетического пути получения **3** проводилась по методу, описанному Амером с соавторами [188]. Продукт **8** был получен с выходом 59%, что соответствовало данным из литературного источника. Было решено модифицировать условия проведения данной стадии таким образом, чтобы увеличить эффективность реакции. Начальные условия реакции остались теми же самыми, но варьировали время проведения реакции. Вместо 24 часов, прописанных в оригинальной методике, было увеличено время проведения реакции при комнатной температуре. С целью оптимизации стадии также был проведен ряд экспериментов, данные которых отображены в таблице 5. Как видно из результатов исследования оптимальные условия достигаются при проведении синтеза в течение 72 часов, что позволяет получать выход

реакции 83%. За 48 часов количество продукта **8** достигало выхода 69%, в то время как за 96 часов выход реакции значительно падал до 45% в результате разложения соединения **8**.

Таблица 5. Подбор оптимального времени проведения реакции для стадии получения соединения **8 (схема 31).**

№ эксперимента, п/п	Условия проведения реакции получения 8	Время проведения реакции, час	Выход, реакции, %
1	CuCl/ <i>t</i> -BuOH	24	59
2	CuCl/ <i>t</i> -BuOH	48	69
3	CuCl/ <i>t</i> -BuOH	72	83
4	CuCl/ <i>t</i> -BuOH	96	45

На следующей стадии взаимодействие полученного продукта **8** с L-яблочной кислотой **9** позволяло получить бистретбутиловый эфир L-яблочной кислоты **10** (схема 31). Проведение данной реакции с использованием литературных условий, дало выход продукта **10** всего в 53%. В связи с этим были внесены изменения в условия проведения реакции. Оказалось, что при снижении температуры до 0 °С (вместо рекомендованных 25 °С) выход соединения **10** увеличивался до 61%, а после увеличения количества третбутилдиизопропил изомочевины **8** в реакции до 5 эквивалентов выход на данной стадии поднялся до 71%. Дальнейшее снижение температуры оказалось нецелесообразно, так как при уменьшении температуры падает скорость реакции, но не растет выход. Таким образом, эксперимент показал, что для достижения более высокого выхода продукта требуется более длительное время и понижение температуры, до 0 °С. Подробнее результаты экспериментального поиска отображены в таблице 6 ниже.

Таблица 6. Подбор оптимальной температуры проведения реакции для стадии получения соединения **10** (схема 31).

№ эксперимента п/п	Количество используемого в реакции соединения 8 , экв.	Температура проведения реакции, °С	Время проведения реакции, час	Выход реакции, %
1	3	25	16	53
2	3	0	16	61
3	5	0	16	71
4	5	-20	48	71

Последующие стадии, описанные в методике Кало с соавторами, протекали без существенных трудностей и не требовали подбора более подходящих условий [191]. Выходы на стадиях алкилирования **10** аллилбромидом ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}$ на схеме 31) и дальнейшего ацилирования соединения **11** составили около 89% и 96% соответственно. Ключевая стадия окисления до соединения **12** с использованием в качестве катализатора RuCl_3 в присутствии 4 эквивалентов KIO_4 и последующая этерификация с соединением **8** протекали с общим выходом на двух стадиях 75% [193]. Гидролиз ацетильной группы соединения **14** с использованием 2 эквивалентов K_2CO_3 в метаноле позволил получить ключевой интермедиат **3** с выходом 97%.

Общий выход соединения **3** при таком методе синтеза не превышал 20%, что могло бы создать препятствия на этапе получения больших количеств севанола (**s706**) для исследования его как перспективного фармацевтического препарата. В связи с этим, было решено оптимизировать существующую методику.

Начальные условия первых двух стадий синтетической ветви получения соединения **3** не удалось существенно улучшить. Однако дальнейшие превращения были заметно модифицированы. Исходя из литературных данных известно, что для бис-третбутиловых эфиров (L)-яблочной кислоты в качестве алкилирующих реагентов также возможно использование самых разных алкилирующих агентов [189, 195]. Этот факт подтолкнул нас к мысли, что использованный ранее аллилбромид может быть заменен на производное галоген-уксусной кислоты, что позволит сразу ввести в

молекулу необходимую карбоксильную функцию. Использование третбутилбромацетата **11** (схема 32) позволило получить молекулу три-третбутилового эфира изолимонной кислоты **3** в одну стадию вместо описанных в методике Кало с соавторами четырех последовательных превращений.

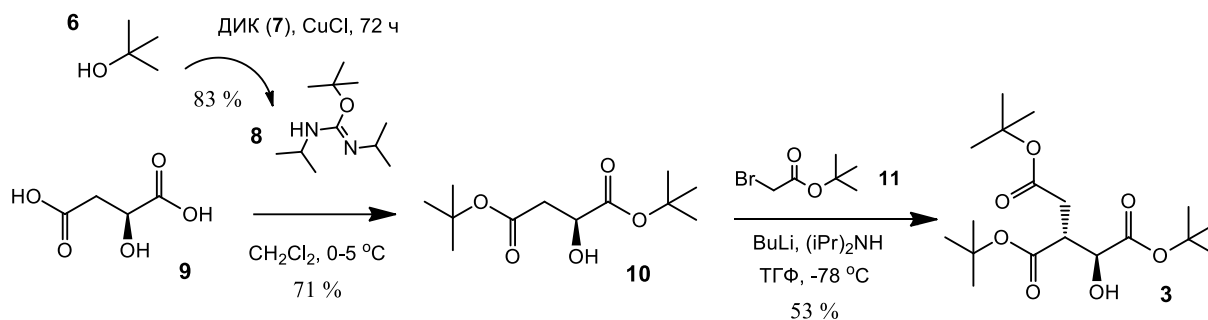


Схема 32. Оптимизированный синтез третбутилового эфира изолимонной кислоты **3**.

Изначально мы попробовали провести реакцию алкилирования с использованием двух эквивалентов LDA и одного эквивалента третбутилбромацетата **11** (схема 32). Проведение данной стадии при $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ позволяет избежать побочной реакции сложноэфирной конденсации, и образующийся анион остается стабильным. Однако при данных условиях выход необходимого спирта **3** оказался достаточно низким и составил 19%. Далее было принято решение увеличить количество металлирующего реагента LDA до 2.5 эквивалентов и количество алкилирующего реагента **11** до 1.5 эквивалентов. Таким образом, нам удалось увеличить выход на данной стадии до 53%. Еще более оптимальными условиями этой реакции стало использование 2.5 эквивалентов алкилирующего реагента и 2.5 эквивалентов металлирующего реагента при низкой температуре $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 часов. В результате проведенных экспериментов нам успешно удалось повысить общий выход три-третбутилового эфира изолимонной кислоты **3** и существенно сократить количество стадий, что повысило эффективность наработки ключевого интермедиата **3**, а в дальнейшем увеличивало общий выход полного синтеза аналога природного севанола (**s706**).

3.1.2 Синтез сложного эфира три-третбутилового эфира изолимонной кислоты и кофейной кислоты **4**

Полный синтез природного лигнана севанола (**s706**) включал в себя получение ключевого интермедиата **4**, который представляет собой сложный эфир производного изолимонной кислоты **3** и кофейной кислоты. Впоследствии именно это соединение подвергалось окислительной димеризации с последующим снятием третбутильных защит в целевую молекулу севанола (**s706**). Согласно проведенному литературному обзору, гидроксильные группы фенольной части второго ключевого интермедиата **4**, представляющего собой производное коричной кислоты, должны быть защищены. В данном случае защитные группы (PG) для гидроксидов также выбирались из принципа ортогональности к третбутиловым эфирам сложного эфира изолимонной кислоты. Такие группы должны были успешно удаляться в таких условиях, чтобы сохранить третбутиловые защиты на изолимонной части перед ключевой стадией окислительного сочетания (схема 30). Кроме того, не менее важно, чтобы снятие защит проходило с достаточно высоким выходом для построения более эффективной стратегии полного синтеза севанола (**s706**).

Исходя из вышеупомянутых соображений и проведенного литературного поиска, в качестве защитных групп первоначально были выбраны силильные и аллильные группы [46, 195]. Подробное использование третбутилдиметилсилильной группы (TBDMS) описано в работе Богуки с соавторами, посвященной полному синтезу (+)-рабдозиина, лигнана со структурой, похожей на структуру изучаемого в данной работе севанола [46]. Для снятия этих защитных групп авторы использовали тетрабутиламмоний фторид (TBAF). Таким образом, исходная кофейная кислота **1** была обработана третбутилдиметилсилил трифлатом в присутствии триэтиламина (ТЭА), что привело к образованию целевого продукта соответствующе защищенной 3,4-дигидроксикоричной кислоты **15** с выходом 71% (схема 33). Получившийся в результате реакции продукт был конвертирован в соответствующий хлорангидрид **15a** и впоследствии в результате конденсации с соединением **3** трансформировался в целевой интермедиат **16a** с общим выходом на обеих стадиях 43%. Хлорангидрид **15a** был получен с использованием 1.5 эквивалентов тионил хлорида (SOCl_2) и толуолом в качестве растворителя. Реакция протекала при кипячении в течение четырех часов. Последующее ацилирование TBDMS-защищенного производного коричной кислоты **15a** было проведено в дихлорметиле (CH_2Cl_2) в присутствии триэтиламина в качестве основания (схема 33). Однако, последующие попытки качественно удалить

силильные группы с использованием различных условий провалились ввиду частичного или полного гидролиза сложного эфира коричной кислоты. Для деблокирования пробовали использовать такие условия как тетрабутиламмоний фторид в ТГФ, тетрабутиламмоний фторид в уксусной кислоте и KF в спиртах.

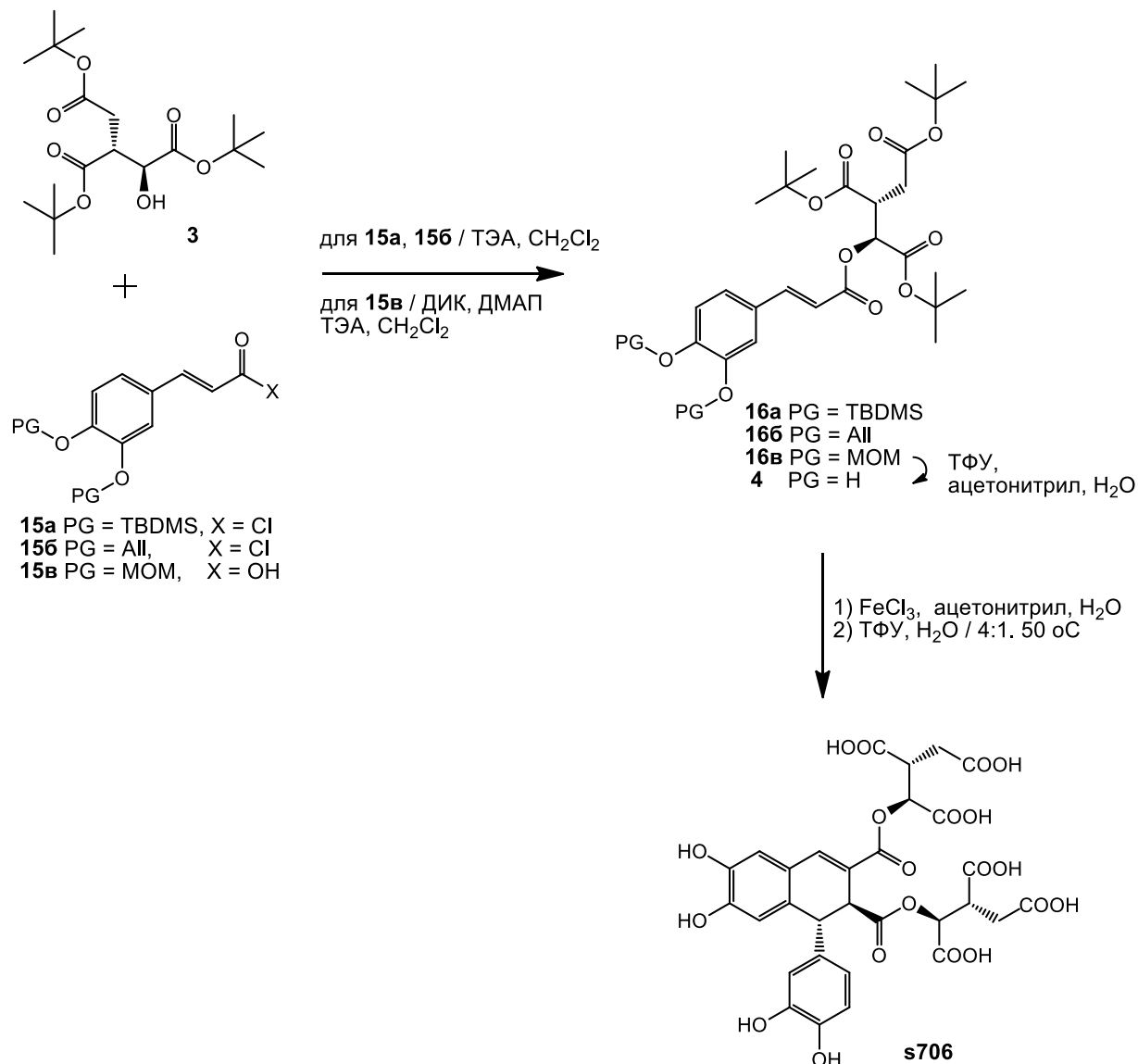


Схема 33. Первичная схема полного синтеза севанола (s706).

Вследствие того, что TBDMS – защитные группы оказались неподходящими, было решено попробовать использовать в качестве защиты гидроксильных групп соединения кофейной кислоты **1** аллильную защиту. Подобный способ был описан в публикации Чарльтона с соавторами при разработке полного синтеза ксантонов, обладающих биологической активностью [196]. Исходная кофейная кислота **1** была обработана аллилбромидом в присутствии K₂CO₃ в качестве основания, и таким образом был получен целевой продукт защищенной кофейной кислоты выходом 31% (схема

33). Далее соединение было трансформировано в хлорангидрид **15б** с использованием тионил хлорида, которые затем последовательно вступал в реакцию конденсации со спиртом **3** с образованием необходимого сложного эфира **16б** с выходом на этой стадии 28%. К сожалению, мы не смогли эффективно удалить защитные аллильные группы ввиду образования большого количества побочных продуктов, а также экстремально низкого выхода на стадии снятия защитных групп. Таким образом, использование аллильных групп с целью защиты гидроксильных групп кофейной кислоты также оказалось нецелесообразным.

Для решения этой проблемы мы попробовали блокирование гидроксильных метоксисметильными группами (МОМ). Применение данного способа потребовало изменить первоначальный подход к синтезу соединения **2**. В качестве исходного соединения выступал 3,4-дигидроксибензальдегид **17**, который изначально подвергался алкилированию в присутствии основания (схема 33). Изначально в качестве основания мы попробовали использовать NaH в диметилформамиде (ДМФ), однако нам не удалось достигнуть приемлемого выхода, поэтому в дальнейшем как основание был выбран K_2CO_3 . Основываясь на методиках, опубликованных в литературе, было решено проводить реакцию алкилирования в ацетоне с 4 эквивалентами K_2CO_3 и 4 эквивалентами метоксиметилхлорида при нагревании в течение 16 часов (схема 33) [197]. В результате реакции был получен 3,4-бис-метоксиметил бензальдегид **18** с выходом 59%. Конденсация соединения **18** с малоновой кислотой **19** в присутствии N-метилпиперидина позволяла получить целевую молекулу **15в** с выходом 90% [198-199].

Изоцитрат кофейной кислоты **16в** был получен в одну стадию путем конденсации третбутильного эфира изолимонной кислоты **3** с синтезированной ранее 3,4-бисметоксисметил защищенной коричной кислотой **15в** в присутствии триэтиламина, диизопропилкарбодиимида (ДИК) и каталитического количества диметиламинопиридина (ДМАП) (схема 34). Методика данной конденсации была основана на оптимизации экспериментального опыта, описанного в работах, опубликованных ранее [200-201]. Таким образом, реакция конденсации протекала в хлористом метиле с использованием 1,3 эквивалента ДИК при охлаждении в ледяной бане в течение 16 часов. Выход на данной стадии получения целевого соединения **16в** составлял 87%.

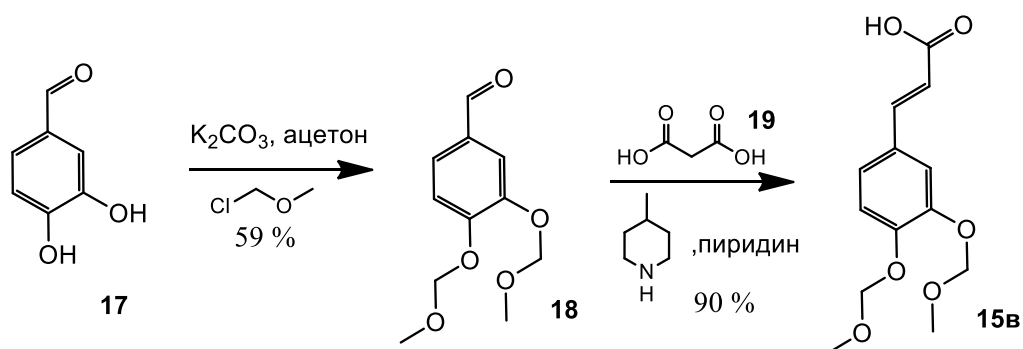


Схема 34. Схема синтеза 3,4-бис-метоксиметил защищенной коричной кислоты **15в**.

Далее мы проводили удаление метоксиметильных групп (МОМ) с молекулы **16в** в смеси ацетонитрил:вода = 4:1 при 50 °С, в присутствии трех эквивалентов трифторуксусной кислоты (ТФУ) (схема 33). Метоксиметильная группа является стандартной защитой различных гетероатомов и удаляется в кислотно-каталитических условиях. Трифторуксусная кислота, на наш взгляд, являлась наиболее подходящей для этих целей, так как она представляет собой кислоту средней силы и не приводит к гидролизу третбутильных эфиров изолимонной кислоты в соединении **4** (схема 33). При проведении реакции при комнатной температуре снятие метоксиметильных защитных групп потребовало достаточно продолжительное время для достижения хорошего выхода 53%, а именно требовалось постоянное перемешивание в течение нескольких дней. Для увеличения скорости реакции и соответственно сокращения ее времени проведения было решено поднять температуру до 50 °С. Таким образом продолжительность синтеза на данной стадии была сокращена до 10 часов. При комнатной температуре стадия деблокирования протекала за 36 часов с тем же выходом 53%. Для удаления метоксиметильных групп требуется присутствие воды. Мы использовали смешанный с водой соразтворитель ацетонитрил (схема 33). Таким образом, целевой интермедиат **4** был получен с выходом 53%. Несмотря на, казалось бы, успешно подобранные защитные группы, позволяющие получить ключевое соединение **4** без побочного гидролиза сложноэфирных связей изолимонной и кофейной кислот, выход оставался невысоким (общий выход составил 25%) и требовал дальнейшей оптимизации и поиска подходящих условий для проведения более эффективного синтеза севанола (**s706**) (схема 33).

Исходя из этого, было продолжено проведение дальнейшей экспериментальной работы по подбору подходящей защиты для гидроксильных групп молекулы кофейной

кислоты **1** (схема 30). В ходе очередного анализа существующих публикаций, посвященных получению аналогов природных лигнанов и неолигнанов было обнаружено, что также могут использоваться и ацетильные защитные группы [202-204]. В качестве исходного материала для такой стратегии была выбрана коммерчески доступная кофейная кислота **1**, которая подвергалась обработке 5 эквивалентами уксусного ангидрида (Ac_2O) в присутствии пиридина в качестве основания при низкой температуре $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (схема 35) в течение 16 часов. Повышение температуры приводило к образованию полимерных продуктов, связанных с самоконденсацией кофейной кислоты **1** по карбоксильной группировке с фенольным атомом кислорода. В результате обработки соляной кислотой и последующей перекристаллизации было успешно получено соединение **20a** с выходом 91%. Далее к бис-ацетил кофейной кислоте **20a**, растворенной в бензоле, прикапывали 1.2 эквивалента тионил хлорида (SOCl_2) и кипятили четыре часа при $100\text{ }^\circ\text{C}$ в присутствии диметилформамида (ДМФ) как катализатора. Полученный в результате этой стадии продукт **20б** был выделен с количественным выходом.

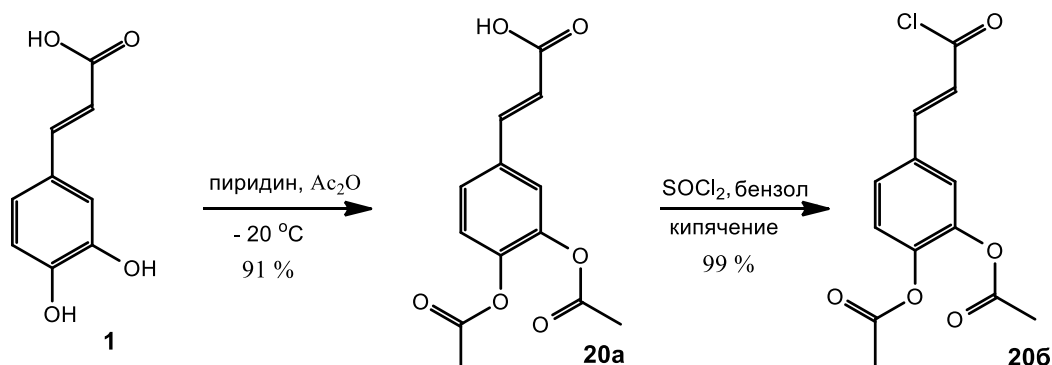


Схема 35. Схема синтеза хлорида 3,4-бисацетил защищенной коричной кислоты **20б.**

Как уже было упомянуто выше, стратегия полного синтеза севанола (**s706**) основана на конденсации двух ключевых интермедиатов **3** и **2** (схема 30). Методика ацилирования соединения **20б** была сохранена, однако в качестве основания мы использовали пиридин. Пиридин является менее основным, чем триэтиламин ввиду делокализации неподеленной электронной пары на азоте. Таким образом, реакция конденсации протекала в более мягких условиях, и выход на данной стадии образования молекулы **21** оказался выше, а именно он составил 84%. Последующее снятие ацетильных защит с соединения **21** было проведено с использованием *N*-метилпиперазина в качестве агента, удаляющего защитные группы, при перемешивании реакционной смеси в ТГФ при охлаждении до $0-5\text{ }^\circ\text{C}$ (схема 36). *N*-

метилпиперазин эффективно гидролизует соответствующе защищенный кофейный изоцитрат **21** и сохраняет третбутильные эфиры на изолимонной части ключевого интермедиата **4**. Выход на данной стадии получения продукта **4** оказался достаточно высоким и составил 96%.

В результате проведенной экспериментальной работы нами были подобраны оптимальные условия синтеза ключевого мономера **4**, представляющего собой сложный эфир три-третбутилового эфира изолимонной кислоты и кофейной кислоты. Кроме того, было проведено качественное исследование по подбору наиболее эффективных защитных групп для гидроксильных групп на фенольной части коричневого производного **2** (схема 30), снятие которых не приводило бы к потере ключевого продукта.

Финальная схема синтеза продукта **4** отражена на схеме 36. Далее требовалось подобрать эффективные условия окислительной димеризации мономера **4** и условия снятия третбутильных защит с изолимонной части с целью трансформации в необходимый дигидронафталиновый лигнан севанола (**s706**). А также провести очистку полученного препарата **s706** до чистоты, необходимой для последующих тестов на биологическую активность.

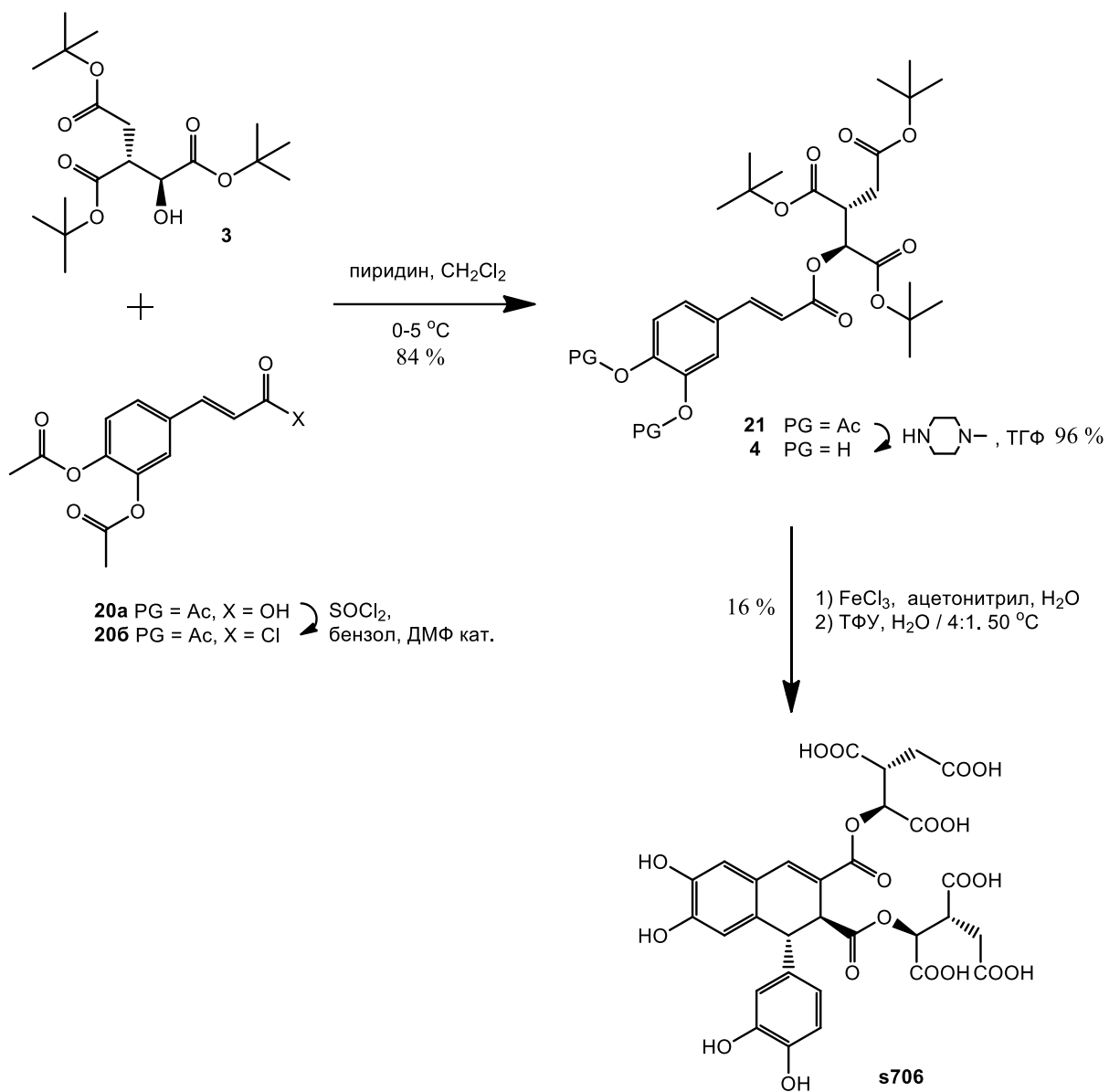


Схема 36. Оптимизированная схема полного синтеза севанола (s706).

3.1.3 Окислительная димеризация три-третбутилового изоцитрата кофейной кислоты **4** как ключевая стадия синтеза севанола

После тщательного анализа проведенного литературного обзора, посвященного исследованию различных подходов к синтезу дигидронафталиновых лигнанов, нами была выбрана стратегия окислительной димеризации. Ввиду существования широкого спектра окислительных агентов потребовалось провести достаточно большое количество экспериментов, чтобы трансформировать мономер **4** в целевое соединение **5**, которое в дальнейшем претерпевало обработку для удаления третбутиловых эфиров с изолимонной части молекулы (схема 30). Также стало необходимым подобрать наиболее приемлемый растворитель и условия протекания реакции окислительного сочетания, которые приводили бы к образованию севанола **5706** с хорошим выходом.

Первоначальные попытки димеризовать изоцитрат кофейной кислоты **4** включали в себя использование в качестве окислительных агентов таких соединений, как $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, $\text{Fe}(\text{acac})_3$, $\text{Pb}(\text{OAc})_4$. Реакция протекала при комнатной температуре в течение двух часов. Несмотря на тот факт, что исходный материал **4** исчезал, конверсия его в целевую дигидронафталиновую молекулу **5** не наблюдалась (схема 30). Анализ реакционной смеси выполнялся при помощи хромато-масс-спектрометрического анализа LCMS. В то время как мы наблюдали полное осмоление реакции в случае использования в качестве окислителей $\text{Fe}(\text{acac})_3$ и $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, при участии в окислительном сочетании $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ был обнаружен лишь продукт димеризации соединения **4** в α -положении, но без необходимой циклизации до ключевого интермедиата **5**. Отсутствие дигидронафталиновой структуры также было подтверждено методами ЯМР-спектроскопии.

Значительная часть литературных данных посвящена проведению окислительной димеризации производных сложных эфиров кофейных кислот в присутствии FeCl_3 [45-46, 205-208]. В связи с этим, следующий подход к подбору оптимальных условий синтеза соединения **5** был построен на основе суммарного экспериментального опыта опубликованных методик. Условия трансформации сложного эфира третбутилового эфира изолимонной кислоты и кофейной кислоты **4** включали в себя использование в качестве окислительного реагента двух эквивалентов хлорида железа (III), в смеси ацетон-вода при комнатной температуре в течение 18 часов. В результате нам удалось обнаружить целевой продукт циклизации **5** в реакционной смеси. Однако общий выход на данной стадии не превышал 2% и указывал на то, что подобранные условия не являются достаточно эффективными. В связи с этим, нами были предприняты

дальнейшие исследования по поиску наиболее эффективных путей синтеза продукта окислительной димеризации соединения **4**. Для этого условия проведения реакции циклизации в присутствии FeCl_3 были модифицированы. После тщательного изучения образовавшихся побочных продуктов была обнаружена проблема формирования хлорированных продуктов реакции. Эта проблема могла бы быть решена путем проведения реакции димеризации при более низкой температуре, в отсутствие доступа света (в темном помещении или непрозрачной посуде) и за более короткое время. Свет является одним из основных факторов, который приводит к побочной реакции образования хлорированных продуктов, так как он является радикальным инициатором хлорирования органических соединений. Реакция окислительной димеризации при температуре $5\text{ }^\circ\text{C}$ проходила в течение двух часов. При повышении температуры до $10\text{ }^\circ\text{C}$ мы наблюдали образование продукта окисления дигидрохинолинового цикла целевой молекулы **5** в хинолиновый. При $0\text{ }^\circ\text{C}$ в результате уменьшения скорости реакции оставалось достаточно большое количество непрореагированного исходного материала **4**, что приводило к более низкому выходу - менее 1%. Таким образом, благодаря снижению температуры и удалению источников света, нам удалось увеличить выход ключевой стадии полного синтеза севанола **s706** до 20%.

Очередное исследование, направленное на повышение эффективности стадии окислительной димеризации ключевого интермедиата **4** включал в себя поиск более подходящего растворителя и оптимального количества окислительного реагента. Основная процедура проведения реакции окислительного сочетания осталась той же, а именно необходимо было прикапывать выбранный окислитель, растворенный в воде, к сложному эфиру **4** в органическом растворителе при температуре $5\text{ }^\circ\text{C}$ и в отсутствие доступа света. Реакционная смесь затем перемешивалась при данных условиях в течение двух часов. Полученные продукты реакции были выделены и проанализированы с помощью хромато-масс-спектрометрии LCMS.

Таблица 7. Влияние растворителя и окислительного реагента на проведение стадии окислительной димеризации изоцитрата кофейной кислоты 4.

Растворитель	Окислительный реагент	Выход, %
ацетон - вода	$K_3[Fe(CN)_6]$ (2 экв)	продукт не обнаружен
ацетон - вода	MnO_2 (2 экв)	продукт не обнаружен
ацетон - вода	$Cu(OAc)_2$ (2 экв)	1.5
ацетон - вода	$FeCl_3$ (2 экв)	20
изопропанол - вода	$FeCl_3$ (2 экв)	продукт не обнаружен
трет-бутанол - вода	$FeCl_3$ (2 экв)	продукт не обнаружен
хлористый метилен - вода	$FeCl_3$ (2 экв)	<1
ТГФ - вода	$FeCl_3$ (2 экв)	продукт не обнаружен
ацетонитрил - вода	$FeCl_3$ (1 экв)	17
ацетонитрил - вода	$FeCl_3$ (2 экв)	32
ацетонитрил - вода	$FeCl_3$ (2.5 экв)	41
ацетонитрил - вода	$FeCl_3$ (3 экв)	10
ацетонитрил - вода	$FeCl_3$ (4 экв)	2

Параллельно с подбором оптимальных условий проведения окислительного сочетания **4** в присутствии хлорида железа (III) нами были проверены также и другие окислительные реагенты, которые встречались при изучении существующих на данный момент публикаций по полному синтезу лигнанов из сложных эфиров кофейных кислот. Нам показался интересным обзор Дакино с соавторами, описывающий методику подбора наиболее эффективного окислителя для полного синтеза арилдигидронафталиновых соединений руфесцидрида и монголикумина [38]. Из публикации стало очевидно, что использование Ag_2O для окислительного сочетания приводит к выходу продукта лигнана менее 1% и первостепенному образованию нелигнановых структур. Таким образом, в качестве окислительных агентов для начальной попытки димеризации сложного эфира кофейной кислоты **4** были выбраны такие соединения, как MnO_2 , $Mn(acac)$ и $KMnO_4$ [40]. Согласно описанным методикам

выход дигидронафталинового продукта ожидался не более 20-25%, однако мы не смогли обнаружить целевого соединения в реакционной смеси после проведения анализа с помощью LC-MS. Также не был обнаружен и исходный материал **4**. Далее на основании публикации Маеды с соавторами, посвященной использованию $K_3[Fe(CN)_6]$ как окислителя для получения продуктов димеризации, мы сделали попытку провести синтез целевого соединения **5** с применением описанной методики [36]. К сожалению, подобные условия реакции также не подходили к выбранной стратегии синтеза севанола **s706**. После перемешивания реакционной смеси в течение двух часов с использованием двух эквивалентов $K_3[Fe(CN)_6]$ необходимый продукт **5** не был обнаружен с использованием аналитического метода LC-MS. Кроме того, был проведен подход к получению целевого соединения **5** с использованием в качестве окислителя $Cu(OAc)_2$ в условиях отсутствия доступа света и низкой температуре 5 °С. В данных условиях удалось выделить продукт реакции **5** с выходом 1,5%, исходный непрореагировавший материал **4**, а также описанный выше продукт димеризации по α – положению в количестве 25%.

Таким образом, в ходе проведенных многочисленных экспериментов было выявлено, что использование $FeCl_3$ в качестве окислителя является оптимальным для синтеза подобного дигидронафталинового лигнана **5**. В остальных случаях происходило образование побочных продуктов, в том числе димеризация в α -положение без необходимой циклизации. Количество окислителя влияло на эффективность реакции. Основные результаты проведенных экспериментов отражены в таблице 7. Нами был проведен подбор необходимого количества хлорида железа (III). При использовании до 2 эквивалентов исходное соединение **4** не до конца конвертировалось в ключевой интермедиат **5**. Исходя из аналитических данных LCMS в реакционной смеси содержалось не более 30% целевого продукта. При попытке введения в реакцию более 3 эквивалентов происходило осмоление реакционной смеси и окисление продукта **5**. Таким образом, экспериментальным путем было установлено, что оптимальное количество $FeCl_3$ составляет 2.5 эквивалента. Кроме того, нами был проведен тщательный подбор используемого растворителя. Так в ходе исследования было выяснено, что использование растворителей, таких как ТГФ или изопропанол, не способствует проведению необходимой реакции. При использовании смеси ацетон-вода, выход на данной стадии составлял не более 20%. Однако при использовании смеси ацетонитрил-вода нам удалось поднять выход до 41% на стадии окислительной димеризации и сократить время ведения реакции до 2 часов. Полученное соединение

представляло собой смесь двух диастереомеров. Важно также отметить, что диастереомеры **5** севанола, защищенные трет-бутиловыми группами, не разделяются на стадии окислительной димеризации. Также было невозможно разделить диастереомеры **5** даже с помощью полупрепаративной системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Таким образом, диастереомерная смесь сложных эфиров **5** была введена на следующую стадию без дополнительной очистки. Обработка 80% водным раствором ТФУ в течение 1 часа при 50 °С позволяла получить неочищенный продукт **s706** со снятой защитой, который по данным ¹H ЯМР-спектроскопии представлял собой смесь двух диастереомеров искомого лигнана **s706** в соотношении 1:3, что было определено путем интегрирования соответствующих сигналов на спектре. Полученное соединение **s706** хроматографировали на колонке с обращенной фазой для полупрепаративной ВЭЖХ, используя ацетонитрил-вода в качестве элюента. В результате нам удалось успешно провести разделение диастереомерных продуктов. Основываясь на сравнении данных ЯМР и значения угла оптического вращения ($[\alpha]_D^{25} = +65$, c1 H₂O), основной диастереомер полностью соответствовал структуре природного севанола **s706** (схема 37). Присутствие и соотношение стереоизомеров после очистки на ВЭЖХ также определяли по ЯМР анализу, показанном на рисунке 38, где отображен опытный образец с диастереомерным соотношением 1:3. Из сравнительного анализа очевидно, что химический сдвиг 4.09 относится к натуральному севанолу, а 4.02 к его изомеру.

Во время поиска оптимальной процедуры окислительного димеризации мы пришли к выводу, что ни изменение растворителя, ни изменение количества окислительного реагента не влияет на диастереомерное соотношение 1:3. Таким образом, изомер, идентичный природному лигнану **s706**, выделенному из тимьяна *Thymus armeniacus*, был получен с выходом 39% из неочищенной смеси после очистки с помощью ВЭЖХ. Так впервые было успешно получено целевое соединение **s706** с общим выходом 8%, представляющее собой природный лигнан севанол (схема 29).

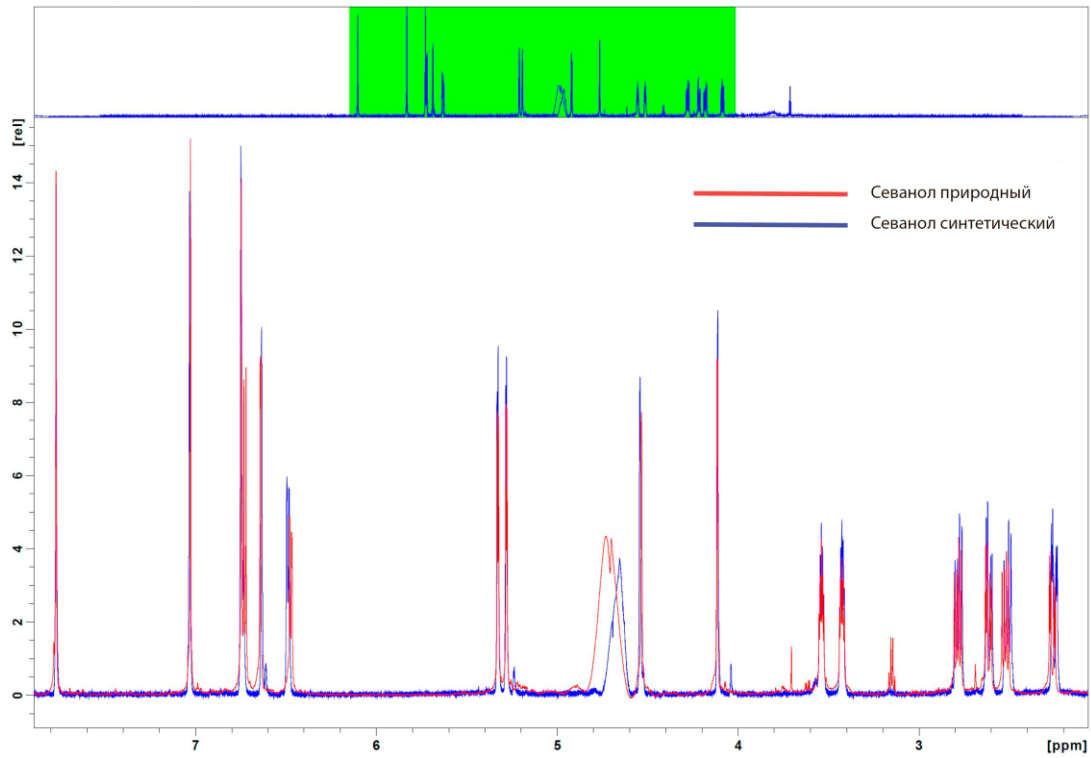


Схема 37. Сравнение химических сдвигов протонов основного диастереомера s706 в ^1H ЯМР спектрах природного севанола (красный) и синтетического аналога севанола (синий). Спектр снят в растворителе D_2O при pH 2.51.

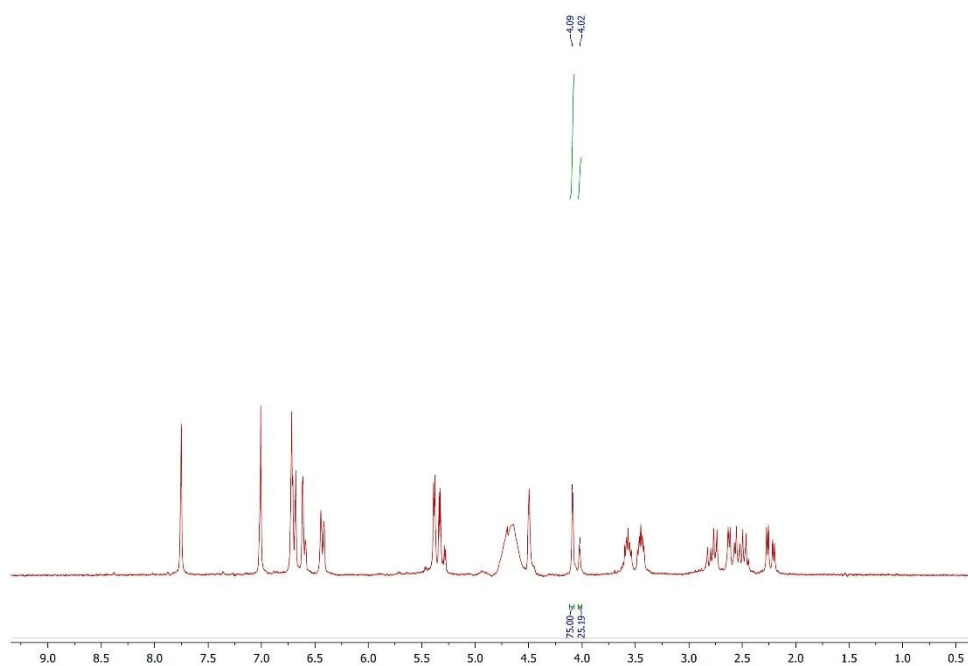


Схема 38. ЯМР спектр образца сравнения с содержанием стереоизомеров 1:3. Химический сдвиг 4.09 соответствует аналогу природного севанола, 4.02 – его диастереомеру.

3.2 Синтез модифицированных по сложноэфирной части аналогов севанола

Замещение атомов или группы атомов в соединениях, обладающих биологической активностью, является одной из основных стратегий разработки эффективных лекарственных препаратов и дизайна в медицинской химии. Для проведения удачных экспериментов в данной методике необходимы такие модификации, которые сохраняли бы активные свойства у новых синтезированных аналогов родительской молекулы. При этом подобные замещения должны провоцировать какие-либо изменения в физико-химических свойствах измененной структуры. Таким способом, как правило, удается проследить корреляцию между строением молекулы и ее активностью. Подобные исследования являются крайне необходимыми для разработки новых фармакологических препаратов, для изучения основных принципов работы изучаемых активных веществ, а также для возможных трансформаций, которые могли бы привести к созданию более активных и перспективных синтетических соединений.

Карбоксильные функциональные группы играют значимую роль как в биохимии живых систем, так и в дизайне новых лекарств. Эти функциональные группы часто встречаются как часть фармакофора самых разнообразных классов терапевтических агентов [209]. Значимость данных групп иллюстрируется тем фактом, что огромная часть уже существующих лекарственных препаратов (более 450 наименований НПВС, антибиотиков, антикоагулянтов и других), содержащих карбоксильную часть в своей структуре, достаточно давно повсеместно используется [210]. Кислотность в сочетании со способностью устанавливать относительно сильные электростатические взаимодействия и водородные связи является причиной того, что именно эта функциональная группа часто является ключевым фактором во взаимодействиях лекарство-мишень. Однако, несмотря на успех препаратов на основе карбоновых кислот, наличие остатка карбоновой кислоты в лекарстве или кандидате может стать проблемой. Например, снижение способности пассивно диффундировать через биологические мембраны может затруднить их попадание в нужную часть организма, особенно в контексте открытия лекарств для центральной нервной системы (ЦНС), где гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) может быть относительно непроницаемым для отрицательно заряженных веществ [211]. Кроме того, встречается метаболическая нестабильность и потенциальная токсичность подобных соединений [212]. Таким образом, чтобы избежать этих и других возможных недостатков, изучение влияния

функциональной группы карбоновой кислоты на проявляемые биологические свойства исследуемого субстрата может представлять собой эффективную стратегию разработки и возможной модификации новых лекарственных препаратов.

Природный лигнан севанол **s706** представляет собой трикарбоновую кислоту (схема 39) [6]. Парентеральное введение севанола **s706** (0.01–10 мг/кг) мышам значительно уменьшает вызванную CFA термическую гипералгезию и количество корчей в тесте на корчи, вызванные уксусной кислотой [152]. Для более тщательного понимания лиганд-рецепторного взаимодействия, а также дальнейшего дизайна перспективного фармацевтического препарата на основе природного лигнана севанола **s706** нами было проведено структурно-функциональное исследование. Основной целью данного исследования являлось изучение корреляции между биологической активностью аналогов соединения **s706** и их структурой, а именно числом свободных карбоксильных групп в молекуле. Кроме того, было необходимо определить сайт связывания севанола в ASIC-каналах для возможных дальнейших модификаций, которые могли бы привести к улучшению его свойств. Соответственно, нами были синтезированы производные севанола (**s354**, **s296**, **s358**) и его аналоги (**Isosevanol**, **s590**, **s414**, **EA**, **s874**, **s788**) (схема 39). Некоторые из аналогов потребовали небольшого изменения в общей методике синтеза.

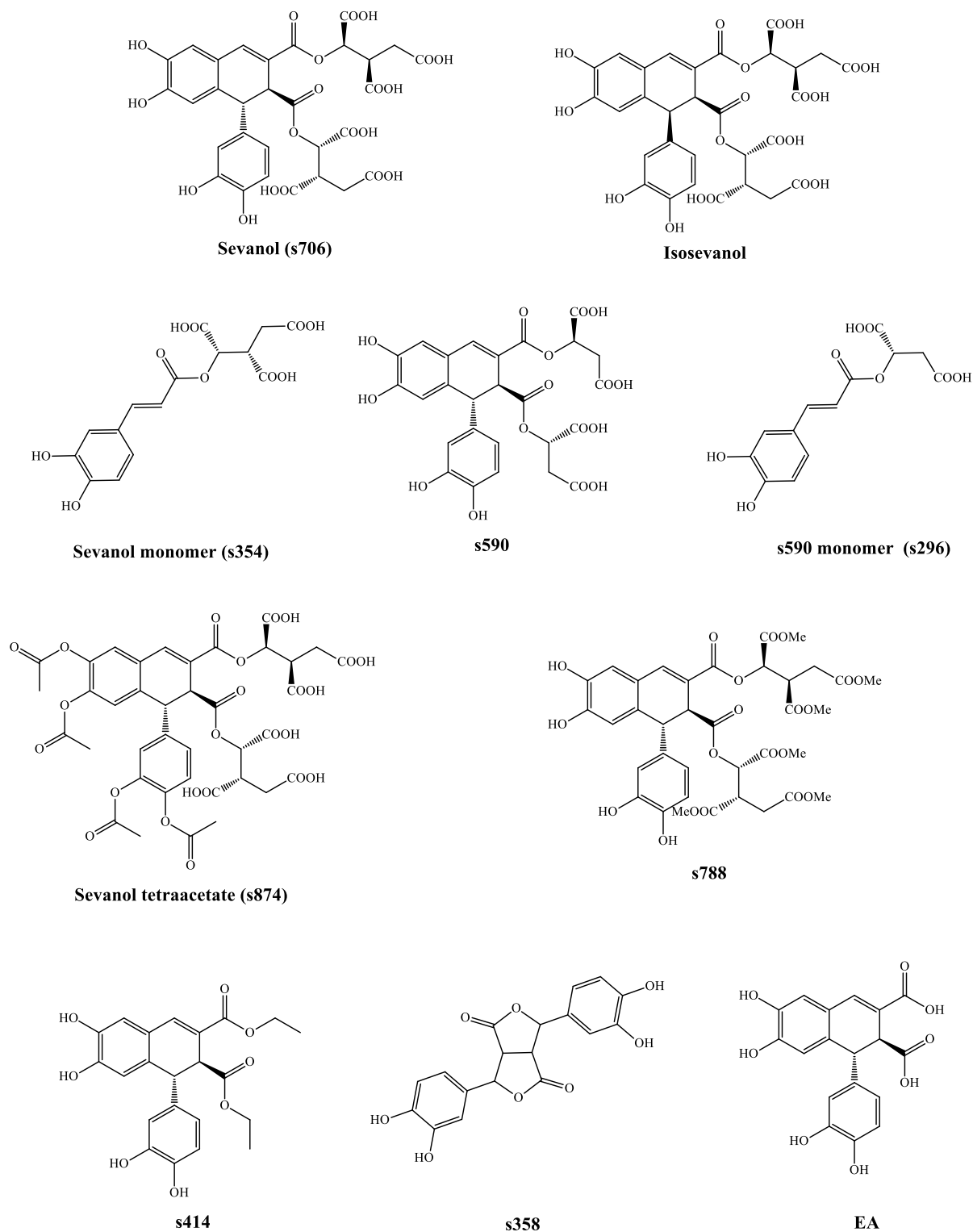


Схема 39. Структуры синтетического севанола и его аналогов, представленные в диссертационной работе.

3.2.1 Синтез аналогов севанола: изосеванол **s706**, **s354**, **s788**, **s874**

В процессе синтеза природных аналогов оптически активных соединений всегда высока вероятность образования энантиомеров и диастереомеров. В то время как в природе биосинтез происходит при участии сложных ферментативных систем, которые приводят к образованию однозначно ориентированных в пространстве молекул, синтетический подход в лаборатории, к сожалению, не всегда может гарантировать высокий выход и направленность используемого метода для получения изомера.

Как было упомянуто выше в разделе, посвященном полному синтезу исследуемого лигнана севанола **s706**, после стадии окислительной димеризации и снятия соответствующих трет-бутиловых защит образуется целевой продукт **s706**, который удается выделить в виде диастереомерной смеси в соотношении 1:3, где 75% составляет диастереомер с соответствующей природному образцу ориентацией в пространстве. Для изучения вклада стереомеризации в биологическую активность структуры севанола, нами был выделен противоположный диастереомер (**Isosevanol**) с использованием обращенной фазы на препаративной системе ВЭЖХ.

Подбор условий разделения диастереомерных продуктов с помощью полупрепаративной ВЭЖХ-системы привел к выбору следующих оптимальных параметров. В качестве аппаратной базы использовали хроматографическую систему Waters (в составе двух насосов модели 515, градиентного контроллера модели 690 и двухволнового УФ-детектора модели 2487). Разделение проводили на тандеме из двух колонок размером по 20 x 250 мм с обращенно-фазными сорбентами 11AD2 11 мкм и LPS-500 70 мкм (ООО "Техносорбент", Россия) в линейном градиенте ацетонитрила (подвижная фаза А: 0.1% ТФУ в воде; подвижная фаза В: ацетонитрил; градиент 2 - 30% В за 60 мин при скорости элюции 10 мл/мин; регистрация профиля элюции по УФ-поглощению на 220 и 340 нм). Далее полученную смесь диастереомеров в соотношении 1:3 повторно разделяли друг от друга в изократичных условиях с использованием хроматографической системы Waters 515 на колонке MN 10x250 C18 (подвижная фаза А: 0.1% ТФУ в воде; подвижная фаза В: ацетонитрил). В результате удалось выделить фракцию, содержащую исключительно изомер севанола **Isosevanol**, который в дальнейшем был отправлен на биологические тесты для изучения влияния стереомерии.

Также было сделано предположение, что мономерное производное севанола **s354** также обладает некой биологической активностью. Это соединение было отдельно синтезировано с использованием описанной уже ранее методики для синтеза сложного

эфира три-третбутилового эфира изолимонной кислоты и кофейной кислоты **4** (схема 39, схема 36) и последующим снятие трет-бутиловых эфиров при обработке соединения **4** смесью ТФУ – вода = 4:1 при нагревании 50 °С в течение 40 минут.

Для изучения влияния карбоксильных групп на активность севанола **s706** нами было решено защитить присутствующие в структуре карбоксильные части метиловыми эфирами. Таким образом, мы могли проверить вовлечены ли данные группы в сайт связывания в структуре ASICs каналов. Нам удалось получить сложный метиловый эфир севанола **s788** прямым путем из уже синтезированного ранее в разделе 3.1 соединения **s706** (схема 40).

Полученная в результате снятия соответствующих трет-бутиловых защит с продукта реакции димеризации **5** и последующей очистки с помощью полупрепаративной системы ВЭЖХ субстанция севанола **s706** была лиофилизована (схема 27). Затем соединение **s706** аккуратно растворили в 4М растворе HCl в метаноле и перемешивали при низкой температуре -20 °С в течение 72 часов. Прохождение реакции контролировали с помощью хромато-масс-спектрометрического метода. Далее реакционную смесь упаривали на роторном испарителе и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. В результате было получено целевое соединение **s788** с выходом на описанной стадии 97%, гидроксильные группы на фенольной части молекулы при этом оставались незащищенными.

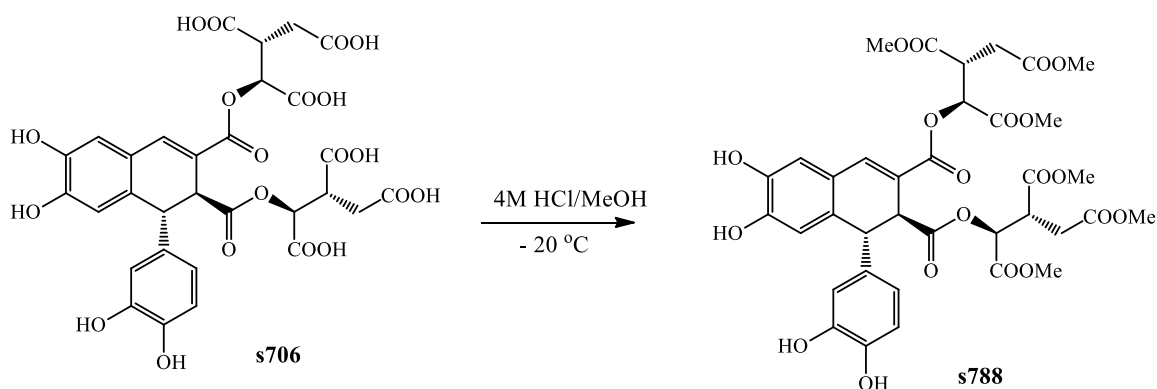


Схема 40. Схема синтеза аналога севанола s788.

Еще одним аналогом севанола созданным в настоящей работе стало производное **s874**, представляющее собой целевой димер с дополнительными ацетильными группами на фенольной части молекулы. Это вещество было получено с целью проследить вклад в лиганд-рецепторное взаимодействие гидроксильных групп

молекулы севанола **s706**. Соединение **s874** также было синтезировано в одну стадию из очищенной субстанции **s706** с использованием методики, описанной для получения соответствующе защищенного ацетилами мономера изоцитрата кофейной кислоты **21** в разделе 3.1.2 (схема 35). Реакцию проводили при низкой температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов (схема 41). Исходный очищенный материал **s706** охлаждали до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем последовательно аккуратно прикапывали 10 эквивалентов Ac_2O и 10 эквивалентов пиридина. После перемешивания при той же температуре, реакционную смесь обрабатывали и целевой продукт **s874** выделяли при помощи препаративной хроматографии ВЭЖХ. Выход на данной стадии составил 53%

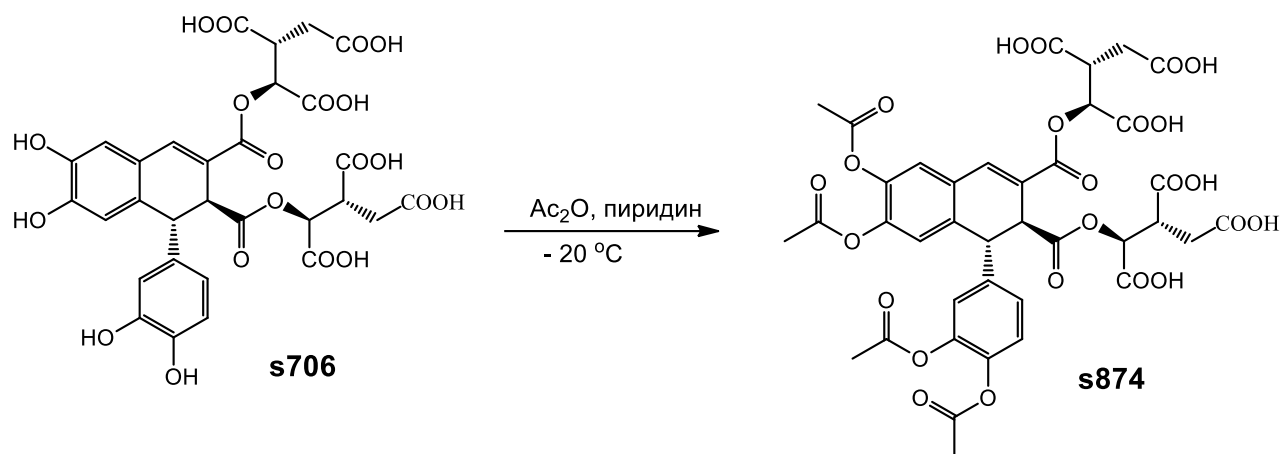


Схема 41. Схема синтеза аналога севанола **s874**.

3.2.2 Синтез производных и аналогов севанола: s590, s296

С целью изучения структурно-функциональной зависимости числа карбоксильных групп в изучаемом дигидронафталиновом лигнane от их влияния на биологическую активность первоначально было решено уменьшить до четырех карбоксилатов в димерной структуре. Для этого было получено соединение **s590**, представляющее собой сложный эфир эпифиловой кислоты и двух остатков (L)-яблочной кислоты. Синтез проводился с помощью подхода аналогичного методу синтеза севанола, однако в данном случае в качестве ключевого интермедиата для стадии конденсации с производным сложного эфира кофейной кислоты **20** выступал ди-третбутиловый эфир яблочной кислоты **10** (схема 42).

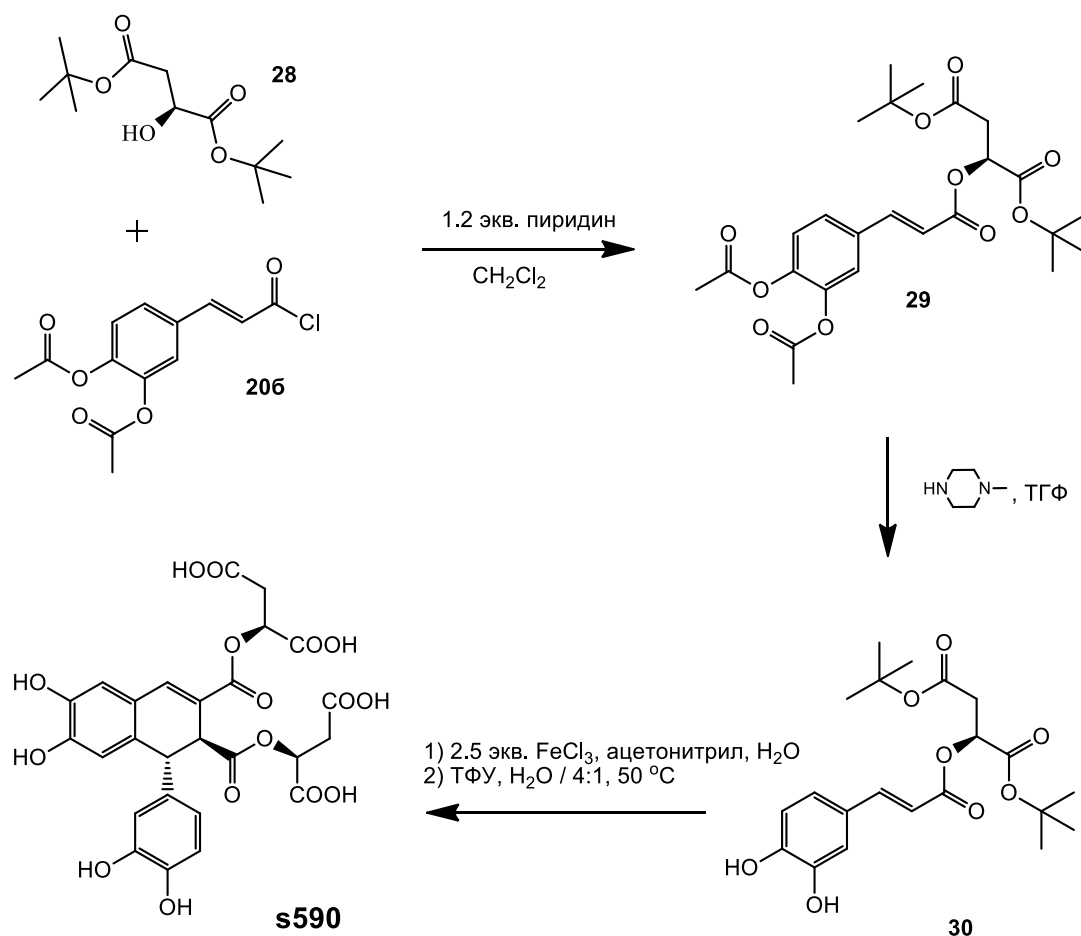


Схема 42. Схема полного синтеза аналога севанола сложного эфира эпифиловой кислоты и двух остатков (L)-яблочной кислоты **s590**.

Первая стадия синтеза соединения **s590** заключается в синтезе ди-третбутилового эфира (L)-яблочной кислоты **10** в две стадии согласно методике, разработанной ранее и описанной в разделе 3.1.1 (схема 32). Исходным материалом для синтеза ди-третбутилового эфира (L)-яблочной кислоты **10** является коммерчески доступная (L)-яблочная кислота **9**, которая вступает во взаимодействие с O-третбутилдиизопропилизомочевинной **8**. После проведения стандартных процедур промежуточный бис-третбутиловый эфир (L)-яблочной кислоты **10** был получен с общим выходом 71%.

Второй этап синтеза активного соединения **s590** связан с ацилированием промежуточного продукта хлорангирида бисацетилкофейной кислоты **206**, полученного по способу, описанному ранее (схема 36). Дальнейшее снятие ацетильных защит с использованием N-метилпиперазина в ТГФ в течение четырех часов с интермедиата **22** и последующая ключевая стадия окислительной димеризации сложного эфира соответствующей кофейной кислоты **23** в присутствии хлорида железа (III) в качестве окислительного реагента была проведена с использованием условий, подробно ранее изложенных в разделе 3.1.3 (схема 36). Выход трет-бутил защищенного продукта димеризации на данной стадии составляет 46%. После достаточно простого способа выделения продукта димеризации с использованием методики очистки на силикагеле полученный остаток подвергали обработке смесью ТФУ – вода (4:1) при нагревании до 50 °С в течение одного часа с целью снятия третбутильных защит с карбоксильных групп и получения целевого продукта **s590**. Далее полученную реакционную смесь упаривали на роторном испарителе без нагревания и подвергали очистке при помощи полупрепаративной хроматографии на обращенной фазе ВЭЖХ. В результате проведенных процедур был получен необходимый продукт сложного эфира эпифиловой кислоты и двух остатков (L)-яблочной кислоты **s590** с суммарным выходом 11% и чистотой 98% (схема 42).

3.2.3 Синтез производных и аналогов севанола: s414, EA

Синтез эпифиловой кислоты (EA) уже был опубликован ранее Такахаси с соавторами [42]. В данной работе эпифиловая кислоты получалась в качестве побочного продукта окислительной димеризации кофейной кислоты **1** с целью синтеза американола и изоамериканола в присутствии пероксидазы хрена (HRP) в фосфатном буфере, содержащем 18% 1,4-диоксана и перекиси водорода. Мы попытались трансформировать кофейную кислоту **1** в целевой продукт EA, основываясь на предложенном нами методе синтеза севанола. Ключевой стадией также являлось окислительное сочетание мономера производного кофейной кислоты **24**, которое проводилось в присутствии 2.5 эквивалентов хлорида железа (III) при низкой температуре в отсутствие доступа света (схема 43).

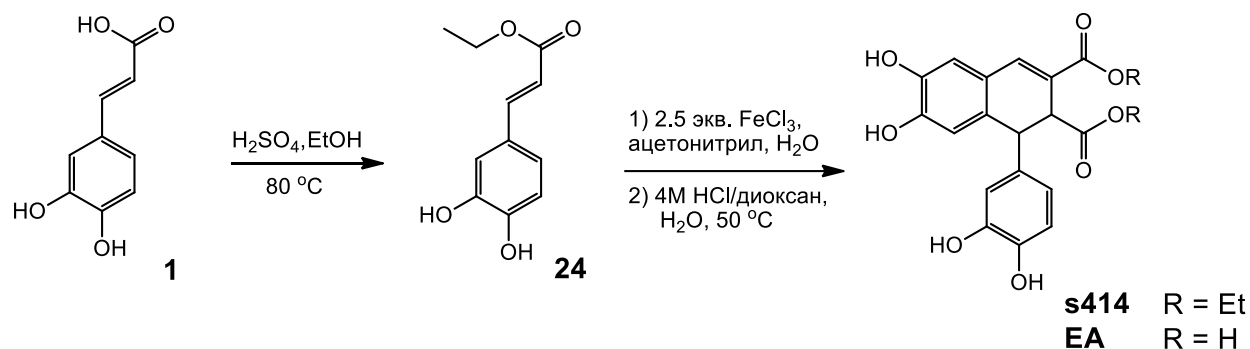


Схема 43. Схема полного синтеза аналога севанола ди-этилового эфира эпифиловой кислоты s414 и эпифиловой кислоты EA.

Исходным материалом являлась коммерчески доступная кофейная кислота **1**, которая была трансформирована в этиловый эфир **24** с помощью этерификации в этаноле в присутствии каталитических количеств серной кислоты при кипячении (схема 43). После обработки реакционной смеси гидрокарбонатом натрия NaHCO_3 и последующего упаривания на роторном испарителе был получен целевой продукт **24** с выходом 89%. Затем с использованием окислительной димеризации нами был синтезирован димерный продукт **s414**, представляющий собой ди-этиловый эфир эпифиловой кислоты, с выходом на данной стадии 37%. Далее перед нами стояла задача деблокирования карбоксильных групп молекулы **s414** с целью трансформации ее в целевое соединение эпифиловой кислоты EA. Первоначальная идея заключалась в стандартной процедуре основного гидролиза этиловых эфиров с использованием

водного раствора 5M NaOH при комнатной температуре. Однако, реакционная смесь сильно осмолялась и качественное выделение необходимого продукта гидролиза **EA** представлялось практически невозможным. Таким образом, мы попытались провести гидролиз вещества **s414** в кислотных условиях с использованием 4M HCl в диоксане в присутствии воды при комнатной температуре. После соответствующей обработки реакционной смеси, очистки при помощи полупрепаративной системы ВЭЖХ и лиофилизации чистых фракций нами было успешно выделено искомое соединений эпифиловой кислоты **EA** с выходом на данной стадии 35%.

В результате проведенных синтетических процедур и модификаций разработанной ранее методики полного синтеза севанола **s706** нами были получены аналоги и производные севанола, которые в дальнейшем были использованы в биологических тестах, что позволило проследить структурно-функциональные взаимосвязи. Полученные в результате проведенного химического и биологического анализа данные способствовали более тщательному пониманию направления для дальнейшего дизайна перспективного фармацевтического препарата, обладающего высоким противовоспалительным и обезболивающим эффектом.

3.3 Биологическая активность синтетического севанола и его аналогов

Кислото-чувствительные ионные каналы ASIC являются одной из перспективных мишеней для разработки обезболивающих препаратов. В нейронах периферической нервной системы в основном представлены гомомерные и гетеромерные ASIC1a и ASIC3 – содержащие каналы. Данный вид кислото-чувствительных каналов:

- 1) участвует в восприятии кислото-опосредованной, воспалительной и постоперационной боли;
- 2) вносит вклад в развитие первичной и/или вторичной механогиперчувствительности в мышцах;
- 3) участвует в кожной и висцеральной механочувствительности и в восприятии боли от механических стимулов;
- 4) участвует в восприятии болевых сигналов от легких и желудочно-кишечного тракта.

Направленное снижение активности рецепторов ноцицепции, среди которых находятся ASIC1a и ASIC3, позволяет с минимальными побочными явлениями получить обезболивающий эффект, иногда сопоставимый с действием сильных опиоидов.

В настоящее время набор используемых в практике активных лигандов-модуляторов ASIC-каналов ограничен в основном амилоридными и нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП). Как амилориды (мочегонные средства), так и прочие НПВП (противовоспалительные и анальгетические средства) -, продаваемые в аптеках как обезболивающие средства, действуют по основной биологической мишени как ингибиторы циклооксигеназы. Действие на каналы ASIC рассматривается как один из побочных эффектов их неспецифического действия. Для одного из применяемых в медицине НПВП - диклофенака показано наиболее эффективное действие на ASIC3 каналы, которое может быть рассмотрено, как одна из причин большей эффективности диклофенака как анальгетика среди НПВП.

За последние десятилетия были найдены различные биологически активные соединения, влияющие на активность каналов ASIC, среди них несколько новых соединений были обнаружены в ИБХ РАН. В данной диссертационной работе ранее в разделе 3.1 был описан полный синтез природного севанола в лабораторных условиях, а также проведен дизайн и синтез наиболее интересных защищенных и модифицированных аналогов севанола. В разделе 3.3, посвященном исследованию

биологической активности полученных соединений, с помощью методов электрофизиологии и структурно-функционального анализа основной целью было:

1) определить биологическую активность и эффективность изучаемых синтетического севанола (**s706**) и его аналогов (схема 39);

2) провести анализ структурно-функциональной зависимости лиганд-рецепторного взаимодействия;

3) определить структурные особенности, влияющие на селективность изоформы ASIC3, а именно проследить корреляцию значений ингибирующего эффекта от стереоизомерии изучаемого лигнана **s706** и от количества карбоксильных групп в молекуле севанола **s706** и его производных.

Данные исследования и проведенный структурно-функциональный анализ играет важную роль в дальнейшем дизайне новых фармацевтических анальгетических и противовоспалительных препаратов на основе севанола.

3.3.1 Изучение и сравнение биологической активности синтетического аналога севанола (s706), диастереомера севанола (Iosevanol) и мономера севанола (s354)

Для оценки идентичности синтетического аналога севанола **s706** природному лигнану и подтверждения установленной биологической активности были проведены электрофизиологические эксперименты на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих ASIC3-канал человека. Синтезированный оптически чистый севанол и севанол, выделенный из природного сырья, в результате экспериментов показали одинаковую активность. Оба исследуемых соединения подавляли ток ASIC3 канала на 90% при концентрации 0.2 Мм, в то время как после снижения концентрации до 0.1 Мм подавление токов происходило на 60%. При тестировании изомера (**Iosevanol**) и мономера севанола (**s354**) была показана значительно меньшая ингибирующая активность этих соединений по отношению к ASIC-каналам (схема 44).

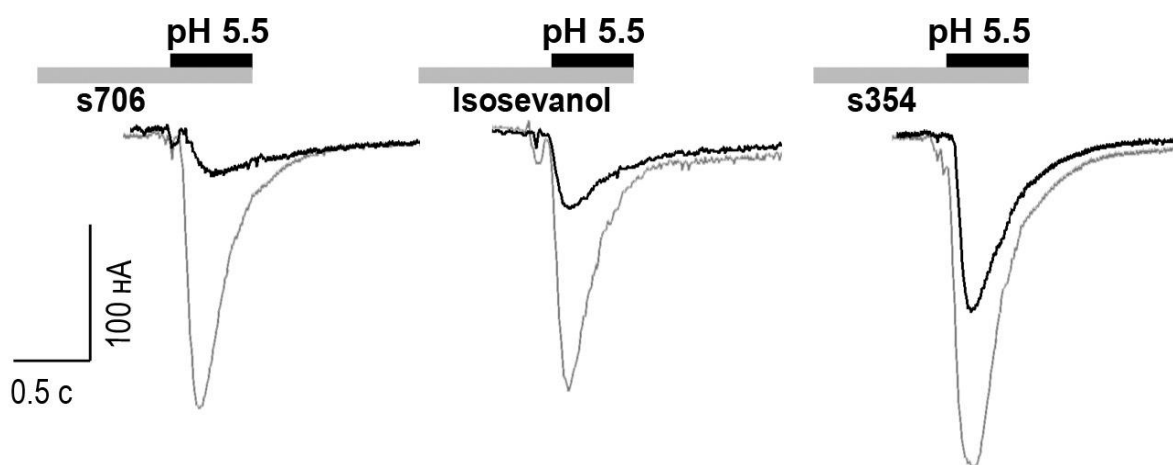


Схема 44. Измерение ингибирующей активности севанола s706, диастереомера севанола Iosevanol и мономера севанола s354 в концентрации 0.2 мМ на ASIC3 каналах человека, экспрессированных в ооцитах лягушки *X.laevis*. Приведены записи измеренных токов через мембрану клетки, вызванных изменением pH наружного раствора с 7.8 до 5.5.

Таким образом, диастереомер севанола (**Iosevanol**) при концентрации 0.2 Мм подавлял ток ASIC канала на 70%, концентрации 0.1 Мм – на 40%. Данный результат демонстрирует, что пространственное положение стереоцентра кора севанола **s706** значительно влияет на проявляемую лигнаном биологическую активность, а именно эффект подавления токов ASIC каналов оказывается на треть слабее по сравнению с

синтетическим и природным образцом севанола. Ввиду преимущественного получения синтетическим путем лигнана севанола **s706** в виде диастереомерной смеси в соотношении 1:3 (**Isosevanol**- **s706**) нами было изучено влияние изомерной примеси в количестве 25% на ингибирующий эффект по отношению к ASIC3-каналам. Результаты электрофизиологических тестов показали, что существенного отличия от оптически чистого синтетического лигнана **s706** не наблюдалось, а именно подавление токов ASIC1a каналов также достигало 70% при концентрации 0.3 мМ (схема 45).

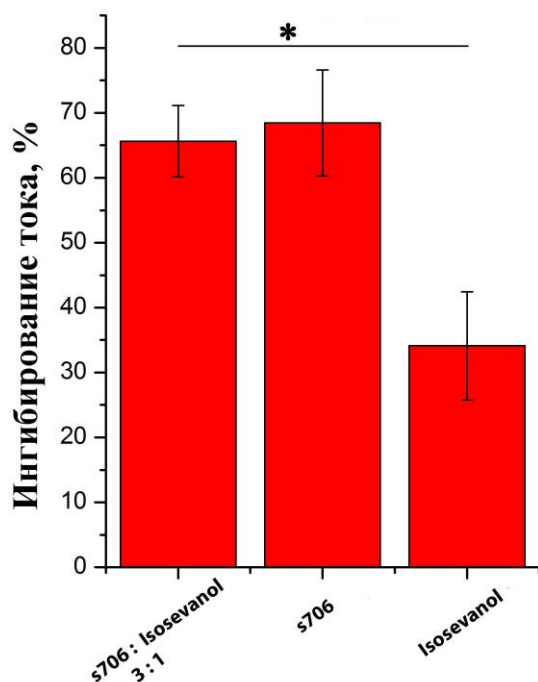


Схема 45. Сравнение ингибирующей активности севанола **s706**, диастереомера севанола **Isosevanol** и смеси севанола (**s706**) и изомера севанола (**Isosevanol**) в соотношении 1:3 в концентрации 0.3 мМ на ASIC1a-каналах. На графике указана обратная величина значения IC_{50} для ингибирующих эффектов на ASIC1a каналах.

Кроме того, опираясь на описанные ранее в литературных данных возможные биосинтетические пути образования лигнанов в растениях, нами было предположено, что в природе севанол **s706** получается в результате энантиоселективной димеризации пропенилфенольного мономера **s354** в присутствии соответствующего фермента (схема б) [32]. Таким образом, вероятно соединение **s354** может оказывать самостоятельный биологический эффект на ASIC-каналы, но менее весомый и селективный по сравнению со своим продуктом димеризации **s706**. Так, для составления полной

картины оценки биологической активности севанола были проведены электрофизиологические эксперименты по эффективности ингибирования мономера севанола **s354**. Сложный эфир коричной и изолимонной кислоты **s354**, являющийся возможным биосинтетическим предшественником природного лигнана **s706**, также обладал ингибирующей активностью по отношению к ASIC-каналам. Однако, эффект ингибирования оказался крайне слабым – при концентрации 0.2 Мм подавление токов ASIC-каналов происходило на 40%, в то время как при 0.1 Мм эффект и вовсе был незначительным (схема 44). Необходимо отметить, что проявляемая ингибирующая активность у всех исследуемых соединений была обратимой и пропадала после соответствующей отмывки.

3.3.2 Изучение и сравнение ASIC1a и ASIC3 ингибирующей активности синтетического севанола и его аналогов

Тестирование активности синтетического севанола **s706** и его аналогов **s590**, **s414**, **EA**, **s874**, **s788** было проведено на ооцитах *X.laevis*, экспрессирующих крысиный ASIC1a и ASIC3 каналы с использованием стандартного двухэлектродного метода фиксации потенциала (схема 46). Активация ASIC-каналов осуществлялась быстрой сменой pH внешнего раствора с 7.4 до 5.5. В результате проведенных электрофизиологических экспериментов была продемонстрирована ингибирующая способность по отношению к обеим изоформам ASIC1a и ASIC3 у лигнанов севанола и двух его аналогов **s590**, **EA**, **s874**. При этом эффект подавления токов ASIC-каналов достигал стопроцентных значений и являлся обратимым после отмывки. Производные севанола **s788** и **s414** не показали какой-либо активности на изучаемых кислоточувствительных каналах. График доза-эффект и значение полумаксимальных эффективных концентраций (IC_{50}) для изоформ ASIC1a и ASIC3 четко демонстрируют корреляцию ингибирующего действия каналов с количеством карбоксильных групп исследуемых соединений (схема 46). Таким образом, отмеченная разница в ингибирующей способности севанола и его производных аналогов позволяла предположить, что весомый вклад в эффективность биологической активности лигнана **s706** вносит наличие у соединения шести карбоксильных групп на дигидронафталиновом скелете (схема 39). В результате проведенных экспериментов было показано, что севанол **s706** проявил ингибирующую активность значительно выше, чем аналог **s590** (IC_{50} $175 \pm 18 \mu\text{M}$ и $241 \pm 25 \mu\text{M}$, соответственно, $p = 0.016$). Синтетическое производное севанола **s590**, согласно предположению, показало более высокую активность по сравнению с эпифиловой кислотой **EA** (IC_{50} $241 \pm 25 \mu\text{M}$ и $424 \pm 33 \mu\text{M}$, соответственно, $p = 0.002$). Соединение **s874**, представляющего собой молекулу севанола с ацетил-защищенными гидроксильными группами гидрофобного кора соединения, также проявляло ингибирующую активность по отношению к ASIC-каналам. Однако способность подавлять токи у ацетил-замещенного севанола **s874** оказалась ниже в 1.7 раза, что позволяет сделать вывод о вкладе гидроксильных групп в эффективность биологической активности, проявляемой севанолом (схема 47).

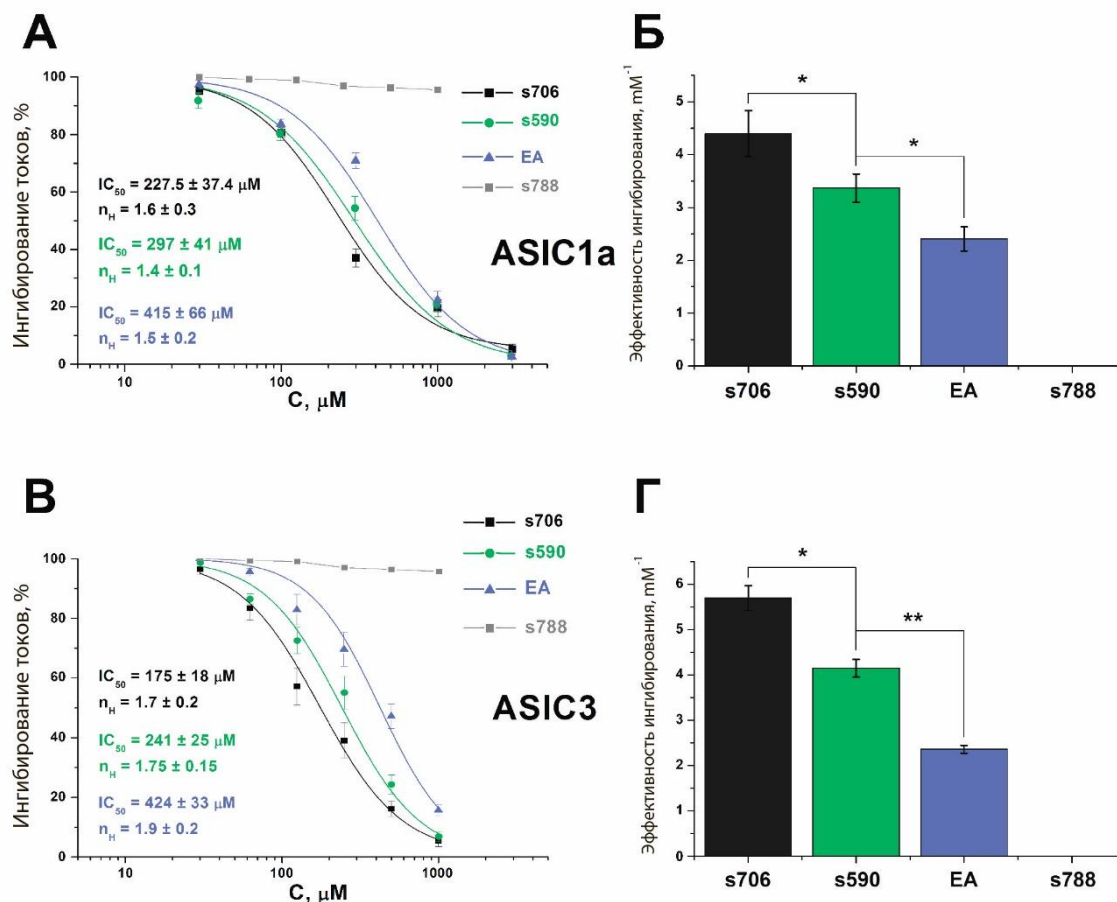


Схема 46. Ингибирующая активность саванола (s706) и его аналогов (s590, EA, s788). Измеренные токи были вызваны изменением pH наружного раствора с 7.4 до 5.5, фиксированы при значении потенциала -50 мВ. (А) и (В) являются графиками дозозависимости ингибирующего эффекта по отношению к ASIC1a и ASIC3 для соединения s706, s590, EA. (Б) и (Г) показывают обратную величину значений IC₅₀ для ингибирующих эффектов на ASIC1a и ASIC3 для соединений s706, s590, EA. Статистически достоверные различия * p<0.05, ** p<0.005.

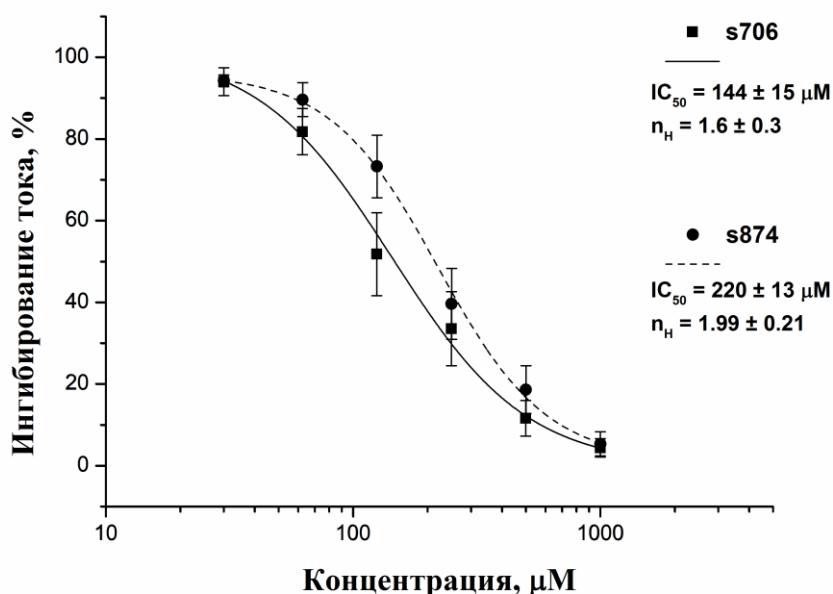


Схема 47. Ингибирующая активность севанола s706 и его защищенного ацетильными группами по гидроксилам аналога s874. Измеренные токи были вызваны изменением pH наружного раствора с 7.4 до 5.5, фиксированы при значении потенциала -50 мВ.

Производное севанола с заблокированными с помощью метильных групп карбоксильными группами s788 и производное эпифиловой кислоты s414, в котором карбоксильные группы были соответствующе защищены этильными группами, не продемонстрировали какого-либо ингибирующего эффекта по отношению к ASIC-каналам (схема 46). Также в результате проведенного электрофизиологического тестирования было выявлено, что севанол s706 в 1.3 раза сильнее подавляет токи в ASIC3 канале, чем в ASIC1a. Аналогичная ситуация наблюдалась для лигнана s590. Эпифиловая кислота EA проявляла одинаковую ингибирующую способность для обеих изоформ ASIC3 и ASIC1a. Так, мы смогли показать, что севанол и его аналоги с меньшим количеством карбоксильных групп на лигнановом коре ингибируют оба подтипа кислоточувствительных каналов ASIC, удаление каждой пары свободных карбоксильных групп приводит к снижению биологической активности молекулы.

Известно, что пептиды RF-амидов обладают потенцирующим действием на ASIC1a, ингибируя десенситилизацию каналов в присутствии протонов (при кислотной стимуляции). Данные пептиды проявляют этот эффект как в случае десенситилизации после активации каналов, так и в случае стационарной десенситилизации, когда каналы

перестают реагировать на кислотный стимул в обход стадии активации [207-208]. При помощи молекулярного докинга и сайт-направленного мутагенеза, было показано, что пептиды RF-амида, скорее всего, связываются с ASIC1a в центральном вестибюле куриного ASIC-канала [209]. Наши коллеги из лаборатории Нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН исследовали ингибирующий эффект севанола **s706** на канал ASIC1a, активированный pH 5,5 в присутствии 200 мкМ пептида FRRFa (Phe-Arg-Arg-Phe-амид), и показали, что севанол и пептид конкурировали за сайт связывания. На схеме 48 показано, что в присутствии пептида характерная форма тока с замедленной десенсibilизацией сохраняется при совместном применении с севанолом. Пептид ухудшал эффективность ингибирующего действия севанола на канал в 1.5 раза, а также снижал коэффициент Хилла (схема 48).

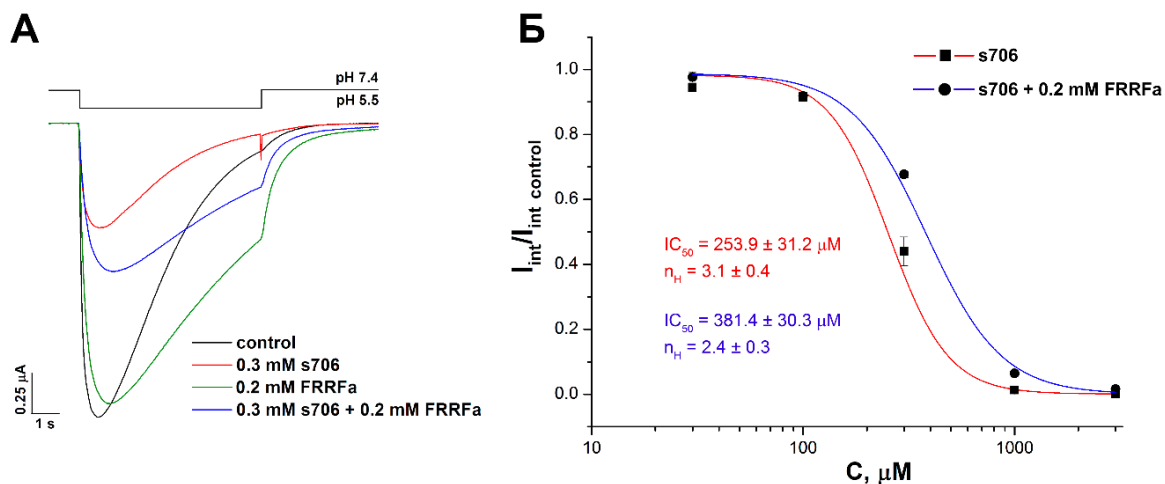


Схема 48. Сравнение ингибирующего эффекта севанола (s706) и пептида FRRF-амида (FRRFa) на ток ASIC1a. (А) Репрезентативные следы вызванных pH 5,5 токов только ASIC1a (черная кривая) и ASIC1a с 15-секундной предварительной инкубацией 300 мкМ s706 (красная кривая), 200 мкМ FRRFa (зеленая кривая) или смеси 300 мкМ s706 и 200 мкМ FRRFa (синяя кривая). (Б) Доза-ответные кривые ингибирования ASIC1a для s706 отдельно (красная линия) и для s706 в присутствии 200 мкМ FRRFa (синяя линия), определенные для интегральных токов.

Таким образом, можно предположить, что сайт связывания севанола также находится в области центрального вестибюля [210].

Сотрудниками лаборатории Моделирования биомолекулярных систем был проведен молекулярный докинг соединений **s706** и **s788** на модели закрытого крысиного ASIC1a-канала. Приняв во внимание результаты электрофизиологических экспериментов, показывающих конкуренцию севанола **s706** и FRRFa, а также литературные данные о сайте связывания пептида FRRFa, докинг был сфокусирован в районе центрального вестибюля протон-чувствительного ионного канала, а кислотный карман был практически исключен из рассмотрения. Результаты моделирования лиганд-рецепторного взаимодействия подтверждали, что сайтом связывания исследуемого лигнана севанола является центральный вестибюль (схема 49).

В настоящее время в публикациях встречаются данные, что FRRFa связывается в боковых полостях вестибюля, где координируется с тремя остатками глутаминовой кислоты и одним валином, которые, как было подтверждено, важны для связывания [209]. Севанол, как молекула с высокой кислотностью, вряд ли будет претендовать на то же место связывания из-за предполагаемого сильного электростатического отталкивания. Скорей всего сайты связывания севанола и FRRFa в центральном вестибюле частично перекрываются, что и было подтверждено электрофизиологическими тестами по конкуренции этих двух соединений (схема 49, Б). Предполагаемый сайт связывания севанола включает в себя три аминокислотных остатка Arg369. Вероятно, молекула севанола формирует, как минимум, два ионных мостика с каждой разветвленной частью дигидрофталинового лигнана **s706** с этими а.о. при помощи карбоксильных групп (схема 49, В). Докинг соединения **s788**, представляющее собой севанол с защищенными метильными группами шестью карбоксилами, показывает очевидный факт, что эта молекула, хотя и соответствует сайту связывания, не может образовывать ионные мостики с остатками Arg 369 из-за отсутствия карбоксильных групп.

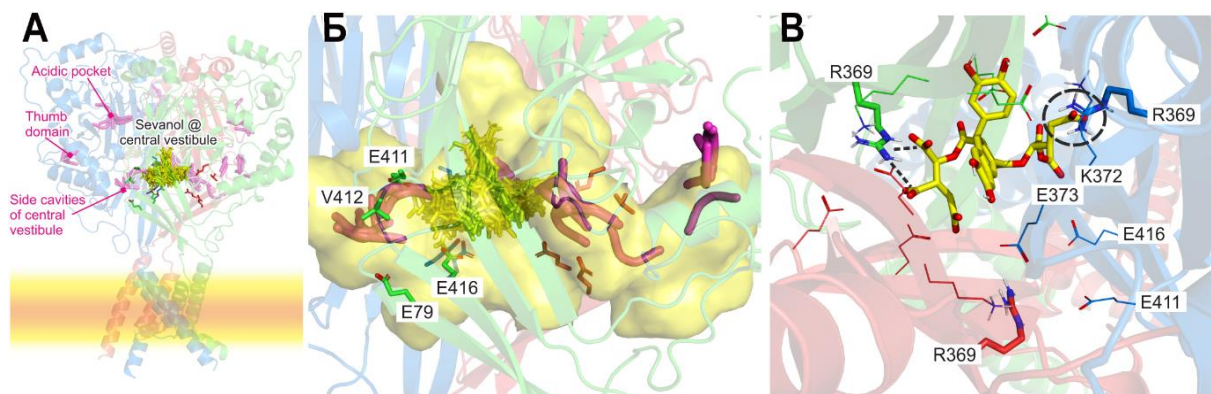


Схема 49. Докинг севанола *s706* на модели крысиного ASIC1a-канала (A-B) и сравнение с докингом FRRFa-пептида (A, Б). (A) Модель закрытого ASIC1a-канала крысы. Желтые фрагменты отображают 20 решений по возможному положению севанола в центральном вестибюле; пурпурные фрагменты отображают результаты докинга для FRRFa-пептида [210]. (Б) Приближенный вид центрального вестибюля (A). Отмечены несколько а.о. канала, необходимые для связывания FRRFa (подтверждено мутагенезом). На рисунке можно отметить частичное перекрытие сайтов связывания севанола и FRRFa-пептида. (B) Сайт связывания севанола (решение №3) внутри центральной части вестибюля (вид на тример ASIC1a сверху). Красным фрагментом отмечен остаток Arg369. Возможные солевые мостики между карбоксильными группами и двумя остатками Arg369 отображены с помощью штрихпунктирных линий и штрихпунктирного круга.

Таким образом, проведенные структурно-функциональные исследования лиганд-рецепторного взаимодействия показали, что карбоксильные группы изучаемого лигнана севанола и его аналогов играют важную роль в проявлении ингибирующей активности по отношению к ASIC1a и ASIC3 каналам. Протестированные соединения *s706*, *s788*, *s590* и *EA* можно расположить в следующем порядке по проявлению эффекта подавления токов в протон-чувствительных каналах: *s706* > *s590* > *EA*, что полностью коррелирует с числом свободных карбоксильных групп в данных соединениях (схема 39). При этом неактивный аналог *s788*, характеризующийся полным отсутствием незащищенных карбоксилатов, подтверждает значимость этих функциональных групп в проявлении биологической активности подобных лигнанов.

3.3.3 Анальгетическая активность севанола s706

Ранее в публикации М. Дубинного и соавторов было продемонстрировано, что выделенный из природных источников севанол **s706** обратимо ингибирует быструю и медленную компоненты токов ASIC3-каналов, а также проявлял обезболивающий эффект [6]. Позднее Я.Андреев с коллегами показал, что синтетический севанол также проявлял анальгетические свойства после внутривенного (i.v.) и внутримышечного (i.m.) введения, как и природное соединение **s706** [206]. Ввиду того, что севанол проявил наиболее высокую активность среди синтезированных ранее в диссертационной работе его аналогов, стало интересным исследовать его биологическую эффективность на животных моделях с использованием различных способов доставки активного соединения. Оба вышеупомянутых метода (i.v. и i.m.) являются инвазивными и ограничивают потенциальный интерес к севанолу как к перспективному лекарственному препарату. Так, сотрудниками лаборатории Нейрорецепторов и нейрорегуляторов ФИБХ РАН был измерен анальгетический эффект севанола при введении интраназально (i.n.) и перорально (p.o.), а также сравнен с изучаемым ранее введением i.v. в моделях интенсивности висцерально боли после внутрибрюшинного введения уксусной кислоты и воспаления, вызванного CFA *in vivo*. При всех изучаемых способах дистрибьюции севанола **s706** наблюдалось уменьшение количества уксусных корчей (схема 50). Введение препарата i.v. и i.n. давало статистически значимый эффект при дозах выше 0.1 мг/кг, тогда как p.o. введение было эффективным, начиная с дозы 0.01 мг/кг. Все изученные способы введения снижали количество корчей более чем на 50% в дозе 1 мг/кг.

Севанол показал противовоспалительные свойства в тесте на термическую гипералгезию, вызванную CFA (схема 50, Г-Е). Этот эффект достиг статистической значимости при дозе 1 мг/кг как при i.v. и i.n. доставке, и, что удивительно, была более выражена при пероральном приеме (эффект был статистически значимым при дозе 0,1 мг/кг). Более того, значительное уменьшение отека лап наблюдалось только при пероральном введении севанола (схема 51).

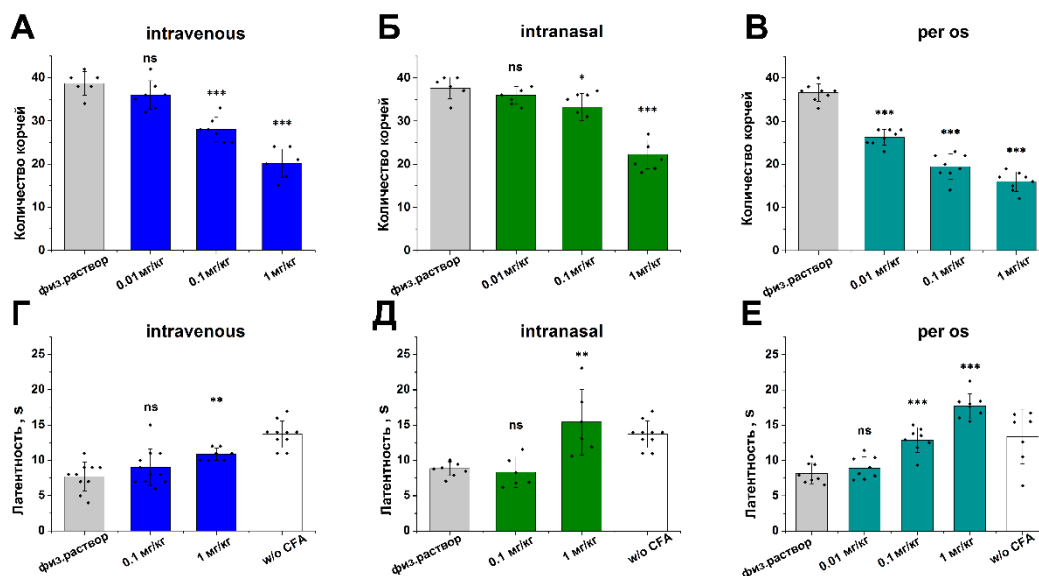


Схема 50. Анальгетический и противовоспалительный эффекты севанола s706 при внутривенном, интраназальном и пероральном методе доставки препарата. Влияние севанола на корчи, вызванные уксусной кислотой (А, Б, В), и на латентный период вывода мышей на горячей пластине в тесте на тепловую гипералгезию после инъекции CFA (Г, Д, Е) при внутривенном введении (А и Г) интраназальное (Б и Д) и пероральное (В и Е) введение.

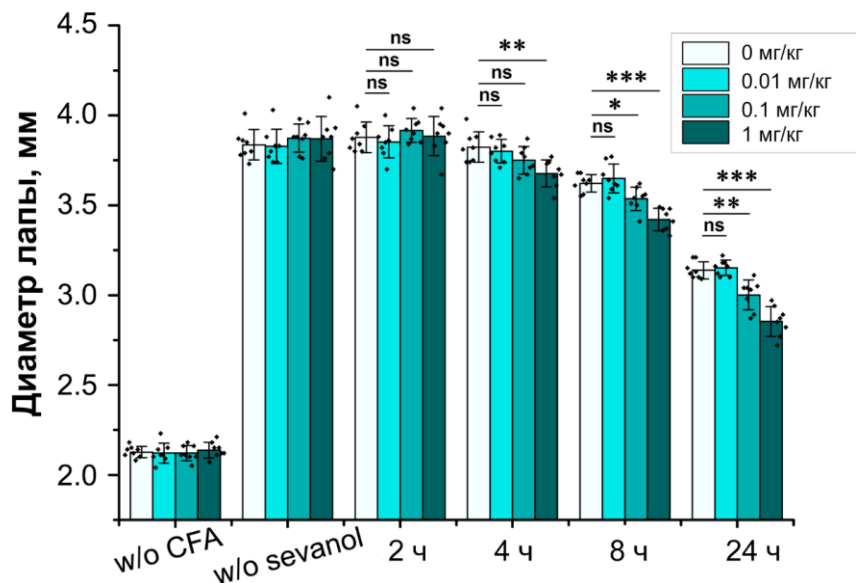


Схема 51. Противовоспалительный эффект севанола после перорального приема препарата. Отек лапы, вызванный инъекцией CFA, оценивался до введения CFA и севанола, а также через 2, 4, 8 и 24 часа после перорального введения севанола в разных дозах.

Таким образом, севанол **s706** обладает сильным обезболивающим действием и может быть биодоступным при введении неинвазивными методами, как было показано в двух различных тестах *in vivo*. Тесты на укусыные корчи и горячую пластину ясно показали преимущества перорального метода введения севанола, который, несомненно, должен быть предпочтительнее для использования севанола в качестве фармацевтического обезболивающего препарата.

4. Экспериментальная часть

4.1 Материалы и оборудование

Все реакции с использованием чувствительных к влаге реагентов были проведены в условиях инертной атмосферы. Растворители ацетонитрил, хлористый метилен были заказаны в Merck и были использованы без дополнительной очистки. Этиацетат, гексан, толуол и ацетон были перегнаны с добавлением CaCl_2 . 3,4 – дигидроксibenзальдегид и хлорид железа (III) были приобретены в Acros. N-метилпиперазин был приобретен в Fluorochem. ДМАП, ДИК были заказаны в Merck. Остальные реактивы для синтеза интермедиатов были приобретены в PanReac AppliChem. Все коммерчески доступные реагенты были использованы без дополнительной очистки.

Тонкослойная хроматография была проведена на пластинках, предварительно покрытых силикагелем (silica gel 60, F₂₅₄, Fluka), пятна были идентифицированы под УФ или после проявления пластинки фосфомолибденовой кислотой в изопропанол. Очистка продуктов реакции при помощи колоночной хроматографии была проведена с использованием силикагеля (0.063-0.2 мм/70-230 mesh ASTM, MN Kieselgel).

Все аналитические HPLC/MS спектры были получены на системе с ВЭЖХ Waters ACQUITY UPLC H-Class, состоящего из двухволнового УФ-детектора (TUV), термостата для колонок (CM), автосамплера (FTN), четырехкомпонентного насосного блока (QSM) и одноквадрупольного масс-детектора (SQD) с ионизацией электрораспылением (ESI). УФ-детектирование было проведено на 220 нм. Подвижная фаза: А: вода, 0.1% муравьиной кислоты; В: ацетонитрил, 0.075% муравьиной кислоты. В качестве колонки для аналитики реакций синтеза интермедиатов была использована Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7мкм 2.1мм x 50мм, для качественной аналитики севанола и его аналога использовалась колонка Waters ACQUITY UPLC BEH130 C18 1.7мкм 2.1мм x 100мм.

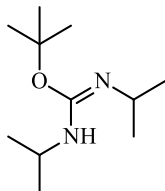
Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) были получены на приборе Agilent 6224 TOF LC/MS System.

Все ^1H и ^{13}C ЯМР-спектры были зарегистрированы на приборе Bruker AVANCE III (Bruker BioSpin, Германия) с частотой по ядрам протонов 300 и 700 МГц в CDCl_3 , D_2O и ацетон- d_6 . Химические сдвиги отображены относительно сигналов растворителей CDCl_3 (7.27 ppm для ^1H и 77.0 ppm для ^{13}C), D_2O (4.79 ppm для ^1H), ацетон- d_6 (2.05 ppm для ^1H и 29.8 ppm, 206.2 ppm для ^{13}C).

Получение угла оптического вращения целевого продукта севанола было проведено на приборе PerkinElmer модель 341.

4.2 Синтез

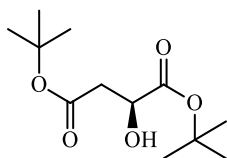
4.2.1 Получение три-третбутилового эфира изолимонной кислоты **3**.



O-третбутилдиизопропилизомочевина (**8**)

В круглодонную колбу помещали соединение **7** (0.165 моль, 20.8 гр) и 0,01 эквивалента CuCl (2 ммоль, 0.1 гр), затем добавляли 1 эквивалент третбутилового спирта **6** (0.165 моль, 12.2 гр) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 72 часов. Полученную реакционную смесь фильтровали через пористый стеклянный фильтр и перегоняли при температуре 70-75 °С / 15 мм. рт. ст. В результате перегонки получили целевое соединение *O*-третбутилдиизопропилизомочевину **8** в виде бесцветной жидкости (33 гр, 83%). Δ

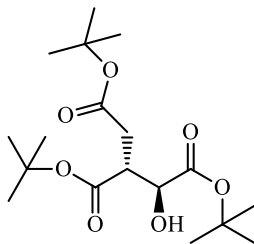
^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ_{H} 4.05 (1H, м), 3.64 (1H, м), 1.41 (9H, с), 1.33 (6H, д, $J = 7.0$ Гц), 1.16 (6H, д, $J = 6.8$ Гц).



Бис-третбутиловый эфир (**L**)-яблочной кислоты (**10**)

В круглодонную колбу, снабженную капельной воронкой и внутренним термометром, поместили соединение **9** (0.034 моль, 4.5 гр), прибавили 50 мл хлористого метилена. Реакционную смесь охладили в ледяной бане до температуры 0-5 °С и постепенно прикапывали 5 эквивалентов соединения **8** (0.17 моль, 33,0 гр) растворенного в хлористом метилене (50 мл). Реакционную смесь отогрели до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 часов. Прохождение реакции контролировали при помощи ТСХ в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:4. Далее выпавший осадок отфильтровали, маточный раствор упарили, остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:4. В результате очистки получили бис-третбутиловый эфир (**L**)-яблочной кислоты **10** в виде бесцветного масла (6 гр, 71%).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ_{H} 4.30 (1H, т, $J = 5.2$ Гц), 3.22 (ОН, уширенный), 2.79-2.59 (2H, м), 1.50 (9H, с), 1.45 (9H, с).

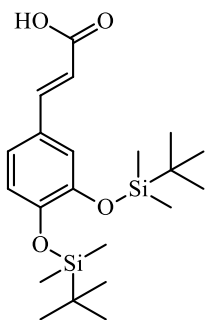


Три-третбутиловый эфир изолимонной кислоты (**3**)

В круглодонную колбу, снабженную септой, переходом для ввода аргона и низкотемпературным термометром, поместили 2,5 эквивалента диизопропиламина (0,06 моль, 8.5 мл) растворенного в ТГФ (50 мл). Полученный раствор охлаждали при помощи жидкого азота до -70 °С и, используя шприц, через септу постепенно прикапывали 2,5 эквивалента 2,5 М бутиллития в гексане (0,06 моль, 24 мл). Реакционную смесь перемешивали при -50 °С в течение 30 минут. Далее реакционную смесь охлаждали до -78 °С и постепенно прикапывали соединение **10** (0,024 моль, 6 гр), растворенное в ТГФ (20 мл). Реакционную смесь отогревали до -60 °С и перемешивали при данной температуре в течение 20 минут. Далее реакционную смесь охлаждали до -78 °С и постепенно прикапывали 1,5 эквивалента третбутилбромацетата **11** (0,036 моль, 5.3 мл), растворенного в ТГФ (10 мл). Реакционную смесь отогревали до -20 °С и перемешивали при данной температуре в течение 3 часов. Прохождение реакции контролировали по ТСХ в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:9. Полученную реакционную смесь обрабатывали 1М соляной кислотой до pH 3. Полученный органический раствор сушили Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Целевое соединение **3** выделяли при помощи прямофазной силикагельной хроматографии в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:9. В результате был получен три-третбутиловый эфир изолимонной кислоты **3** в виде бесцветного масла (4.6 гр, 53%).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ_{H} 4.21 (1H, дд, $J = 5.7, 2.7$ Гц), 3.31 (1H, ддд, $J = 8.6, 6.2, 2.7$ Гц), 3.23 (1H, дд, $J = 27.9, 6.0$ Гц), 2.76 (1H, дд, $J = 16.7, 8.5$ Гц), 2.52 (1H, дд, $J = 16.7, 6.1$ Гц), 9.29 (9H, с), 1.47 (18H, с); HRMS: вычислено $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_7$ 361.2220 $[\text{M}+\text{H}]^+$ найдено 361.2222.

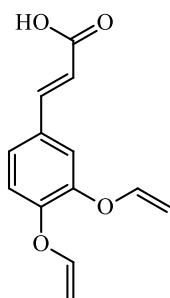
4.2.2 Получение сложного эфира три-третбутилового эфира изолимонной кислоты и кофейной кислоты 4.



(E)-3-(3,4-бис((третбутилдиметилсилил)окси)фенил)акриловая кислота (15a)

В круглодонную колбу поместили кофейную кислоту **1** (0.011 моль, 2.0 гр) и 9 эквивалентов имидазола (0.099 моль, 5.5 мл). Смесь растворили в 50 мл ДМФ и далее при помощи воронки добавляли 4.5 эквивалента третбутилдиметилсилил хлорида (0.05 моль, 7.5 гр). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Прохождение реакции контролировали при помощи ТСХ в системе этилацетат – гексан в соотношении 1:6. Далее реакционную смесь обрабатывали 1М HCl и экстрагировали дважды диэтиловым эфиром. Органический слой затем промывали насыщенным раствором хлорида натрия и сушили Na₂SO₄. После упаривания на роторном испарителе остаток растворяли в смеси метанол – вода в соотношении 4:1, перемешивали в течение 30 минут. После выпадения осадка продукт отфильтровали и промыли смесью метанол-вода. В результате был получен необходимый интермедиат **15a** в виде порошка розового цвета (4 гр., 89 %).

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ_H 7.69 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 7.12 – 6.99 (2H, м), 6.90 – 6.81 (1H, м), 6.26 (1H, д, *J* = 15.8 Гц), 1.01 (18H, с), 0.24 (12H, с).



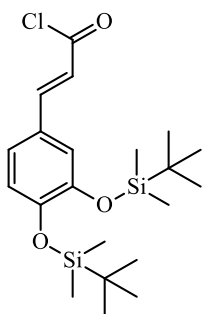
(E)-3-(3,4-бис(винилокси)фенил)акриловая кислота (156)

В круглодонной колбе растворили кофейную кислоту **1** (0.011 моль, 2 гр.) в 50 мл ацетона и добавили 15 эквивалентов K_2CO_3 (0.165 моль, 22 гр.). Полученную смесь перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем добавили 2.2 эквивалента аллил бромида (0.024 моль, 2.1 мл), растворенного в 20 мл ацетона. Реакционная смесь перемешивалась при комнатной температуре в течение 16 часов, протекание реакции контролировали при помощи ТСХ в системе этилацетат – гексан в соотношении 1:4. Далее образовавшийся осадок отфильтровывали, полученный в результате маточный раствор упаривали на роторном испарителе. Полученный остаток растворяли в 60 мл этанола, добавляли 40 мл 2М водного раствора NaOH и перемешивали при кипячении в течение двух часов. Затем к полученному раствору добавляли 1М HCl до подкисления водного раствора до pH 3. Полученный в результате продукт **156** в виде белого осадка отфильтровывали (1.6 гр, 55%).

1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ_H 7.72 (1H, д, $J = 15.9$ Гц), 7.13 (2H, д, $J = 7.1$ Гц), 6.90 (1H, д, $J = 8.7$ Гц), 6.30 (1H, д, $J = 15.9$ Гц), 6.10 (2H, ддк, $J = 17.3, 10.1, 5.0$ Гц), 5.45 (2H, ддк, $J = 17.2, 3.2, 1.6$ Гц), 5.33 (2H, дт, $J = 10.5, 1.4$ Гц), 4.66 (4H, дк, $J = 5.2, 1.6$ Гц).

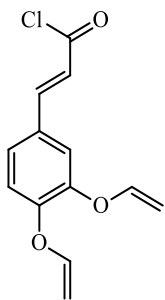
Общая методика синтеза соответствующе защищенных хлорангидридов кофейной кислоты **15г, **15д**:**

В круглодонную колбу поместили соответствующе защищенную кофейную кислоту (**15г**: 2.1 моль, 0.85 гр; **15д**: 6.1 моль, 1.6 гр.) и растворили в толуоле. Затем при помощи капельной воронки постепенно добавляли 1.5 эквивалента тионил хлорида (**15г**: 2.4 моль, 0.18 мл; **15д**: 7.3 моль, 0.53 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре 100 °С в течение 2 часов. Затем полученный раствор упаривали при помощи роторного испарителя. Далее соответствующе защищенный хлорангидрид кофейной кислоты был использован в следующей реакции без дополнительной очистки.



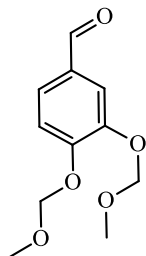
(E)-3-(3,4-бис(третбутилдиметилсилил)окси)фенил)акрилоил хлорид (15г**)**

Продукт получен в виде розового порошка (0.9 гр., количественно). В следующей реакции соединение **15г** использовали без дополнительной очистки.



(E)-3-(3,4-бис(винилокси)фенил)акрилоил хлорид (15д)

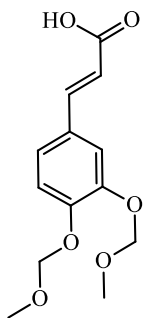
Продукт получен в виде светло-желтого порошка (1.7 гр., количественно). Соединение **15д** было использовано в следующей стадии без дополнительной очистки.



3,4-бис(метоксиметокси)бензальдегид (18)

В круглодонную колбу поместили 3,4 – дигидрокибензальдегид **17** (0.014 моль, 2 гр.) и 6 эквивалентов метоксиметилхлорида (0.086 моль, 7 гр.). Далее полученную смесь растворили в 50 мл ацетона и добавили 5 эквивалентов K_2CO_3 (0.07 моль, 9.7 гр.). Реакционную смесь перемешивали при кипячении в течение четырех часов, далее перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. После прохождения реакции реакцию смесь обработали водой и дважды проэкстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили K_2CO_3 и упаривали на роторном испарителе. Полученный остаток чистили на прямофазной хроматографической колонке с силикагелем в системе этилацетат – гексан в соотношении 1:2. В результате был получен необходимый продукт **18** в виде светло-розового порошка (1.8 гр., 59%).

1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ_H 9.94 (1H, с), 7.63 (1H, дд, $J = 8.4, 1.4$ Гц), 7.40 (1H, дд, $J = 1.8, 0.5$ Гц), 6.98 (1H, дд, $J = 8.4, 0.5$ Гц), 5.33 (2H, с), 5.01 (2H, с), 3.27 (6H, с).



(E)-3-(3,4-бис(метоксиметокси)фенил)акриловая кислота (15в)

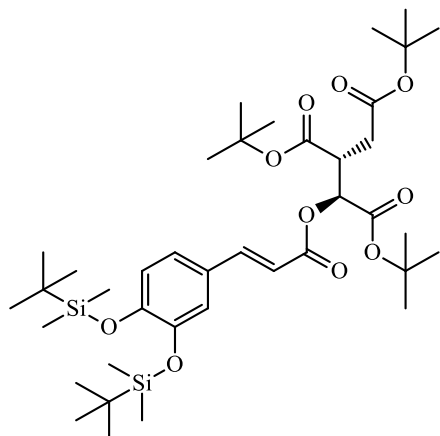
В круглодонную колбу поместили 1.3 эквивалента малоновой кислоты **19** (0.01 моль, 1.1 гр.) и растворили в 30 мл пиридина. Затем к полученному раствору добавили соответствующе защищенный бензальдегид **18** (0.008 моль, 1.8 гр.) и в каталитических количествах N-метилпиперидин (0.8 ммоль, 100 мкл). Реакционную смесь перемешивали при кипячении в течение 4 часов. После прохождения реакции смесь упаривали на роторном испарителе. Затем к полученному остатку добавляли 50 мл этилацетата и 10 мл 1М HCl, дважды экстрагировали и сушили Na₂SO₄. После упаривания на роторном испарителе органического слоя необходимый продукт был кристаллизован в виде белого порошка (1.9 гр., 90%).

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ_H 7.73 (1H, д, *J* = 15.9 Hz), 7.4 0 (1H, с), 7.18 (2H, д, *J* = 1.1 Гц), 6.35 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 5.28 (2H, с), 5.27 (2H, с), 3.54 (6H, с).

Общая методика синтеза соответствующе защищенных изоцитратов кофейной кислоты **16a и **16b**:**

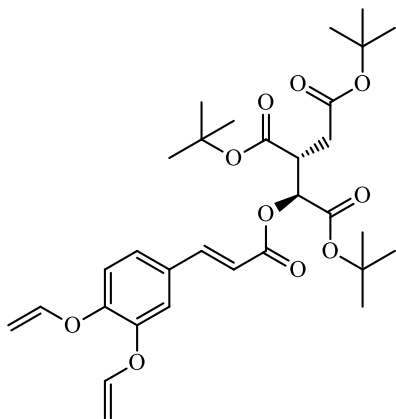
В круглодонную колбу поместили три-третбутиловый эфир изолимонной кислоты **3** (2.8 ммоль, 1 гр.), растворенный в 10 мл хлористого метилена. Затем добавили 1.5 эквивалента ТЭА (4.2 ммоль, 0.6 мл). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут при охлаждении в ледяной бане до 0-5 °С. Затем при помощи капельной воронки к реакционной смеси постепенно прибавляли раствор соответствующе защищенного хлорангидрида кофейной кислоты, растворенный в 5 мл хлористого метилена (**15г**: 3.5 ммоль, 1.49 гр.; **15д**: 3.5 ммоль, 0.97 гр). Полученный желтый раствор перемешивался в течение 16 часов и затем был обработан 1М раствором соляной кислоты, проэкстрагирован дважды хлористым метиленом и высушен над Na₂SO₄. Органический слой был упарен на роторном испарителе. Полученный в результате продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (**16a**: ЭА – гексан = 1:6; **16b**: ЭА – гексан = 1:10) в виде бесцветного масла (**16a**: 0.51 гр, 43%; **16b**: 0.23 гр, 28%).

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ_H 7.73 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 7.40 (1H, д, *J* = 16.7 Гц), 7.19 (2H, д, *J* = 1.1 Гц), 6.35 (1H, д, *J* = 15.9 Hz), 5.28 (3H, д, *J* = 3.3 Гц), 3.55 (3H, с), 3.53 (3H, с).



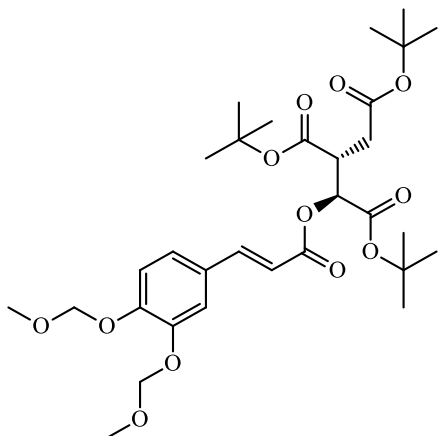
**(1*S*,2*R*)-три-третбутил-1-(((*E*)-3-(3,4-
бис((третбутилдиметилсилил)окси)фенил)акрилоил) окси)пропан-1,2,3-
трикарбоксилат (16а)**

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ_{H} 7.68 (1H, д, $J = 15.9$ Гц), 7.07 (1H, с), 7.07 (1H, с), 6.89 (1H, с), 6.33 (1H, д, $J = 15.9$ Гц), 5.34 (1H, д, $J = 3.3$ Гц), 3.50-3.52 (1H, м), 2.81 (1H, дд, $J = 16.8, 9.8$ Гц), 2.52 (1H, дд, $J = 16.8, 4.8$ Гц), 1.56 (9H, с), 1.56 (9H, с), 1.53 (9H, с), 1.07 (9H, с), 1.06 (9H, с), 0.29 (6H, с), 0.28 (6H, с); ^{13}C ЯМР (700 МГц, CDCl_3): 170.6, 169.3, 166.9, 166.1, 149.7, 147.2, 146.0, 127.9, 122.5, 121.1, 120.5, 114.5, 82.8, 81.9, 81.0, 72.1, 43.9, 33.9, 28.1, 25.9, 25.7, 0.0, -2.9, -4.0; HRMS: вычислено $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{39}\text{H}_{67}\text{O}_{10}\text{Si}_2$ 751.4267, $[\text{M}+\text{H}]^+$ найдено 751.4273.



(1S,2R)-три-третбутил-1-(((E)-3-(3,4-бис((винилокси)фенил)акрилоил)окси)пропан-1,2,3-трикарбоксилат (166)

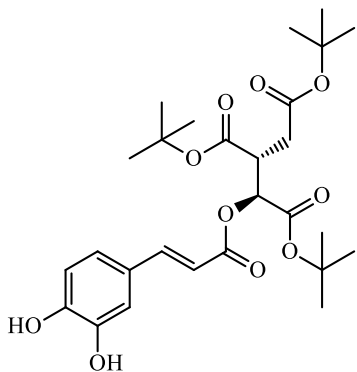
¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ_H 7.72 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 7.14 (1H, с), 7.14 (1H, с), 6.94 (1H, с), 6.35 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 6.16 (1H, ддд, *J* = 9.4, 7.4, 4.7 Гц), 6.13 (1H, ддд, *J* = 10.5, 7.4, 4.7 Гц), 5.51 (1H, дд, *J* = 3.4, 1.5 Гц), 5.49 (1H, дд, *J* = 3.4, 1.5 Гц), 5.37 (2H, дд, *J* = 3.4, 1.5 Гц), 5.35 (2H, дд, *J* = 3.4, 1.5 Гц), 5.35 (1H, д, *J* = 3.6 Гц), 4.71 (2H, д, *J* = 5.6 Гц), 4.70 (2H, д, *J* = 5.6 Гц), 3.50-3.52 (1H, м), 2.81 (1H, дд, *J* = 16.8, 9.8 Гц), 2.52 (1H, дд, *J* = 16.8, 9.8 Гц), 1.56 (9H, с), 1.55 (9H, с), 1.53 (9H, с); ¹³C ЯМР (700 МГц, CDCl₃): 170.6, 169.4, 166.9, 166.0, 151.0, 148.6, 146.0, 133.1, 132.9, 127.5, 123.0, 118.0, 117.9, 114.7, 113.5, 112.8, 82.8, 81.9, 81.0, 72.0, 70.0, 69.8, 43.9, 33.9, 28.1; HRMS: вычислено [M+H]⁺ C₃₃H₄₇O₁₀ 603.3163 [M+H]⁺ найдено 603.3170.



**(1*S*,2*R*)-тритретбутил-1-(((*E*)-3-(3,4-
бис(метоксиметокси)фенил)акрилоил)окси) пропан-1,2,3-трикарбоксилат (16в)**

В круглодонную колбу, снабженную насадкой для ввода аргона, поместили соответствующе защищенную кофейную кислоту **15в** (9.1 ммоль, 2.4 гр) и растворили в 20 мл хлористого метилена. Затем к полученному раствору добавили тритретбутиловый эфир изолимонной кислоты **3** (7 ммоль, 2.5 гр), растворенный в 10 мл хлористого метилена. Реакционную смесь охладили в ледяной бане до 0-5 °С и добавили ДМАП в качестве катализатора (0.7 ммоль, 85 мг). Затем при помощи капельной воронки постепенно добавляли 1.3 эквивалента ДИК (9.1 ммоль, 1.4 мл). Полученный в результате раствор перемешивали в течение 16 часов. Далее реакционная смесь была отфильтрована, маточный раствор упаривали при помощи роторного испарителя. Целевой продукт **16в** был выделен в виде бесцветного масла при помощи прямофазной колоночной хроматографии на силикагеле в система этилацетат – гексан = 1:3 (3.7 гр, 87%).

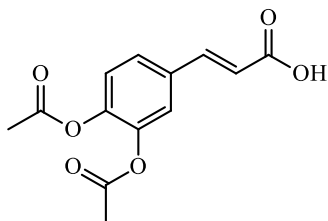
¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ_H 7.64 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 7.35 (1H, с), 7.13 (1H, с), 7.13 (1H, с), 6.34 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 5.28 (1H, d, *J* = 3.6 Гц), 5.25 (2H, с), 5.22 (2H, с), 3.52 (3H, с), 3.50 (3H, с), 3.40-3.46 (1H, м), 2.73 (1H, дд, *J* = 16.8, 9.8 Гц), 2.44 (1H, дд, *J* = 16.8, 4.8 Гц), 1.48 (9H, с), 1.48 (9H, с), 1.42 (9H, с); ¹³C ЯМР (300 МГц, CDCl₃): 170.5, 169.3, 166.8, 165.8, 149.4, 147.4, 145.5, 128.4, 123.7, 116.1, 115.9, 115.4, 95.5, 95.1, 82.7, 81.8, 80.9, 72.0, 56.3, 56.3, 43.9, 33.7, 28.0; HRMS: вычислено [M+H]⁺ C₃₁H₄₇O₁₂ 611.3062 [M+H]⁺ найдено 611.3069.



(1S,2R)-три-третбутил-1-(((E)-3-(3,4-дигидроксифенил)акрилоил)окси)пропан-1,2,3-трикарбоксилат (4)

В круглодонную колбу поместили изоцитрат кофейной кислоты **16в** (6.1 ммоль, 3.7 гр), растворенный в смеси ацетонитрил – вода в соотношении 5:1. Затем к реакционной смеси при помощи капельной воронки постепенно добавляли 3 эквивалента ТФУ (18.3 ммоль, 1.4 мл). Полученный в результате раствор перемешивали при нагревании 50 °С в течение 10 часов. После прохождения реакции реакционную смесь обработали насыщенным водным раствором NaHCO₃ и проэкстрагировали дважды этилацетатом, затем органические слои сушили с помощью Na₂SO₄ и упаривали на ротаторном испарителе. Ключевой интермедиат **4** в виде бесцветного масла был выделен при помощи прямофазной колоночной хроматографии на силикагеле в система этилацетат – гексан в соотношении 1:2 (1.7 гр, 53%)

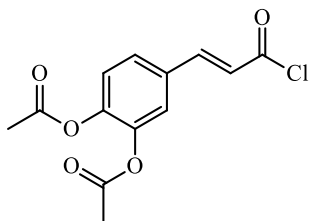
¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ_H 7.54 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 6.99 (1H, с), 6.86 (1H, с), 6.85, (1H, с), 6.59 (1H, уширенный с, OH), 6.17 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 6.03 (1H, уширенный с, OH), 5.31 (1H, д, *J* = 3.3 Гц), 3.45-3.51 (1H, м), 2.77 (1H, дд, *J* = 16.8, 9.7 Гц), 2.47 (1H, дд, *J* = 16.8, 5.2 Гц), 1.52 (9H, с), 1.51 (9H, с), 1.48 (9H, с); ¹³C ЯМР (300 МГц, CDCl₃): 170.7, 169.5, 167.6, 166.3, 146.6, 146.3, 144.1, 127.1, 122.4, 115.5, 114.4, 113.9, 83.4, 82.3, 81.3, 71.9, 43.9, 34.0, 28.0; HRMS: вычислено [M+H]⁺ C₂₇H₃₉O₁₀ 523.2537 [M+H]⁺ найдено 523.2536.



(*E*)-3-(3,4-диацетоксифенил)акриловая кислота (20a)

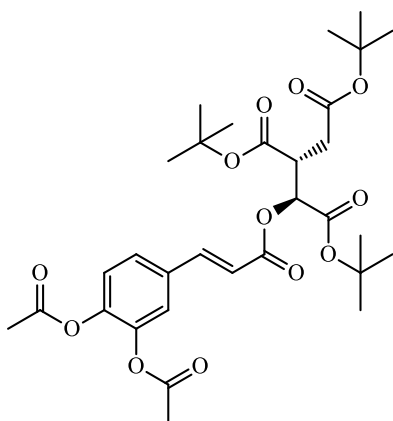
В круглодонную колбу поместили 3,4-дигидроксикоричную кислоту **1** (15 ммоль, 2.8 гр) и 15 мл хлористого метилена, охладили при помощи жидкого азота до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем добавляли 5 эквивалентов уксусного ангидрида (77 ммоль, 5,5 мл) и при помощи капельной воронки постепенно прикапывали 10 эквивалентов пиридина (0.15 моль, 12.1 мл). Реакционную смесь отогрели до комнатной температуры и далее перемешивали в течение 16 часов. Прохождение реакции контролировали при помощи ТСХ в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:2. Полученную реакционную смесь упаривали на роторном испарителе, растворяли полученный остаток в хлористом метилена (15 мл), обрабатывали охлажденной льдом разбавленной 1М соляной кислотой до pH 4. Органический слой сушили Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Затем добавляли гексан (10 мл), перемешивали 10 минут и полученный осадок фильтровали через пористый стеклянный фильтр. В результате перекристаллизации получили целевой бис-ацетил-защищенный продукт **20a** в виде белых кристаллов (3.8 гр, 91%).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ_{H} 7.74 (1H, д, $J = 16.0$ Гц), 7.50 – 7.37 (2H, м), 7.28 (1H, с), 6.41 (1H, д, $J = 16.0$ Гц), 2.33 (6H, с).



(E)-4-(3-хлоро-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-1,2-фенилен диацетат (206)

В круглодонную колбу поместили соответствующе защищенную кофейную кислоту **20a** (0.014 моль, 3.7 гр) и растворили в 30 мл толуола. Далее при помощи капельной воронки, постепенно прикапывали 1.2 эквивалента тионилхлорида (0.017 моль, 1.2 мл). К реакционной смеси добавили каплю ДМФ (2 мкл) в качестве катализатора, снабдили колбу обратным холодильником с отводом газа и перемешивали при температуре 80 °С в течение 2 часов. Затем реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Целевой хлорангидрид **206** был получен с количественным выходом в виде розового порошка (4 гр, 100%). Далее он был введен в следующую реакцию без дополнительной очистки.

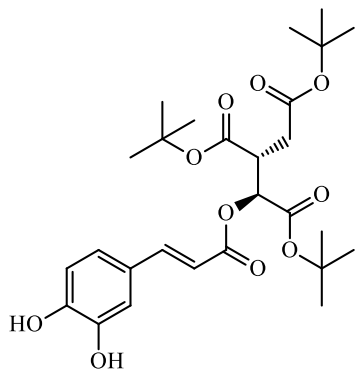


(1S,2R)-три-третбутил-1-(((E)-3-(3,4-диацетоксифенил)акрилоил)окси)пропан-1,2,3-трикарбоксилат (21)

В круглодонную колбу, снабженную капельной воронкой, поместили три-третбутиловый эфир изолимонной кислоты **3** (0.013 моль, 4.6 гр), хлористый метилен (30 мл) и добавили 1.2 эквивалента пиридина (0.016 моль, 1.25 мл). Полученную реакционную смесь охлаждали в ледяной бане до 0-5 °С и постепенно прикапывали растворенный в хлористом метиле (20 мл) хлорангидрид **206** (0.014 моль, 4.0 гр). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов. Прохождение реакции контролировали при помощи ТСХ в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:4. Затем реакционную смесь обрабатывали 1М соляной кислотой до pH 3. Полученный органический раствор сушили Na₂SO₄ и упаривали на роторном испарителе. Далее

целевое соединение **21** выделяли при помощи прямофазной силикагельной хроматографии в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:4. Эфир тритретбутилового эфира изолимонной кислоты 3,4-бисацилкоричной кислоты **21** был получен в виде порошка белого цвета (6.5 гр, 82%).

^1H ЯМР (600 МГц, CDCl_3): δ_{H} 7.69 (1H, дд, $J = 8.4, 1.9$ Гц), 7.42 (1H, д, $J = 1.9$ Гц), 7.37 (1H, д, $J = 1.9$ Гц), 7.25 (1H, д, $J = 8.4$ Гц), 6.44 (1H, д, $J = 16.0$ Гц), 5.30 (1H, д, $J = 3.4$ Гц), 3.44 – 3.48 (1H, м), 2.76 (1H, дд, $J = 16.7, 9.8$ Гц), 2.47 (1H, дд, $J = 16.8, 5.0$ Гц), 2.33 (3H, с), 2.32 (3H, с), 1.51 (9H, с), 1.50 (9H, с), 1.48 (9H, с); ^{13}C ЯМР (600 МГц, CDCl_3): 170.0, 168.7, 167.5, 167.5, 166.1, 164.9, 143.6, 143.2, 141.9, 132.6, 126.0, 123.5, 122.4, 117.7, 82.4, 81.4, 80.5, 71.8, 43.3, 33.3, 27.5, 20.1; HRMS: вычислено $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{O}_{12}$ 607.2749 $[\text{M}+\text{H}]^+$ найдено 607.2745.

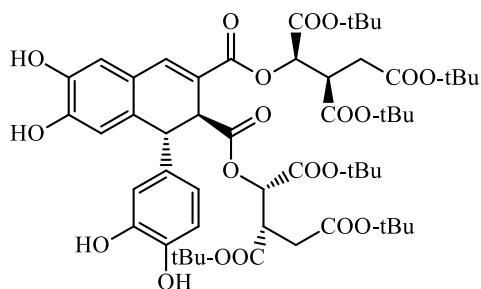


(1*S*,2*R*)-три-третбутил-1-(((*E*)-3-(3,4-дигидроксифенил)акрилоил)окси)пропан-1,2,3-трикарбоксилат (4)

В круглодонную колбу поместили соединение **21** (0.011 моль, 6.5 гр) и растворили в ТГФ (50 мл). Реакционную смесь охладили в ледяной бане до 0-5 °С и затем прикапывали при помощи капельной воронки 2,2 эквивалента *N*-метилпиперазина (0.023 моль, 2.6 мл), растворенного в ТГФ (10 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре. Прохождение реакции контролировали при помощи ТСХ в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:4. Далее упаривали ТГФ на роторном испарителе до объема ~ 10 мл, добавляли этилацетат (30мл) и обрабатывали 1М соляной кислотой до рН 4. Органический раствор сушили Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Далее соединение выделяли при помощи прямофазной силикагельной хроматографии в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:4. Целевое соединение **4** получили в виде масла светло-желтого цвета (5.5 гр, 96%).

^1H ЯМР (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Гц), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Гц), 6.93 – 6.88 (2H, м), 6.22 (1H d, $J = 15.9$ Гц), 5.36 (1H, d, $J = 3.3$ Гц), 3.54 (1H, ddd, $J = 9.7, 5.2, 3.4$ Гц), 2.82 (1H, dd, $J = 16.8, 9.7$ Гц), 2.53 (1H, dd, $J = 16.8, 5.1$ Гц), 1.57 (9H, с), 1.56 (9H, с), 1.53 (9H, с); HRMS: вычислено $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{O}_{10}$ 523. 2537 $[\text{M} + \text{H}]^+$ найдено 523.2539.

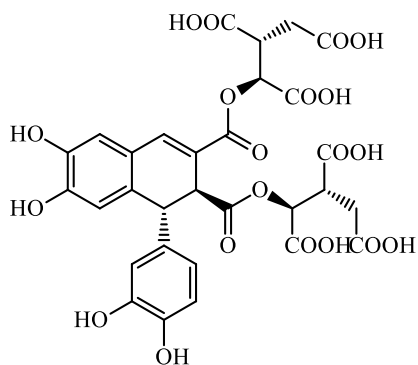
4.2.3 Получение севанола s706 и его аналогов s788, s874, s590, s414, EA.



(1*S*,2*S*)-третрIBUTИЛ 1-(((1*R*,2*S*)-3-(((2*R*,3*R*)-1,5-ДИТРЕТБУТОКСИ-3 (ТРЕТБУТОКСИ КАРБОНИЛ)-1,5-ДИОКСИПЕНТАН-2-ИЛ)ОКСИ)КАРБОНИЛ)-1-(3,4-ДИГИДРОКСИФЕНИЛ)-6,7-ДИГИДРОКСИ-1,2-ДИГИДРОНАФТАЛЕН-2-КАРБОНИЛ)ОКСИ)ПРОПАН-1,2,3-ТРИКАРБОКСИЛАТ (5)

В круглодонную колбу, снабженную капельной воронкой и помещенную в темное помещение при температуре 5 °С, поместили соединение **4** (0,01 моль, 5.5 гр) и ацетонитрил (55 мл). При температуре не выше 5 °С и отсутствии света по каплям прибавляли 10% водный раствор 2,5 эквивалентов FeCl₃ (0,025 моль, 4.06 гр в 40 мл воды). Перемешивали при данной температуре в течение двух часов. Далее реакцию смесь обрабатывали 1М соляной кислотой до pH 4 и экстрагировали толуолом (30 мл). Полученный раствор в толуоле сушат Na₂SO₄ и упаривали на ротационном испарителе при температуре не выше 4 0°С в отсутствии света. Полученный остаток очищали на силикагеле в системе этилацетат-толуол = 4:1 с 3% уксусной кислоты. Целевое соединение **5** получили в виде масла темно-оранжевого цвета (2.25 г, 41%).

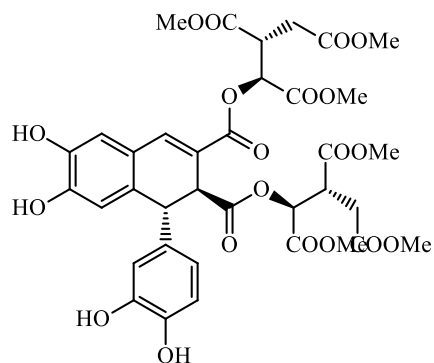
В последующую стадию деблокирования диастереомерная смесь третбутилового эфира севанола **5** была введена без дополнительной очистки.



Севанол (s706)

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, поместили соединение **5** (2.1 ммоль, 2.25 гр) и добавили смесь ТФУ-вода в соотношении 4:1 (40 мл ТФУ : 10 мл вода). Перемешивали при температуре 50 °С в течение 1 часа. Полученную реакционную смесь упаривали на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Полученный остаток массой 1.5 г очищали на препаративной ВЭЖХ. Для очистки на полупрепаративной ВЭЖХ системе Waters 2487 использовался тандем из двух колонок размером 20 x 250 мм, обращенно-фазовые сорбенты 11AD2 11 микрон и LPS-500 70 микрон (ООО “Техносорбент”, Россия) при использовании линейного градиента ацетонитрила (мобильная фаза А: 0.1% ТФУ в воде; мобильная фаза В: ацетонитрил; градиент 2 – 30% В в течение 60 минут при потоке 10 мл/мин; регистрация профиля при УФ поглощении 220 и 280 нм). После лиофилизации собранных фракций был получен порошок светло-желтого цвета (590 мг, 39%)

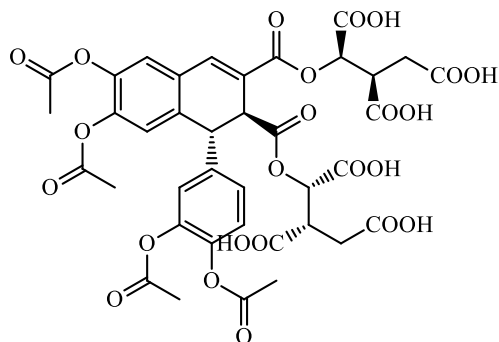
^1H ЯМР (700 МГц, D_2O): δ_{H} 7.75 (1H, с), 7.01 (1H, с), 6.72 (1H, с), 6.68 (1H, д, $J = 8.3$ Гц), 6.62, (1H, д, $J = 1.7$ Гц), 6.43 (1H, дд, $J = 1.7$ Гц, 8.3 Гц), 5.38 (1H, д, $J = 4.0$ Гц), 5.33 (1H, д, $J = 3.4$ Гц), 4.5 (1H, д, $J = 1.9$ Гц), 4.08 (1H, д, $J = 1.9$ Гц), 3.56 – 3.59 (1H, м), 3.45 - 3.47 (1H, м), 2.78 (1H, дд, $J = 9.3$ Гц, 17.2 Гц), 2.6 (1H, дд, $J = 5.2$ Гц, 17.2 Гц), 2.50 (1H, дд, $J = 9.6$ Гц, 17.3 Гц), 2.24 (1H, дд, $J = 9.6$ Гц, 17.3 Гц); ^{13}C ЯМР (300 МГц, D_2O): 175.4, 175.2, 174.2, 173.7, 172.8, 172.7, 171.8, 166.9, 147.5, 143.9, 143.3, 142.8, 141.4, 134.5, 130.7, 123.7, 119.8, 119.6, 117.4, 116.6, 116.1, 115.3, 73.2, 73.2, 46.4, 44.0, 43.2, 42.2, 32.3, 31.8; ИК (KBr): 1709, 2648, 3253; HRMS: M^- вычислено $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{O}_{20}$ 705.0939 (M^-): найдено 705.0941.



Гексаметил-1,1'-((1-(3,4-дигидроксифенил)-6,7-дигидрокси-1,2-дигидронафтаден-2,3-дикарбонил)бис(окси))бис(пропан-1,2,3-трикарбоксилат) (s788)

Севанол **s706** (20 мг, 0.028 ммоль) был растворен в 4М HCl/метанол (1 мл). Полученный раствор перемешивался при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 72 часов. Далее реакционную смесь упаривали на роторном испарителе и очищали при помощи прямофазной хроматографии на силикагеле в этилацетате. Полученный фракции лиофилизовали. Метилловый эфир севанола **s788** был получен в виде светло-желтого порошка (22 мг, 97%)

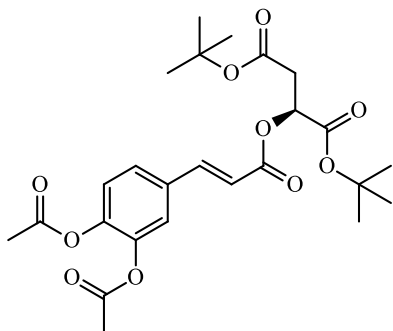
^1H ЯМР (800 МГц, ацетон) δ_{H} : 7.69 (1H, c), 6.99 (1H, c), 6.73 (1H, c), 6.70 (1H, д, $J = 8.1$ Гц), 6.51 (1H, д, $J = 2.2$ Гц), 6.45 (1H, дд, $J = 8.2, 2.2$ Гц), 5.43 (1H, д, $J = 4.1$ Гц), 5.32 (1H, д, $J = 3.9$ Гц), 4.49 (1H, д, $J = 2.0$ Гц), 4.02 (1H, д, $J = 2.0$ Гц), 3.70 (3H, c), 3.68 (3H, c), 3.66 (3H, c), 3.64 – 3.62 (9H, м), 3.57 (1H, дт, $J = 9.3, 4.7$ Гц), 3.49 (1H, дт, $J = 9.1, 4.5$ Гц), 2.71 – 2.65 (2H, м), 2.81 (1H, дд, $J = 17.2, 9.4$ Гц), 2.72 – 2.65 (2H, м), 2.50 (1H, дд, $J = 17.2, 4.9$ Гц); ^{13}C ЯМР (800 МГц, CDCl_3) δ : 171.4, 171.3, 170.5, 170.2, 169.9, 168.1, 167.7, 165.0, 147.9, 139.9, 134.7, 130.3, 123.4, 119.8, 118.6, 116.3, 115.1, 114.5, 78.2, 78.1, 77.9, 71.8, 71.5, 51.8, 46.7, 44.8, 42.9, 42.7, 31.5, 31.3, 29.5; HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ вычислено $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{O}_{20}$ 791.2029 $[\text{M} + \text{H}]^+$ найдено 791.2031.



(1S,2S)-1-(((1R,2S)-6,7-диацетокси-1-(3,4-диацетоксифенил)-3-(((1R,2R)-1,2,3-трикарбоксипропокси)карбонил)-1,2-дигидронафтален-2-карбонил)окси)пропан-1,2,3-трикарбоновая кислота (s874)

В круглодонную колбу поместили севанол **s706** (0.028 ммоль, 20 мг) и 2 мл хлористого метилена, охладили при помощи жидкого азота до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем добавляли 5 эквивалентов уксусного ангидрида (0.14 ммоль, 13.5 мкл) и при помощи капельной воронки постепенно прикапывали 10 эквивалентов пиридина (0.28 ммоль, 22.5 мкл). Реакционную смесь отогревали до комнатной температуры и далее перемешивали в течение 16 часов. Прохождение реакции контролировали при помощи масс-спектрометрического анализа. Полученную реакцию смесь упаривали на роторном испарителе, растворяли полученный остаток в хлористом метилене (5 мл), обрабатывали охлажденной льдом разбавленной 1М соляной кислотой до pH 4. Органический слой сушили Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Далее целевое соединение было очищено при помощи полупрепаративной ВЭЖХ и получено в виде порошка светло-розового цвета (13 мг, 53%).

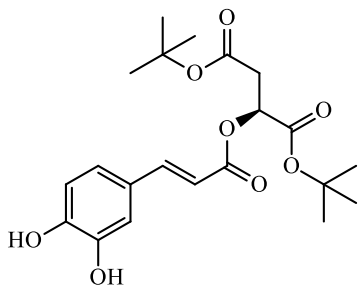
^1H ЯМР (300 МГц, D_2O) δ_{H} : 7.79 (1H, c), 7.37 (1H, c), 7.13 (1H, c), 7.07 (1H, д, $J = 1.3$ Hz), 6.87 (1H, д, $J = 9.3$ Hz), 5.30 (1H, д, $J = 4.1$ Hz), 5.18 (1H, д, $J = 3.8$ Hz), 4.80 – 4.84 (1H, м), 4.23 (1H, д, $J = 2.6$ Гц), 3.49 (1H, дт, $J = 9.4, 4.8$ Гц), 3.37 (1H, дт, $J = 9.2, 4.6$ Гц), 2.72 (2H, дд, $J = 17.3, 9.4$ Гц), 2.52 – 2.55 (2H, м), 2.22 (12H, c); ^{13}C ЯМР (300 МГц, D_2O) δ : 178.0, 176.6, 172.8, 172.0, 170.8, 168.6, 162.7, 143.9, 143.0, 141.2, 135/1, 126.7, 112.2, 110/6, 109.2, 109.1, 108.7, 74.6, 54.9, 51.1, 45.0, 39.5, 38.3, 32.7, 20.8; HRMS: $[\text{M} - \text{H}]^-$ вычислено $\text{C}_{38}\text{H}_{33}\text{O}_{24}$ 873.1367 $[\text{M} - \text{H}]^-$ найдено 873.1374.



(*S,E*)-дитретбутил- 2-((3-(3,4-диацетоксифенил)акрилоил)окси)сукцинат (22**)**

В круглодонную колбу, снабженную капельной воронкой, поместили бистретбутиловый эфир (L)-яблочной кислоты **10** (0.020 моль, 5 гр), хлористый метилен (50 мл) и добавили 1.2 эквивалента пиридина (0.026 моль, 2 мл). Полученную реакцию смесь охлаждали в ледяной бане до 0-5 °С и постепенно прикапывали растворенный в хлористом метиле (20 мл) хлорангидрид **206** (0.022 моль, 6.3 гр). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов. Прохождение реакции контролировали при помощи ТСХ в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:3. Затем реакцию смесь обрабатывали 1М соляной кислотой до pH 3, экстрагировали хлористым метиленом дважды. Полученный органический раствор сушили Na₂SO₄ и упаривали на ротаторном испарителе. Далее целевое соединение **22** выделяли при помощи прямофазной силикагельной хроматографии в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:3. Эфир бистретбутилового эфира (L)-яблочной кислоты 3,4-бисацетилкоричной кислоты **22** был получен в виде бесцветного масла (8 гр, 81%).

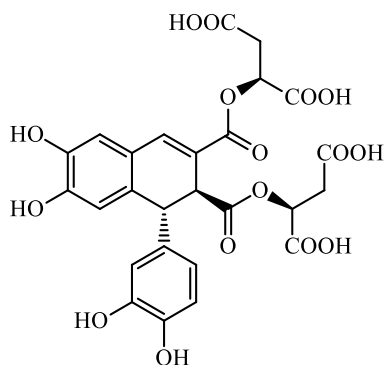
¹H ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ_H: 7.69 (1H, д, *J* = 16.0 Гц), 7.42 (1H, дд, *J* = 8.4, 2.1 Гц), 7.37 (1H, д, *J* = 2.1 Гц), 7.24 (1H, д, *J* = 8.4 Гц), 6.45 (1H, д, *J* = 16.0 Гц), 5.45 (1H, дд, *J* = 7.9, 4.7 Гц), 2.88 – 2.80 (2H, м), 2.32 (3H, с), 2.32 (3H, с), 1.49 (9H, с), 1.47 (9H, с); ¹³C ЯМР (600 МГц, CDCl₃): 167.9, 167.5, 167.5, 164.9, 143.4, 143.1, 141.9, 132.64, 126.02, 123.5, 122.3, 117.8, 82.2, 81.1, 68.8, 37.1, 27.5, 27.5, 20.1, 20.1; HRMS: [M + H]⁺ вычислено C₂₅H₃₃O₁₀ 493.2068 [M + H]⁺ найдено 493.2065.



(*S,E*)-ди-третбутил 2-((3-(3,4-дигидроксифенил)акрилоил)окси)сукцинат (23**)**

В круглодонную колбу поместили соединение **22** (0.01 моль, 5 гр) и растворили в ТГФ (50 мл). Реакционную смесь охладили в ледяной бане до 0-5 °С и затем прикапывали при помощи капельной воронки 2,2 эквивалента N-метилпиперазина (0.022 моль, 2.5 мл), растворенного в ТГФ (10 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре. Прохождение реакции контролировали при помощи ТСХ в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:2. Далее упаривали ТГФ на роторном испарителе до объема ~ 10 мл, добавляли этилацетат (30мл) и обрабатывали 1М соляной кислотой до pH 4. Органический раствор сушили Na₂SO₄ и упаривали на роторном испарителе. Далее соединение выделяли при помощи прямофазной силикагельной хроматографии в системе этилацетат-гексан в соотношении 1:2. Целевое соединение **23** получили в виде масла светло-желтого цвета (3.4 гр, 85%).

¹H ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ_H: 7.53 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 7.00 (1H, д, *J* = 1.7 Гц), 6.87 (1H, дд, *J* = 8.2, 1.8 Гц), 6.84 (1H, д, *J* = 8.2 Гц), 6.71 (1H, уширенный, OH), 6.28 (1H, уширенный, OH), 6.17 (1H, д, *J* = 15.9 Гц), 5.45 (1H, дд, *J* = 6.7, 5.8 Гц), 2.89 – 2.84 (2H, м), 1.52 (9H, с), 1.49 (9H, с); ¹³C ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ: 168.5, 165.9, 146.2, 145.9, 143.7, 126.7, 121.9, 114.9, 113.9, 113.4, 82.8, 81.6, 68.5, 37.1, 27.5, 27.5; HRMS: [M + H]⁺ вычислено C₂₁H₂₉O₈ 409.1857 [M + H]⁺ найдено 409.1861.

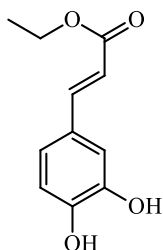


(2S,2'S)-2,2'-(((1R,2S)-1-(3,4-дигидроксифенил)-6,7-дигидрокси-1,2-дигидронафтаден-2,3-дикарбонил)бис(окси))дисукциновая кислота (s590)

Сложный эфир кофейной кислоты и дитретбутил защищенной яблочной кислоты **23** (1.2 ммоль, 0.5 гр.) растворили в 5 мл ацетонитрила и охладили до 5 °С при перемешивании в отсутствие света. Далее при помощи капельной воронки постепенно добавляли раствор FeCl₃ в 5 мл воды. Реакционная смесь перемешивалась при 5 °С и в отсутствие доступа света в течение двух часов. После прохождения реакции полученная смесь темно-зеленого цвета была аккуратно обработана ледяным раствором 0.1 М HCl (20 мл) и дважды проэкстрагирована толуолом. Органический слой сушили Na₂SO₄ и упаривали на роторном испарителе. Полученный остаток чистили при помощи прямофазной колоночной хроматографии на силикагеле в системе толуол – этилацетат в соотношении 4:1 в присутствии 4% уксусной кислоты. Полученный третбутил защищенный продукт димеризации в виде темно-желтого масла был обработан 20% водным раствором ТФУ (ТФУ – вода = 4:1) при нагревании 50 °С в течение 45 минут. После прохождения реакции гидролиза защитных групп растворитель был упарен при помощи роторного испарителя, полученный остаток очищен с использованием полупрепаративной ВЭЖХ системы на обращенно-фазовой колонке. Для очистки использовалась полупрепаративная система ВЭЖХ Waters 515 с применением тандема из двух колонок размером 20 × 250 мм, обращенно-фазовым сорбентом 11AD2 11 микрон, LPS-500 70 микрон (ООО «Техносорбент», Россия), линейного градиента ацетонитрила (мобильная фаза А: 0.1 % ТФУ в воде; мобильная фаза В: ацетонитрил; градиент 10-60% в течение 60 минут при потоке 10 мл/мин; регистрация профиля при УФ поглощении на 254 и 280 нм). В результате лиофилизации собранных чистых фракций был получен аналог севанола **s590** в виде светло-желтого порошка (124 мг, 17%).

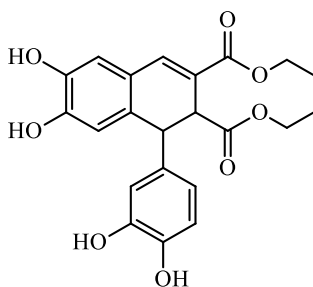
¹H ЯМР (600 МГц, D₂O) δ_H: 7.69 (1H, дд, *J* = 5.3, 2.1 Гц), 6.92 (1H, д, *J* = 2.3 Гц), 6.65 (1H, д, *J* = 2.1 Гц), 6.61 (1H, дд, *J* = 23.3, 2.3 Гц), 6.55 (1H, дд, *J* = 6.3, 2.2 Гц), 6.37

(1H, дд, $J = 8.4, 2.0$ Гц), 5.34 (1H, дд, $J = 7.0, 4.2$ Гц), 5.25 (1H, дд, $J = 7.4, 3.7$ Гц), 4.46 – 4.37 (1H, м), 4.03 – 3.94 (1H, м), 2.98 – 2.88 (2H, м), 2.84 – 2.73 (2H, м); ^{13}C ЯМР (600 МГц, D_2O) δ : 173.4, 172.7, 173.0, 166.9, 147.3, 143.9, 143.2, 142.8, 141.1, 134.8, 134.4, 130.7, 123.6, 119.8, 119.5, 117.3, 116.5, 116.3, 116.1, 115.3, 115.1, 69.4, 69.2, 46.5, 46.4, 44.5, 44.2, 35.7, 35.4; HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ вычислено $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{O}_{16}$ 591.0980 ($[\text{M} + \text{H}]^+$ найдено 591.0986).



(E)-этил 3-(3,4-дигидроксифенил)акрилат (24)

В круглодонной колбе растворили кофейную кислоту (0.01 моль, 2 гр) в 50 мл абсолютного этанола, добавили 50 мкл серной кислоты в качестве катализатора и кипятили в течение 16 часов. После прохождения реакции реакционную смесь упарили на роторном испарителе, полученный твердый остаток этилового эфира кофейной кислоты **24** использовали в следующей стадии без дополнительной очистки (2.3 гр, количественно).

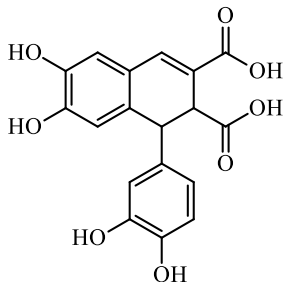


Диэтил 1-(3,4-дигидроксифенил-6,7-дигидрокси-1,2-дигидронафтален-2,3-дикарбоксилат (s414)

Этиловый эфир кофейной кислоты **24** (7.2 ммоль, 1.5 гр) растворили в 15 мл ацетонитрила и охладили до 5 °С. Затем при помощи капельной воронки постепенно добавляли раствор FeCl₃ (18 ммоль, 2.9 гр) в 30 мл воды при температуре 5 °С в отсутствие доступа света. Полученная реакционная смесь перемешивалась при данных условиях в течение двух часов. После прохождения реакции взвесь темно-зеленого цвета была обработана 50 мл воды и дважды проэкстрагирована толуолом. Собранные органические слои сушили Na₂SO₄ и упаривали на роторном испарителе. Далее остаток очищали при помощи прямофазной колоночной хроматографии в системе этилацетат – гексан в соотношении 1:1. В результате был получен необходимый диэтиловый эфир эпифиловой кислоты **s414** в виде темно-желтого порошка (0.5 гр, 37%).

¹H ЯМР (600 МГц, ацетон-d₆) δ_H: 7.57 (1H, с), 6.96 (1H, с), 6.71 (1H, д, *J* = 8.1 Гц), 6.63 (1H, с), 6.51 (1H, д, *J* = 2.2 Гц), 6.46 (1H, дд, *J* = 8.2, 2.2 Гц), 4.44 (1H, д, *J* = 3.3 Гц), 4.20 – 4.12 (2H, м), 4.09 – 3.99 (2H, м), 3.89 (1H, д, *J* = 3.2 Гц), 1.26 (3H, т, *J* = 7.1 Гц), 1.13 (3H, т, *J* = 7.1 Гц); ¹³C ЯМР (600 МГц, ацетон-d₆) δ: 147.2, 144.7, 144.1, 143.7,

137.1, 135.2, 130.0, 123.9, 122.6, 118.8, 116.1, 115.8, 115.0, 114.6, 60.3, 59.9, 47.6, 45.4, 29.4, 29.3, 29.1, 13.6, 13.5; HRMS: $[M + H]^+$ вычислено $C_{22}H_{23}O_8$ 415.1387 $[M + H]^+$ найдено 415.1390.



Эпифиловая кислота (EA)

Диэтиловый эфир эпифиловой кислоты **s414** (0.46 ммоль, 0.2 гр) растворили в 20 мл диоксана и добавили к полученному раствору 10 мл 4М HCl в диоксане. Полученный раствор перемешивали при кипячении в течение 16 часов и затем упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали при помощи полупрепаративной ВЭЖХ с колонкой на обращенной фазе. Для очистки использовали полупрепаративную систему ВЭЖХ Waters 515 с использованием тандема из двух колонок размером 20 x 250 мм, обращенно-фазовым сорбентом 11AD2 11 микрон и LPS-500 70 микрон (ООО «Техносорбент», Россия) с линейным градиентом этанола (мобильная фаза А: 0.2 % ТФУ в воде; мобильная фаза В: этанол; градиент 20-60% в течение 60 минут при потоке 1- мл/мин; профиль регистрировался при помощи УФ поглощения на 254 и 280 нм). В результате лиофилизации собранных чистых фракций была получена эпифиловая кислота **EA** в виде светло-розового порошка (63 мг, 35%).

1H ЯМР (600 МГц, $CDCl_3$) δ_H : 7.64 (1H, c), 6.94 (1H, c), 6.68 (1H, д, $J = 8.3$ Гц), 6.65 (1H, c), 6.59 (1H, д, $J = 2.2$ Гц), 6.43 (1H, dd, $J = 8.3, 2.2$ Гц), 4.41 (1H, д, $J = 3.2$ Гц), 3.83 (1H, д, $J = 3.1$ Гц); ^{13}C ЯМР (600 МГц, $CDCl_3$) δ : 170.0, 146.4, 143.4, 142.7, 142.3, 139.1, 134.8, 130.0, 123.5, 121.4, 119.1, 116.5, 115.9, 115.6, 114.7, 46.7, 44.3; HRMS: $[M + H]^+$ вычислено $C_{18}H_{15}O_8$ 359.0761 $[M + H]^+$ найдено 359.0762.

5. Выводы

1. Методом полного синтеза подтверждена структура природного лигнана севанола – ингибитора протон-чувствительных ионных каналов (ASIC1a и ASIC3).
2. Разработан и оптимизирован препаративный метод синтеза севанола из широко доступных веществ за 9 стадий с общим выходом 8%. Полученные образцы севанола позволили провести полномасштабные биологические тесты *in vitro*, *in vivo* и доклиническое испытание этого перспективного анальгетического препарата.
3. Разработаны методы синтеза ряда аналогов севанола для характеристики их взаимодействия с ASIC-каналами.
4. Проведено исследование влияния функциональных групп и стереоизомерии севанола и его аналогов на эффективность ингибирования ASIC-токов в электрофизиологических исследованиях.

6. Благодарности

Автор выражает большую благодарность своему научному руководителю к.х.н. Кублицкому Вадиму Сергеевичу за помощь в выполнении диссертационной работы, поддержку и бесценный опыт огромной синтетической работы с разнообразными соединениями, потенциально обладающими биологической активностью. Автор выражает большую благодарность д.х.н. Ямпольского Илью Викторовича за мотивацию, помощь и бесценную поддержку на финальных этапах диссертационной работы. Также автор сердечно благодарит к.х.н. Баранова Михаила Сергеевича за полезные советы и поддержку на финальных этапах написания и оформления работы. Автор благодарит сотрудников коллектива расформированной лаб. Биофармацевтики ИБХ РАН, а именно Шмыгарева Владимира Ильича, к.х.н. Яцкина Олега Николаевича, к.х.н. Хрущева Алексея Юрьевича, Свищеву Наталью Витальевну и д.б.н. Дейгина Владислава Исаковича за помощь и содействие при выполнении начальных и хроматографических работ по исследованию нового лигнана севанол. Особую трепетную благодарность автор выражает сотрудникам лаб. Нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН, где проводились биологические тесты синтезированного севанола, в частности к.х.н. Осмакову Дмитрию Игоревичу, к.б.н. Андрееву Ярославу Алексеевичу и д.х.н. Козлову Сергею Александровичу. Автор выражает благодарность коллективу лаб. Моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН под руководством профессора д.ф.-м.н. Ефремова Романа Гербертовича, в том числе к.ф.-м.н. Чугунову Антону Олеговичу. Огромную благодарность автор выражает коллективу лаб. Биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН за регистрацию ЯМР-спектров и подтверждение структуры синтетического севанола, а в частности к.ф.-м.н. Дубинному Максиму Анатольевичу.

7. Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Осмаков Д. И., Кошелев С. Г., **Белозерова О. А.**, Кублицкий В. С., Андреев Я. А., Гришин Е. В., Козлов С. А. Биологическая активность севанола и его аналогов. // Биоорганическая химия. 2015, Т. 41 № 5. С. 606-611.
2. **Belozeroва O.**, Deigin V., Dubinnyi M., Khrushchev A., Kublitski V. The total synthesis of sevanol, a novel lignan isolated from thyme plant (*Thymus armeniacus*) // Tetrahedron. 2018, Т. 74 № 13, С. 1449-1453.
3. **Belozeroва O. A.**, Osmakov D. I., Vladimirov A., Koshelev S.G., Chugunov A. O., Andreev Y. A., Palikov V. A., Palikova Y. A., Shaykhutdinova E. R., Gvozd A. N., Dyachenko I. A., Efremov R. G., Kublitski V. S., Kozlov S. A. Sevanol and Its Analogues: Chemical Synthesis, Biological Effects and Molecular Docking // Pharmaceuticals. 2020, Т. 13. № 8. С. 1-21.
4. Кублицкий В. С., **Белозерова О. А.**, Дейгин В. И., Дьяченко И. А., Козлов С. А. Патент на изобретение СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИГНАНА, ОБЛАДАЮЩЕГО АНАЛЬГЕТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ, №2019102555/04(004552)

Тезисы докладов на конференциях

1. **Belozeroва O.**, Osmakov D., Deigin V., Kublitski V. Total synthesis and biological activity of sevanol, a novel lignan isolated from thyme “*Thymus Armeniacus*” // August 27-31, 2017. Abstracts EFMC/ASMC17. – С. 325 // VII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Vienna, Austria
2. **Белозерова О.**, Осмаков Д., Дубинный М., Дейгин В., Кублицкий В. Синтез и биологическая активность севанола, нового лигнана, выделенного из чабреца *Thymus Armeniacus*. // ActaNaturae. 2017. спецвыпуск, С. 90.
3. Osmakov D., **Belozeroва O.**, Koshelev S., Andreev Y., Dubinnyi M., Efremov R., Chugunov A., Kublitski V., Kozlov S. Mode of action and biological activity of sevanol and its analogues on acid-sensing ion channels. FEBS Open Bio 9 (S1) Supplement: 44th FEBS Congress, From Molecules to Living Systems, Krakow, Poland, July 6-11, 2019

8. Список сокращений и условных обозначений

ASIC	протон-чувствительный ионный канал
CFA	адьювант Фрейнда
HPLC / ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
HRP	пероксидаза хрена
LAH	литий алюмогидрид
LCMS	метод жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией
LDA	литий диизопропиламид
LiHMDS	литий бис(триметил-силил)амид
NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
MOM	метоксиметил
PG	защитная группа
TBAF	тетрабутиламмоний фторид
TBDMS	третбутилдиметилсилил
TFAA	ангидрид трифторуксусной кислоты
TfOH	трифликовая кислота
АК	арахионовая кислота
ДИК	диизопропилкарбадиимид
ДМАП	диметиламинопиридин
ДМФ	диметилформамид
НПВП	нестероидные противовоспалительные препараты
НПВС	нестероидные противовоспалительные средства
ПНС	периферическая нервная система
ТГФ	тетрагидрофуран
ТФУ	трифторуксусная кислота
ТЭА	триэтиламин
ЦНС	центральная нервная система
ЯМР	спектроскопия ядерного магнитного резонанса

9. Список литературы

- [1] Ward R. S. Lignans, neolignans, and related compounds // *Nat. Prod. Rep.* 1993. Т. 10. С. 1-28.
- [2] Teponno R.B., Kusari S., Spiteller M. // *Nat. Prod. Rep.* 2016. Т. 33. С. 1044
- [3] Gang D.R., Dinkova-Kostova A.T., Davin L.B., N.G. // *ACS Symposium Series.* 1997. Т. 658. С. 58-89
- [4] Zhang J., Chen J., Liang Z., Zhao C. // New lignans and their biological activities. *Chemistry&Biodiversity*, 2014 Т. 11. С. 1-54.
- [5] Weiss S.G., Tin-Wa M., Perdue R.E., Farnsworth N.R. // *J. Pharm. Sci.* 1975. Т. 64, С. 95
- [6] Dubinnyi M.A., Osmakov D.I., Koshelev S.G., Kozlov S.A., Andreev Ya. A., Zakaryan N.A., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Arseniev A.S., Grishin Eu.V. // *J. Biol. Chem.* 2012. Т. 287. С. 32993-33000.
- [7] Chang J., Reiner J. Xie J. Progress on the chemistry of dibenzocyclooctadiene lignans. // *Chemical Reviews.* 2005 Т. 105. № 12. С. 4581-4609.
- [8] Vogt T. Phenylpropanoid Biosynthesis // *Mol. Plant.* 2010. Т. 3. № 1. С. 2-20.
- [9] Dar A.A., Arumugam N. Lignans of sesame: purification methods, biological activities // *Bioorg. Chem.* 2013. Т. 50. С. 1-10.
- [10] Gottlieb O.R. Chemosystematics of the Lauraceae. // *Phytochemistry.* 1972. Т. 11. С. 1537-1570.
- [11] Карпук В. В. Фармакогнозия: учеб. пособие // В. В. Карпук. — Минск: БГУ. 2011. С. 340
- [12] Lee J., Huh M. S., Kim Y. C., Hattori M., Otake T. Lignan, sesquilignans and dilignans, novel HIV-1 protease and cytopathic effect inhibitors purified from the rhizomes of *Saururus chinensis*. // *Antiviral Res.* 2010. Т. 85. № 2. С. 425-428.
- [13] Pan W. B., Wei L. M., Wei L. L., Wu Y. C. Chemical Constituents of *Tupistra chinensis* Rhizomes. // *Chem. Pharm. Bull.* 2006. Т. 54. № 7. С. 954-958.
- [14] Davis R. A., Barnes E. C., Longden J., Avery V. M., Healy P. C. Isolation, structure elucidation and cytotoxic evaluation of endiandrin B from the Australian rainforest plant *Endiandra anthropophagorum*. // *Bioorg. Med. Chem.* 2009. Т. 17. № 3. С. 1387-1392.

[15] Jutiviboonsuk A., Zhang H., Tan G. T., Ma C., Van Hung N., Manh Cuong N., Bunyapraphatsara, N., Soejarto D. D., Fong H. H. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. // *Phytochemistry* 2005. T. 66. № 23. C. 2745-2751.

[16] Vuckovic I., Trajkovic V., Macura S., Tesevic V., Janackovic P., Milosavljevic S. A novel cytotoxic lignan from *Seseli annuum* L. // *Phytother. Res.* 2007. T. 21, № 8. C. 790-792.

[17] Tuchinda P., Kornsakulkarn J., Pohmakotr M., Kongsaree P., Prabpai S., Yoosook C., Kasisit J., Napaswad C., Sophasan S., Reutrakul V. Dichapetalin-Type Triterpenoids and Lignans from the Aerial Parts of *Phyllanthus acutissima*. // *J. Nat. Prod.* 2008. T. 71. № 4. C. 655-663.

[18] Zheng C. J., Huang B. K., Han T., Zhang Q. Y., Zhang H., Rahman K., Qin L. P. Nitric Oxide Scavenging Lignans from *Vitex negundo* Seeds. // *J. Nat. Prod.* 2009. T. 72. № 9. C. 1627-1630.

[19] He X. H., Yang W. Z., Meng A. H., He W. N., Guo D. A., Ye M. Two new lignan glycosides from the seeds of *Cuscuta chinensis*. // *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2010. T. 12. № 11. C. 934-939.

[20] Luo X. D., Wu D. G., Cai X. H., Kennelly E. J. New Antioxidant Phenolic Glycosides from *Walsura yunnanensis*. // *Chem. Biodiversity* 2006. T. 3. № 2. C. 224-230.

[21] Chen Y. C., Liao C. H., Chen I. S. Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. // *Phytochemistry* 2007. T. 68. № 15. C. 2101-2111.

[22] Xu L., Huang F., Chen S., Chen S., Xiao P. A New Triterpene and Dibenzocyclooctadiene Lignans from *Schisandra propinqua*. // *Chem. Pharm. Bull.* 2006. T. 54. № 4. C. 542-545.

[23] Yamasaki T., Kawabata T., Masuoka C., Kinjo J., Ikeda T., Nohara T., Ono M. Two new lignan glucosides from the fruit of *Vitex cannabifolia*. // *J. Nat. Med.* 2008. T. 62. № 1. C. 47-51.

[24] Mei R. Q., Wang Y. H., Du G. H., Liu G. M., Zhang L., Cheng Y. X. Antioxidant Lignans from the Fruits of *Broussonetia papyrifera*. // *J. Nat. Prod.* 2009. T. 72. № 4. C. 621-625.

[25] Kiem P. V., Tri M. D., Tuong le V. D., Tung N. H., Hanh N. N., Quang T. H., Cuong N. X., C. Minh V., Choi E. M., Kim Y. H. Chemical Constituents from the Leaves of *Manglietia phuthoensis* and Their Effects on Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. // *Chem. Pharm. Bull.* 2008. T. 56. № 9. C. 1270-1275.

[26] N Rangkaew., Suttisri R., Moriyasu M., Kawanishi K. A new aryl-naphthalene lignan from *Knema furfuracea*. // *Fitoterapia*. 2009 T. 80. № 6. C. 377-379.

[27] Setchell K. D. R., Lawson A.M., Mitchell F. L., Adlercreutz H., Kirk D. N., Axelson M. Lignans in man and in animal species. // *Nature*. 1980. T. 287. C. 740-742.

[28] Umezawa T. Diversity in lignin biosynthesis. // *Phytochem Rev*. 2003. T. 2. C. 371-390.

[29] Umezawa T., Okunishi T., Shimada M. Stereochemical diversity in lignin biosynthesis. // *Wood Research: bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University*. T. 85. C. 96-125.

[30] S. G. A. Moinuddin, S. Hishiyama, M-H. Cho, L.B. Davin, N.G. Lewis, Synthesis and chiral HPLC-analyses of the dibenzyltetrahydrofuran lignans, larreatricins, 8'-epi-larreatricins, 3,3'-didemethoxyverrucosins and meso-3,3'-didemethoxynectandrin B in the creosote bush (*Larrea tridentata*): evidence for regiospecific control of coupling. // *Org. Biomol. Chem*. 2003. T. 1. C. 2301-2313.

[31] N.P. Lopes, M. Yoshida, M.J. Kato, Biosynthesis of tetrahydrofuran lignans in *Virola surinamensis*. // *Brazil. J. Pharm. Sci*. 2004. T. 40. C. 53-57.

[32] S. Suzuki, T. Umezawa, Biosynthesis of lignans and norlignans // *J. Wood Sci*. 2007. T. 53. C. 273-284.

[33] R. S. Ward. The synthesis of lignans and neolignans // *Chem. Soc. Rev*. 1982. T. 11. C. 75-125.

[34] Sih C. J., Ravikumar P.R., Huang F-Ch., Buckner C., Whitlock H. Jr. Isolation and synthesis of pinoresinol diglucoside, a major antihypertensive principle of Tu-chung // *JACS*. 1976. T. 98. C. 5412-5413.

[35] Dickey E.E. Liriodendrin, a new lignan diglucoside from the inner bark of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) // *J. Org. Chem*. 1957. T. 23. C. 179-184.

[36] Maeda S., Masuda H., Tokoroyama T. Studies on the preparation of bioactive lignans by oxidative coupling reaction II. Oxidative coupling reaction of methyl (*E*)-3-(4,5-dihydroxy-2-methoxyphenyl)propionate and lipid peroxidation inhibitory effect of the produced lignans. // 1994. *Chem. Pharm. Bull*. T. 42. № 12. 2506-2513.

[37] Lemiere G., Gao M., De Groot A., Dommissie R., Lepoivre J., Pieters L., Buss V. 3',4-Di-*O*-methylcedrusin: synthesis, resolution and absolute configuration. // 1995. *J. Chem. Perkin Trans*. T. 1. C. 1775-1779.

[38] C. Daquino, A. Rescifina, C. Spatafora, C. Tringali. Biomimetic synthesis of natural and “unnatural” lignans by oxidative coupling of caffeic esters. // 2009. *Eur. J. Org. Chem.* T. 36. C. 6289-6300.

[39] Kao T.-T., Lin C.-C., Shia K.-S. The total synthesis of retrojusticidin B, justicidin E, and helioxanthin. // *J. Org. Chem.* 2015. T. 80. C. 6708–6714.

[40] Nahrstedt A., Albrecht M., Wray V., Gumbinger H. G., John M., Winterhoff H., Kemper F. H. Structures of compounds with antigonadotropic activity obtained by *in vitro* oxidation of caffeic acid. // *Planta Med.* 1990. T. 56. C. 395-398.

[41] Wang Q., Yang Y., Li Y., Yu W., Jie Hou Z. An efficient method for the synthesis of lignans // *Tetrahedron.* 2006. T. 62. C. 6107-6112.

[42] Takahashi H., Matsumoto K., Ueda M., Miyake Y., Fukuyama Y.. Biomimetic synthesis of neurotrophic americanol A and isoamericanol A by horseradish peroxidase (HRP) catalysed oxidative coupling. // *Heterocycles.* 2002. T. 56. C. 245-256.

[43] Bruschi M., Orlandi M., Rindone B., Rummakko P., Zoia L. Asymmetric biomimetic oxidations of phenols using oxazolidines as chiral auxiliaries: the enantioselective synthesis of (+)- and (-) – dehydrodiconiferyl alcohol. // *J. Phys. Org. Chem.* 2006. T. 19. C. 592-596.

[44] Cilliers J.J.L., Singleton V.L. Characterization of the products of nonenzymic autooxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. // *J. Agric. Food Chem.* 1991. T. 39. C. 1298-1303.

[45] Agata I., Hatana T., Nishibe S., Okuda T., A tetrameric derivative of caffeic acid from *Rabdosia japonica*. // *Phytochemistry.* 1989. T. 28. № 9. C. 2447-2450.

[46] Bogucki D.E., Charlton J.L. A non-enzymatic synthesis of (*S*)-(-)-rosmarinic acid and a study of a biomimetic route to (+)-rabdosiin. // *Can. J. Chem.* 1997. T. 75. C. 1783-1794.

[47] Pelter A., Ward R. S., Rao R. R. An approach to the biomimetic synthesis of aryltetralin lignans. // *Tetrahedron.* 1985. T. 41. № 14. C. 2933-2938.

[48] Datta P. K., Yau C., Hooper T. S., Yvon B. L., Charlton J. L. Acid-catalyzed cyclization of 2,3-dibenzylidenesuccinates: synthesis of lignans (+)-cagayanin and (+)-galbulin. // *J. Org. Chem.* 2001. T. 66. C. 8606-8611.

[49] Anjaneyulu A. S. R., Kameswara Rao V., Madhusudhana Rao A., Row L. R. A new synthesis of justicidin E and taiwanin C. // *Curr. Sci.* 1974. T. 43. C. 542-543.

[50] Ayres D. C., Carpenter B. G., Denney R. C. Lignans. Part III. Synthesis of 1 – arylnaphthalenes related to podophyllotoxin. // *J. Chem. Soc.* 1965. T. 0. C. 3578-3582

[51] Heller H. G., Strydom P. J. Photochemical reactions of apolignan precursors. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976. T. 2. C. 50b-51.

[52] Horii Z.-I., Ohkawa K., Iwata C. Biogenetic-type transformation of α -[α -(hydroxymethyl)-3,4-dimethoxystyryl]-3,4-methylenedioxy-cinnamic acid γ -lactone into diphyllin. *Chem. Pharm. Bull.* 1972. T. 20. C. 624-625.

[53] Batterbee J. E., Burden R. S., Crombie L., Whiting D. A. Chemistry and synthesis of the lignan (-)-cubebin. // *J. Chem. Soc. (C)*, 1969. C. 2470-2477.

[54] Ganeshpure P. A., Stevenson R. Synthesis of aryltetralin and dibenzylbutyrolactone lignans: (\pm)-lindetralin, (\pm)-phyltetralin, and (\pm)-kusunokinin. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1981. C. 1681-1684.

[55] Tsujiuchi M., Kanai K.-I., Momose T. Synthetic studies on lignans and related compounds. Synthesis of taiwanin C and E, and justicidin D (Neojustin A), E, and F (Taiwanin E methyl ether). // *Chem. Pharm. Bull.* 1977. T. 25. C. 1803-1808.

[56] Holmes T. L., Stevenson R. Arylnaphthalene lignans. Synthesis of justicidin E, taiwanin C, dehydrodimethylconidendrin, and dehydrodimethylretrodendrin. // *J. Org. Chem.* 1971. T. 36. № 22. C. 3450-3453.

[57] Brown D., Stevenson R. Synthesis of dehydrootobain. // *J. Org. Chem.*, 1965. T. 30. C. 1759-1762.

[58] Holmes T. L., Stevenson R. Arylnaphthalene lignans: synthesis of helioxanthin. // *J. Chem. Soc. C.* 1971. C. 2091-2094.

[59] Maclean I., Stevenson R. Synthesis of (\pm)-otobain. // *J. Chem. Soc. C.* 1966. C. 1717-1719.

[60] Sun B.-F., Hong R., Kang Y.-B., Deng L. Asymmetric total synthesis of (-)-plicatic acid via a highly enantioselective and diastereoselective nucleophilic epoxidation of acyclic trisubstituted olefins. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. T. 131. C. 10384-10385.

[61] Tamao K., Ishida N., Tanak T., Kunada M. Silafunctional compounds in organic synthesis. Part 20. Hydrogen peroxide oxidation of the silicon-carbon bond in organoalkoxysilanes. // *Organometallics* 1983. T. 2. C. 1694-1696.

[62] Tamao K., Ishida N., Kunada M. Chirality transfer in stereoselective synthesis. A highly stereoselective synthesis of optically active vitamin E side chains. // *J. Org. Chem.* 1983. T. 48. C. 2122-2124.

[63] Rye C. E., Barker D. Asymmetric synthesis of (+)-galbelgin, (-)-kadangustin J, (-)-cyclogalgravin and (-)-pyncanthulignenes A and B, three structurally distinct lignan classes, using a common chiral precursor. // *J. Org. Chem.* 2011. T. 76. C. 6636-6648.

[64] Hong B.-C., Hsu C.-S., Lee G.-H. Enantioselective total synthesis of (+)-galbulinvia organocatalytic domino Michael–Michael–aldol condensation. // *Chem. Commun.* 2012. T. 48. C. 2385–2387.

[65] Sampei M., Arai M.A., Ishibashi M. Total syntheses of schizandriside, saracoside and (±)-isolariciresinol with antioxidant activities. // *J. Nat. Med.* 2018. T. 72. C. 651–654.

[66] Zhang J.-J., Yan C.-S., Peng Y., Luo Z.-B., Xu X.-B., Wang Y.-W. Total synthesis of (±)-sacidumlignans D and A through Ueno–Stork radical cyclization reaction. // *Org. Biomol. Chem.* 2013. T. 11. C. 2498–2513.

[67] Kim T., Jeong K.H., Kang K.S., Nakata M., Ham J. An optimized and general synthetic strategy to prepare aryl-naphthalene lactone natural products from cyanophthalides. // *Eur. J. Org. Chem.* 2017. C. 1704–1712.

[68] Kende A. S., Liebeskind L. S. Total synthesis of (+)-steganacin. // *J. Am. Chem. Soc.*, 1976. T. 98. № 1. C. 267–268.

[69] Kende A. S., Liebeskind L. S., Kubiak C., Eisenberg R. Isosteganacin. *J. Am. Chem. Soc.* 1976. T. 98. № 20. C. 6389–6391.

[70] Pelter A., Ward R.S., Rao R.R. An approach to the biomimetic synthesis of aryltetralin lignans. // *Tetrahedron.* 1984. T. 41 № 14. C. 2933-2938.

[71] Heitner C., Dimmel D.R., Schmidt J. A. Lignin and lignans. *Advances in chemistry* // CRC Press Taylor&Francis Group LLC 2010 USA, C. 585-631.

[72] Macrae W D, Neil Towers G H. Biological activities of lignans. // *Phytochem.* 1984. T. 23 № 6. C. 1207-1220.

[73] Xiao W. L., Wang R. R., Zhao W., Tian R. R., Shang S. Z., Yang L. M., Yang J. H., Pu J. X., Zheng Y. T., Sun H. D. Anti-HIV-1 activity of lignans from the fruits of *Schisandra rubriflora*. // *Arch. Pharmacol Res.* 2010. T. 33. № 5. C. 697-701.

[74] Moon S. S., Rahman A. A., Kim J. Y., Kee S. H. Hanultarin, a cytotoxic lignan as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of *Trichosanthes kirilowii*. // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. T. 16. № 15. C. 7264-7269.

[75] Wu S. J., Wu T. S. Cytotoxic aryl-naphthalene lignans from *Phyllanthus oligospermus*. // *Chem. Pharm. Bull.* 2006. T. 54. № 8. C. 1223-1225.

[76] Nuntanakorn P., Jiang B., Einbond L. S., Yang H., Kronenberg F., Weinstein I. B., Kennelly E. J. Polyphenolic constituents of *Actaea racemosa*. // *J. Nat. Prod.* 2006. T. 69. № 3., C. 314-318.

[77] Yang X.W., He H. P., Du Z. Z., Liu H. Y., Di Y. T., Ma Y. L., Wang F., Lin H., Zuo Y. Q., Li L., Hao X. J. Tarennanosides A–H, Eight New Lignan Glucosides from

Tarenna attenuata and Their Protective Effect on H₂O₂-Induced Impairment in PC12 Cells. // *Chem. Biodiversity*. 2009. T. 6. № 4. C. 540-550.

[78] Sadhu S. K., Okuyama E., Fujimoto H., Ishibashi M., Yesilada E. Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. // *J. Ethnopharmacol.* 2006. T. 108 № 3. C. 371-378.

[79] Petrova A., Popova M., Kuzmanova C., Tsvetkova I., Naydenski H., Muli E., Bankova V. New biologically active compounds from Kenyan propolis. // *Fitoterapia*. 2010. T. 81. C. 509-514.

[80] Gisvold O., Thaker E. Lignans from *Larrea divaricate*. // *J. Pharm. Sci.* 1974. T. 63. № 12. C. 1905-1907.

[81] Li N., Wu J. L., Hasegawa T., Sakai J., Bai L. M., Wang L. Y., Kakuta S., Furuya Y., Ogura H., Kataoka T., Tomida A., Tsuruo T., Ando M. Bioactive Lignans from *Peperomia duclouxii*. // *J. Nat. Prod.* 2007. T. 70 № 4. C. 544-548.

[82] Li H. R., Feng Y. L., Yang Z. G., Wang J., Daikonya A., Kitanaka S., Xu L. Z., Yang S. L. New Lignans from *Kadsura coccinea* and their nitric oxide inhibitory activities. // *Chem. Pharm. Bull.* 2006. T. 54 № 7. C. 1022-1025.

[83] Hartwell J.L., Schrecker A.W. The chemistry of podophyllum. // *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 1958 T. 15. C. 83-166.

[84] Kamikado T., Chang C.F., Murakoshi S., Sakurai A., Tamura S. Isolation and Structure Elucidation of Growth Inhibitors on Silkworm Larvae from *Magnolia kobus* DC. // *Agric. Biol. Chem.* 1975. T. 39 № 4. C. 833-836.

[85] Ovodov Yu. S., Frolova G. M., Elyakova L. A., Elyakov G. B. Identity of eleutheroside E with acanthoside D. // *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science*. 1965. T. 14 № 11. C. 2035-2036.

[86] Bose J.S., Gangan V., Prakash R., Kumar J. S., Manna S. K. A dihydrobenzofuran lignin induce cell death by modulating mitochondrial pathway and G2/M cell cycle arrest. // *J. Med. Chem.* 2009. T. 52. C. 3184-3190.

[87] Brewer C. F., Loike J. D., Horowitz S. B. Conformational analysis of podophyllotoxin and its congeners. Structure-activity relationship in microtubule assembly. // *J. Med. Chem.* 1979 T. 22 № 3. C. 215-221.

[88] Franklyn De Silva S., Alcorn J. Flaxseed lignans as important dietary polyphenols for cancer prevention and treatment: chemistry, pharmacokinetics, and molecular targets. // *Pharmaceuticals*. 2019. T. 12 № 2 C. 1-68.

[89] Garber K. Why it hurts: researchers seek mechanisms of cancer pain. // *J. Nat. Cancer Inst.* 2003. Т. 95. № 11. С. 770-772.

[90] Issbernera U., Reehb P. W., Steen K. H. Pain due to tissue acidosis: a mechanism for inflammatory and ischemic myalgia? // *Neurosci. Lett.* 1996. Т. 208. № 3. С. 191-194.

[91] Pan H.L., Longhurst J.C., Eisenach J.C., Chen S.R. Role of protons in activation of cardiac sympathetic C-fibre afferents during ischaemia in cats. // *J. Physiol.* 1999. Т. 518. № 3. С. 857-866.

[92] Krishtal O. A., Pidoplichko V. I. A receptor for protons in the nerve cell membrane. // *Neuroscience.* 1980. Т. 5. С. 2325-2327.

[93] Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C., Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. // *Nature.* 1997. Т. 386. С. 173-177.

[94] Пиотровский Л.Б., Думпис М.А., Куликов С.В., Литасова Е.В. Протон-чувствительные ионные каналы – новая мишень для терапии боли. // *Психофармакол. биол. наркол.* 2007. Т. 7. № 2. С. 1542-1547.

[95] Lingueglia E., Deval E., Lazdunski M. FMRFamide-gated sodium channel and ASIC channels: A new class of ionotropic receptors for FMRFamide and related peptides. // *Peptides.* 2006 Т. 27. № 5. С. 1138-1152.

[96] Krishtal O.A., Osipchuk Yu.V., Shelest T.N., Smirnoff S.V. Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. // *Brain Res.* 1987. Т. 436. № 2. С. 352-356.

[97] Adams C. M., Anderson M. G., Motto D. G., Price M. P., Johnson W. A., Welsh M. J. Ripped pocket and pickpocket, novel drosophila DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons. // *JCB* 1998. Т. 140. № 1. С. 143-152.

[98] Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. // *Neurosci.* 1981. Т. 6 № 12. С. 2599-2601.

[99] Krishtal O. The ASICs: Signaling molecules? Modulators? // *Trends in Neurosci.* 2003. Т. 26. № 9. С. 477-483.

[100] Kellenberger S., Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: A variety of functions for a shared structure. // *Physiol. Rev.* 2002. Т. 82. С. 735–767.

[101] Kellenberger S., Schild L. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. Structure, Function, and Pharmacology of Acid-Sensing Ion Channels and the Epithelial Na⁺ Channel. // *Pharm. Rev.* 2015. Т. 67. С. 1-35.

[102] Qadri Y.J., Rooj A.K., Fuller CM. ENaCs and ASICs as therapeutic targets. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2012. T. 302 №7. C. 943–965.

[103] Wemmie J.A., Taugher R.J., Kreple C.J. Acid-sensing ion channels in pain and disease. // *Nat Rev Neurosci* 2013. T. 14 № 7. C. 461–471.

[104] Delaunay A., Gasull X., Salinas M., Noël J., Friend V., Lingueglia E., Deval E. Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. // *Proc Natl Acad Sci USA* 2012. T. 109 C. 13124–13129.

[105] Wemmie J.A., Chen J., Askwith C.C., Hruska-Hageman A.M., Price M.P., Nolan B.C., Yoder P.G., Lamani E., Hoshi T., Freeman J.H. Jr. The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. // *Neuron* 2002. T. 34 № 3. C. 463–477.

[106] Zha X.M., Wemmie J.A., Green S.H., Welsh MJ Acid-sensing ion channel 1a is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006. T. 103 № 44. C. 16556–16561.

[107] Canessa C.M., Merillat A.M., Rossier B.C. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. // *Am. J. Physiol.* 1994a. T. 267 № 6 Pt1. C. 1682–1690.

[108] Coscoy S., de Weille J.R., Lingueglia E., Lazdunski M. The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore. // *J. Biol. Chem.* 1999. T. 274. C. 10129–10132.

[109] Осмаков Д. И., Андреев Я. А., Козлов С. А. Кислоточувствительные рецепторы и их модуляторы. // *Усп. Биол. Хим.* 2014. Т. 54. С. 231-266.

[110] Jasti J., Furukawa H., Gonzales E.B., Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. // *Nature* 2007. T. 449. № 7160. C. 316–323.

[111] Baconguis I., Bohlen C.J., Goehring A., Julius D., Gouaux E. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na (+)-selective channel. // *Cell* 2014. T. 156 № 4. C. 717–729.

[112] Dawson R.J., Benz J., Stohler P., Tetaz T., Joseph C., Huber S., Schmid G., Hügin D., Pflimlin P., Trube G. Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1. // *Nat Commun.* 2012. T. 3. C. 936.

[113] Kusama, N., Harding, A. M. and Benson, C. J. Extracellular chloride modulates the desensitization kinetics of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a). // *J. Biol. Chem.* 2010. T. 285. C. 17425-17431.

[114] Chu X.P., Papasian C.J., Wang J.Q., Xiong Z.G. Modulation of acidsensing ion channels: molecular mechanisms and therapeutic potential. // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 2011. T. 3 № 4. C. 288–309.

[115] Yu Y., Chen Z., Li W.G., Cao H., Feng E.G., Yu F., Liu H., Jiang H., Xu T.L. A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. // *Neuron* 2010. T. 68. C. 61–72.

[116] Chen X., Kalbacher H., Gründer S. The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity. // *J. Gen. Physiol.* 2005. T. 126. C. 71–79.

[117] Chen X., Kalbacher H., Gründer S. Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent. // *J. Gen. Physiol.* 2006. T. 127. C. 267–276.

[118] Samways D.S., Harkins A.B., Egan T.M. Native and recombinant ASIC1a receptors conduct negligible Ca²⁺ entry. // *Cell. Calcium* 2009. T. 45. C. 319–325.

[119] Bacongus I., Bohlen C.J., Goehring A., Julius D., Gouaux E. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na⁽⁺⁾-selective channel. // *Cell* 2014. T. 156. C. 717–729.

[120] Waldmann R., Bassilana F., de Weille J., Champigny G., Heurteaux C., Lazdunski M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. // *J. Biol. Chem.* 1997. T. 272. C. 20975–20978.

[121] Benson C.J., Xie J., Wemmie J.A., Price M.P., Henss J.M., Welsh M.J., Snyder P.M. Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002. T. 99. C. 2338–2343.

[122] Delaunay A., Gasull X., Salinas M., Noël J., Friend V., Lingueglia E., Deval E. Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012. T. 109. C. 13124–13129.

[123] Wang W.Z., Chu X.P., Li M.H., Seeds J., Simon R.P., Xiong Z.G. Modulation of acid-sensing ion channel currents, acid-induced increase of intracellular Ca²⁺, and acidosis-mediated neuronal injury by intracellular pH. // *J. Biol. Chem.* 2006. T. 281. C. 29369–29378.

[124] Wemmie J. A., Price M. P., Welsh M. J. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. // *Trends Neurosci.* 2006. T. 29. C. 578–586.

[125] Yoder N., Yoshioka C., Gouaux E. Gating mechanism of acid-sensing ion channels. // *Nature* 2018. T. 555. C. 397-401.

[126] Immke D.C., McCleskey E.W. Protons open acid-sensing ion channels bycatalyzing relief of Ca²⁺ blockade. // *Neuron* 2003. T. 37. C. 75–84.

[127] Babini E., Paukert M., Geisler H.S., Grunder S. Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). // *J. Biol. Chem.* 2002. T. 277. C. 41597–41603.

[128] Wang, W., Yu, Y. and Xu, T. L. Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat. // *Neuroscience*. 2007. T. 145. C. 631-641.

[129] Babinski, K., Catarsi, S., Biagini, G. and Seguela, P. Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd³⁺. // *J. Biol. Chem.* 2000. T. 275. C. 28519-28525.

[130] Sherwood T. W., Askwith C. C. Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death. // *J. Neurosci.* 2009. T. 29. C. 14371-14380.

[131] Escoubas P., De Weille J. R., Lecoq A., Diochot S., Waldmann R., Champigny G., Moinier D., Menez A., Lazdunski M. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. // *J Biol Chem.* 2000. T. 275. C. 25116-25121.

[132] Diochot S., Baron A., Rash L. D., Deval E., Escoubas, P. Scarzello S., Salinas M., Lazdunski M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. // *EMBO J.* 2004. T. 23. C. 1516-1525.

[133] Diochot S., Baron A., Salinas M., Douguet D., Scarzello S., Dabert-Gay A. S., Debayle D., Friend V., Alloui A., Lazdunski M., Liguaglia E. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. // *Nature*. 2012. T. 490. C. 552-555.

[134] Sherwood T.W., Frey E.N., Askwith C.C. Structure and activity of the acid-sensing ion channels. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2012. T. 303. C. 699–710.

[135] Qu Z.-W., Liu T.-T., Qiu C.-Y., Li J.-D., Hu W.-P. Inhibition of acid-sensing ion channels by chlorogenic acid in rat dorsal root ganglion neurons. // *Neurosci. Lett.* 2014. T. 567. C. 35–39.

[136] Waldmann R., Champigny G., Voilley N., Lauritzen N., Lazdunski M. The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. // *J. Biol. Chem.* 1996. T. 271. C. 10433-10434.

[137] Adams C. M., Snyder P. M., Welsh M. J. Paradoxical stimulation of a DEG/ENaC channel by amiloride. // *J Biol Chem.* 1999. T. 274. C. 15500-15504.

[138] Kellenberger S., Gautschi I., Schild L. Mutations in the epithelial Na⁺ channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate. // *Mol Pharmacol.* 2003. T. 64. № 4. C. 848 – 856.

[139] Schild L., Schneeberger E., Gautschi I., Firsov D. Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. // *J. Gen. Physiol.* 1997. T. 109. № 1. C. 15-26.

[140] Bacongus I., Bohlen C. J., Goehring A., Julius D., Gouaux E. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1–snake toxin complex reveals open state of a Na⁺-selective channel. // *Cell.* 2014. T. 156. № 4. C. 717–729.

[141] Li W.-G., Ye Y., Chen H., Hui C., Tian-Le X. Nonproton ligand sensing domain is required for paradoxical stimulation of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) channels by amiloride. // *J. Biol. Chem.* 2011. T. 286. № 49. C. 42635 – 42646.

[142] Yagi J., Wenk H., Naves L.A., McCleskey E.W. Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. // *Circ. Res.* 2006. T. 99. № 5. C. 501-509.

[143] Li X., Fei J., Lei, Z., Liu K., Wu J., Meng T. Chloroquine impairs visualtransduction via modulation of acid sensing ion channel 1a. // *Toxicol. Lett.* 2014. T. 228. C. 200–206.

[144] Lei Z., Sami Shaikh A., Zheng W., Yu X., Yu J., Li J. Non-proton ligand-sensingdomain of acid-sensing ion channel 3 is required for itch sensation. // *J. Neurochem.* 2016. T. 139. C. 1093–1101.

[145] Dorofeeva N. A., Barygin O. I., Staruschenko A., Bolshakov K. V., Magazanik L. G. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. // *J Neurochem.* 2008. T. 106. C. 429-441.

[146] Voilley N., de Weille J., Mamet J., Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation- induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. // *J. Neurosci.* 2001. T. 21. C. 8026–8033.

[147] Wang W., Ye S.D., Zhou K.Q., Wu L.M., Huang Y.N. High doses of salicylateand aspirin are inhibitory on acid-sensing ion channels and protective againstacidosis-induced neuronal injury in the rat cortical neuron. // *J. Neurosci. Res.* 2012. T. 90. C. 267-277.

[148] Chu X.P., Papasian C.J., Wang J.Q., Xiong Z.G. Modulation of acid-sensing ion channels: molecular mechanisms and therapeutic potential. // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 2011. T. 3. C. 288–309.

[149] Allen N. J., Attwell D. Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. // *J Physiol.* 2002. T. 543. C. 521-529.

[150] Garza A., Lopez-Ramirez O., Vega R. Soto E. The aminoglycosides modulate the acid-sensing ionic channel currents in dorsal root ganglion neurons from the rat. // *J Pharmacol Exp Ther.* 2010. T. 332. C. 489-499.

[151] Yu Y., Chen Z., Li, W. G., Cao H., Feng E. G., Yu F., Liu H., Jiang H., Xu T. L. A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. // *Neuron.* 2010. T. 68. C. 61-72.

[152] Osmakov D. I., Koshelev S. G., Andreev Y. A., Dubinnyi M. A., Kublitski V. S., Efremov R. G., Sobolevsky A. I., Kozlov S. A. Proton-independent activation of acidsensing ion channel 3 by an alkaloid, lindoldhamine, from *Laurus nobilis*. // *British Journal of Pharmacology* 2018. T. 175. C. 924–937.

[153] Osmakov D. I., Koshelev S. G., Lyukmanova E. N., Shulepko M. A., Andreev Y. A., Illes P. Multiple Modulation of Acid-Sensing Ion Channel 1a by the Alkaloid Daurisoline. // *Biomolecules* 2019. T. 9. C. 336.

[154] Osmakov D. I., Koshelev S. G., Andreev Y. A., Kozlov S. A. Endogenous isoquinoline alkaloids agonists of acid-sensing ion channel type 3. // *Front. Mol. Neurosci.* 2017. T. 10. C. 1-7.

[155] Henning S. M., Niu Y., Liu Y., Lee N. H., Hara Y., Thames G. D. Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. // *J. Nutr. Biochem.* 2005. T. 16. C. 610–616.

[156] Yang C. S., Wang X., Lu G., Picinich S. C. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. // *Nat. Rev. Cancer* 2009. T. 9. C. 429–439.

[157] Yan X.-G., Li W.-G., Qi X., Zhu J.-J., Huang C., Han S.-L. Subtype-selective inhibition of acid-sensing ion channel 3 by a natural flavonoid. // *CNS Neurosci. Ther.* 2019. T. 25. C. 47–56.

[158] Anand David A., Arulmoli R., Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. // *Pharmacogn. Rev.* 2016. T. 10. C. 84.

[159] Mukhopadhyay M., Singh A., Sachchidanand S., Bera A. K. Quercetin inhibits acid-sensing ion channels through a putative binding site in the central vestibular region. // *Neuroscience* 2017. T. 348. C. 264–272.

[160] Zhou Y.-X., Zhang H., Peng C. Puerarin: A Review of Pharmacological Effects. // *Phyther. Res.* 2014. T. 28. C. 961–975.

[161] Gu L., Yang Y., Sun Y., Zheng X. Puerarin inhibits acid-sensing ion channels and protects against neuron death induced by acidosis. // *Planta Med.* 2010. T. 76. C. 583–588.

[162] Gingrich M.B., Traynelis S.F. Serine proteases and brain damage - is there a link? // *Trends. Neurosci.* 2000. T. 3. C. 399–407.

[163] Poirot O., Vukicevic M., Boesch A., Kellenberger S. Selective regulation of acid-sensing ion channel 1 by serine proteases. // *J. Biol. Chem.* 2004. T. 279. C. 38448–38457.

[164] Baron A., Deval E., Salinas M., Lingueglia E., Voilley N., Lazdunski M. Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. // *J. Biol. Chem.* 2002. T. 277. C. 50463–50468.

[165] Deval E., Salinas M., Baron A., Lingueglia E., Lazdunski M. ASIC2b-dependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1. // *J. Biol. Chem.* 2004. T. 279. C. 19531–19539.

[166] Leonard A.S., Yermolaieva O., Hruska-Hageman A., Askwith C.C., Price M.P., Wemmie J.A., Welsh M.J. cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of the acid-sensing ion channel-1 regulates its binding to the protein interacting with C-kinase-1. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003. T. 100. C. 2029–2034.

[167] Mamet J., Lazdunski M., Voilley N. How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. // *J. Biol. Chem.* 2003. T. 278. C. 48907–48913.

[168] Chu X.P., Wemmie J.A., Wang W.Z., Zhu X.M., Saugstad J.A., Price M.P., Simon R.P., Xiong Z.G. Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. // *J. Neurosci.* 2004. T. 24. C. 8678–8689.

[169] Baron A., Schaefer L., Lingueglia E., Champigny G., Lazdunski M. Zn^{2+} and H^{+} are coactivators of acid-sensing ion channels. // *J. Biol. Chem.* 2001. T. 276. C. 35361–35367.

[170] Duan B., Wang Y.Z., Yang T., Chu X.P., Yu Y., Huang Y., Cao H., Hansen J., Simon R.P., Zhu M.X. Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of ASIC1a channels to extracellular acidosis. // *J. Neurosci.* 2011. T. 31. C. 2101–2112.

[171] Li W.G., Yu Y., Zhang Z.D., Cao H., Xu T.L. ASIC3 channels integrate agmatine and multiple inflammatory signals through the nonproton ligand sensing domain. // *Mol. Pain.* 2010. T. 6. C. 88.

[172] Andrey F., Tsintsadze T., Volkova T., Lozovaya N., Krishtal O. Acid sensing ionic channels: modulation by redox reagents. // *Biochim. Biophys. Acta* 2005. T. 1745. № 1–6.

[173] Cadiou H., Studer M., Jones N.G., Smith E.S., Ballard A., McMahon S.B., McNaughton P.A. Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. // *J. Neurosci.* 2007. T. 27. C. 13251–13260.

[174] Qiu F., Qiu C.Y., Liu Y.Q., Wu D., Li J.D., Hu W.P. Potentiation of acid-sensing ion channel activity by the activation of 5-HT₂ receptors in rat dorsal root ganglion neurons. // *Neuropharmacology* 2012. T. 63. C. 494–500.

[175] Du J., Reznikov L.R., Price M.P., Zha X.M., Lu Y., Moninger T.O., Wemmie J.A., Welsh M.J. Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014. T. 111. C. 8961–8966.

[176] Kreple C.J., Lu Y., Taugher R.J., Schwager-Gutman A.L., Du J., Stump M., Wang Y., Ghobbeh A., Fan R., Cosme C.V. Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity. // *Nat. Neurosci.* 2014. T. 17. C. 1083–1091.

[177] Chen C.C., Wong C.W. Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. // *J. Cell. Mol. Med.* 2013. T. 17. C. 337–349.

[178] Hildebrand M. S., de Silva M. G., Klockars T., Rose E., Price M., Smith R. J., McGuirt W. T., Christopoulos H., Petit C., Dahl, H. H. (2004) Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hear Res.* 190, 149-160

[179] Deval E., Noel J., Lay, N., Alloui A., Diochot S., Friend V., Jodar M., Lazdunski M., Lingueglia E. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. // *Embo J.* 2008. T. 27. C. 3047-3055.

[180] Sluka K.A., Price M.P., Breese N.M., Stucky C.L., Wemmie J.A., Welsh M.J. Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. // *Pain* 2003. T. 106. C. 229–239.

[181] Sluka K.A., Radhakrishnan R., Benson C.J., Eshcol J.O., Price M.P., Babinski K., Audette K.M., Yeomans D.C., Wilson S.P. ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. // *Pain* 2007. T. 129. C. 102–112.

[182] Fujii Y., Ozaki N., Taguchi T., Mizumura K., Furukawa K., Sugiura Y. TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness. // *Pain* 2008. T. 140. C. 292–304.

[183] Ikeuchi M., Kolker S.J., Burnes L.A., Walder R.Y., Sluka K.A. Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice. // *Pain* 2008. T. 137. C. 662–669.

[184] Walder R.Y., Rasmussen L.A., Rainier J.D., Light A.R., Wemmie J.A., Sluka K.A. ASIC1 and ASIC3 play different roles in the development of Hyperalgesia after inflammatory muscle injury. // *J. Pain* 2010. T. 11. C. 210–218.

[185] Yiangou Y., Facer P., Smith J.A., Sangameswaran L., Eglen R., Birch R., Knowles C., Williams N., Anand P. Increased acid-sensing ion channel ASIC-3 in inflamed human intestine. // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2001. T.13. C. 891–896.

[186] Wu L.J., Duan B., Mei Y.D., Gao J., Chen J.G., Zhuo M., Xu L., Wu M., Xu T.L. Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. // *J. Biol. Chem.* 2004. T. 279. C. 43716–43724.

[187] Duan B., Wu L.J., Yu Y.Q., Ding Y., Jing L., Xu L., Chen J., Xu T.L. Upregulation of acidsensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity. // *J. Neurosci.* 2007. T. 27. C. 11139–11148.

[188] Amer M.F.A., Takahashi K., Ishihara J., Hatakeyama S. Total synthesis of citrafungin A. // *Heterocycles* 2007. T. 72. C. 181-185.

[189] Tsegay S., Hugel H., Rizzacasa M. Formal total synthesis of (+)-citrafungin A. // *Aust. J. Chem.* 2009. T. 62. C. 676-682.

[190] Heretsch P., Thomas F., Aurich A., Krautsched H., Sicker D., Giannis A. Synthesis with a chiral building block from the citric acid cycle: (2R, 3S)-isocitric acid by fermentation of sunflower oil. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. T. 47. C. 1958–1960.

[191] Calo F., Richardson J., Barrett A. G. M. Total synthesis of citrafungin A. // *J. Org. Chem.* 2008. T. 73. C. 9692-9697.

[192] Tori M., Hamada N., Sono M., Sono Y., Ishikawa M., Nakashima K., Hashimoto T., Asawaka Y. Synthesis of cryptoporic acid A methyl ester. // *Tetrahedron Lett.* 2000. T. 41. C. 3099-3102.

[193] Carlsen P. H. J., Katsuki T., Martin V. S., Sharpless K. B. A greatly improved procedure for ruthenium tetroxide catalyzed oxidations of organic compounds. // *J. Org. Chem.* 1981. T. 46. C. 3936–3938.

[194] Zhou T., Ringbeck B., Schebb N.H., Scherkenbeck J. Isolation, total synthesis and quantification of caffeoylisocitric acid, a characteristic ingredient of the superfood amaranth. // *Tetrahedron.* 2019. T. 75. C. 4479–4485.

[195] Jaiswal R., Dickman M.H., Kunhert N. First diastereoselective synthesis of methyl caffeoyl- and feruloyl-muco-quinates. // *Org. Biomol. Chem.* 2012. T. 27. C. 5266-5277.

[196] Charlton J.L., Sayeed V., A., Koh K., Lau W.F. Synthesis and herbicidal activity of xanthenes. // *J. Agric. Food Chem.* 1990. T. 38. C. 1719-1723.

[197] Zou H.B., Dong S.Y., Zhou C.X., Hu L.H., Wu Y.H., Li H.B., Gong J., X., Sun L.L., Wu X.M., Bai H., Fan B.T., Hao X.J., Stockigt J., Zhao Y. Design, synthesis, and SAR analysis of cytotoxic sinapyl alcohol derivatives. // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. T. 14. C. 2060-2071.

[198] Zou H., Wu H., Zhang X., Zhao Y., Stockigt J., Lou Y., Yu Y. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationship study of novel cytotoxic aza-caffeic acid derivatives. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. T. 18. C. 6351-6359.

[199] Hu L.H., Zou H.B., Gong J.X., Li H.B., Yang L.X., Cheng W., Zhou C.X., Bai H., Gueritte F., Zhao Y. Synthesis and biological evaluation of a natural ester sintenin and its synthetic analogues. // *J. Nat. Prod.* 2005. T. 68. C. 342-348.

[200] Neises B., Steglich W. Simple method for the esterification of carboxylic acid. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1978. T. 17. C. 522-523.

[201] Allais F., Martinet S., Ducrot P.-H. Straightforward total synthesis of 2-*O*-feruoyl-L-malate, 2-*O*-sinapoyl-L-malate and 2-*O*-hydroxiferuoyl-L-malate. // *Synthesis.* 2009. T. 21. C. 3571-3578.

[202] Lamidey A.-M., Fernon L., Pouysegue L., Delattre C., Quideau S. A convenient synthesis of the *Echinacea*-derived immunostimulator and HIV-1 integrase inhibitor (-)-(2*R*,3*R*)-chiroric acid. // *Helvetica Chimica Acta.* 2002. T. 85. C. 2328-2334.

[203] Nanduri S., Thunuguntla S.S.R., Nyavanandi V.K., Kasu S., Kumar P.M., Sai Ram P., Rajagopal S., Kumar R.A., Deevi D.S., Rajagopalan R., Venkateswarlu A. Biological investigation and structure-activity relationship studies on azadirone from *Azadirachta indica* A. Juss // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003. T. 13. №22. C. 4111-4115.

[204] Miyamae Y., Kurisu M., Han J., Isoda H., Shigemori H. Structure-activity relationship of caffeoylquinic acids on the accelerating activity on ATP production. // *Chem. Pharm. Bull.* 2011. T. 59. № 4. C. 502-507.

[205] Magoulas G.E., Rigopoulos A., Piperigkou Z., Gialeli C., Karamanos N.K., Takis P.G., Troganis A.N., Chrissanthopoulos A., Maroulis G., Papaioannou D. Synthesis and antiproliferative activity of two diastereomeric ligninamides serving as dimeric caffeic acid-L-DOPA hybrids. // *Bioorg. Chem.* 2016. T. 66. C. 132-134.

[206] Bailly F., Toillon R.-A., Tomavo O., Jouy N., Hondermsrck H., Cotelle P. Antiproliferative and apoptotic effects of the oxidative dimerization product of methyl caffeate on human breast cancer cells. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. T. 23. C. 574-578.

[207] Jiang Z.-H., Tanaka T., Kouno I. Two diastereomeric triterpene-lignan esters having dimeric structure and their biosynthetically related triterpene caffeate from *Rhoiptelea chiliantha*. // *Tetrahedron Lett.* 1994. T. 35. № 13. C. 2031-2034.

[208] Jiang Z.-H., Tanaka T., Kouno I. Chilianthis A-F, six triterpene esters having dimeric structure from *Rhoiptelea chilianthadiels* et. Hand.-Mazz. // *Chem. Pharm. Bull.* 1996. T. 44. № 9. C. 1669-1675.

[209] Haiduk P.J., Bures M., Praestgaard J., Fesik S.W. Privileged molecules for protein binding identified from NMR-based screening. // *J. Med. Chem.* 2000. T. 43. № 18. C. 3443-3447.

[210] Ballatore C., Huryn D.M., Smith A.B. Carboxylic acid (bio)isosteres in drug design. // *ChemMedChem.* 2013. T. 8. C. 385-395.

[211] Pajouhesh H., Lenz G.R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. // *NeuroRx.* 2005. T. 2. № 4. C. 541-553.

[212] Lassalas P., Gay B., Lasfargeas C., James M. J., Tran V., Vijayendran K. G., Brunden K. R., Kozlowski M.C., Thomas C.J., Smith III A.B., Huryna D.M., Ballatore C. Structure Property Relationships of Carboxylic Acid Isosteres. // *J. Med. Chem.* 2016. T. 59. C. 3183-3203.

[213] Andreev Y.A., Osmakov D.I., Koshelev S.G., Maleeva E.E., Logashina Y.A., Palikov V.A., Palikova Y.A., Dyachenko I.A., Kozlov S.A. Analgesic activity of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) inhibitors: sea anemones peptides Ugr9-1 and APETx2 versus low molecular weight compounds. // *Mar. Drugs* 2018. T. 16. № 12. C. 500.

[214] Sherwood T.W., Askwith C.C. Endogenous arginine-phenylalanine-amide-related peptides alter steady-state desensitization of ASIC1a. // *J. Biol. Chem.* 2008. T. 283. C. 1818-1830.

[215] Bargeton B., Iwaszkiewicz J., Bonifacio G., Roy S., Zoete V., Kellenberger S. Mutations in the palm domain disrupt modulation of acid-sensing ion channel 1a currents by neuropeptides. // *Sci. Rep.* 2019. T. 9. C. 2599.

[216] Belozerova O.A., Osmakov D.I., Vladimirov A., Koshelev S.G., Chugunov A.O., Andreev Y.A., Palikov V.A., Palikova Y.A., Shaykhutdinova E.R., Gvozd A.N., Dyachenko I.A., Efremov R.G., Kublitski V.S., Kozlov S.A. Sevanol and its analogues: chemical synthesis, biological effects and molecular docking. // *Pharmaceuticals* 2020. T. 13. C. 163.