

**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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2021

Работа выполнена в отделе биомолекулярной химии в группе химии метаболических путей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Кандидат химических наук Кублицкий Вадим Сергеевич

Официальные оппоненты:

Кузнецов Николай Юрьевич, доктор химических наук, старший научный сотрудник лаборатории стереохимии металлоорганических соединений ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН

Вацадзе Сергей Зурабович, доктор химических наук, профессор кафедры органической химии химического факультета, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России» (Сеченовский Университет)

Защита состоится 22 декабря 2021 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » 2021 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников**



ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. 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. В природе лигнаны и неолигнаны биосинтетически образуются в процессе окислительной димеризации различных фенолов, содержащих пропанольную группу. В царстве растений известно около нескольких тысяч представителей этого класса фенольных соединений самой различной химической структуры. 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, что, вероятно, обуславливает их биологическую активность в живых организмах. На данный момент известны примеры противоопухолевой, противовоспалительной, противовирусной, цитотоксической, антимиотической, противогрибковой, антиангиогенной, гепатопротекторной, антигипертензивной, седативной, инсектицидной, антагонистической и сердечно-сосудистой активности. 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

активность¹. 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. 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.

Цели и задачи исследования. Целью данной диссертационной работы является структурно-функциональное изучение севанола и его модифицированных аналогов. В рамках поставленной цели были решены следующие задачи:

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

Научная новизна и практическая ценность работы. 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 ASIC-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.

¹ 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. T. 287. C.32993-33000.

Методология и методы исследования. 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 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.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Путем полного синтеза подтверждена предполагаемая структура представителя класса дигидронафталинового лигнана севанола: (1S,2S)-три-трет-бутил 1-(((1R,2S)-3-(((2R,3R)-1,5-ди-трет-бутокси-3 (трет-бутокси 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.
- Оптимизированный метод синтеза севанола, позволяющий провести полномасштабные биологические исследования соединения *in vitro* и *in vivo*.
- Модификация структуры севанола приводит к образованию аналогов, также обладающих эффектом ингибирования кислото-чувствительных ионных каналов (ASIC).
- 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.

Апробация полученных данных и публикации. 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/ASMC 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.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 152 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 216 ссылок. Диссертация содержит 51 схему и 7 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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 1). 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 1):

- 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 получен 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.

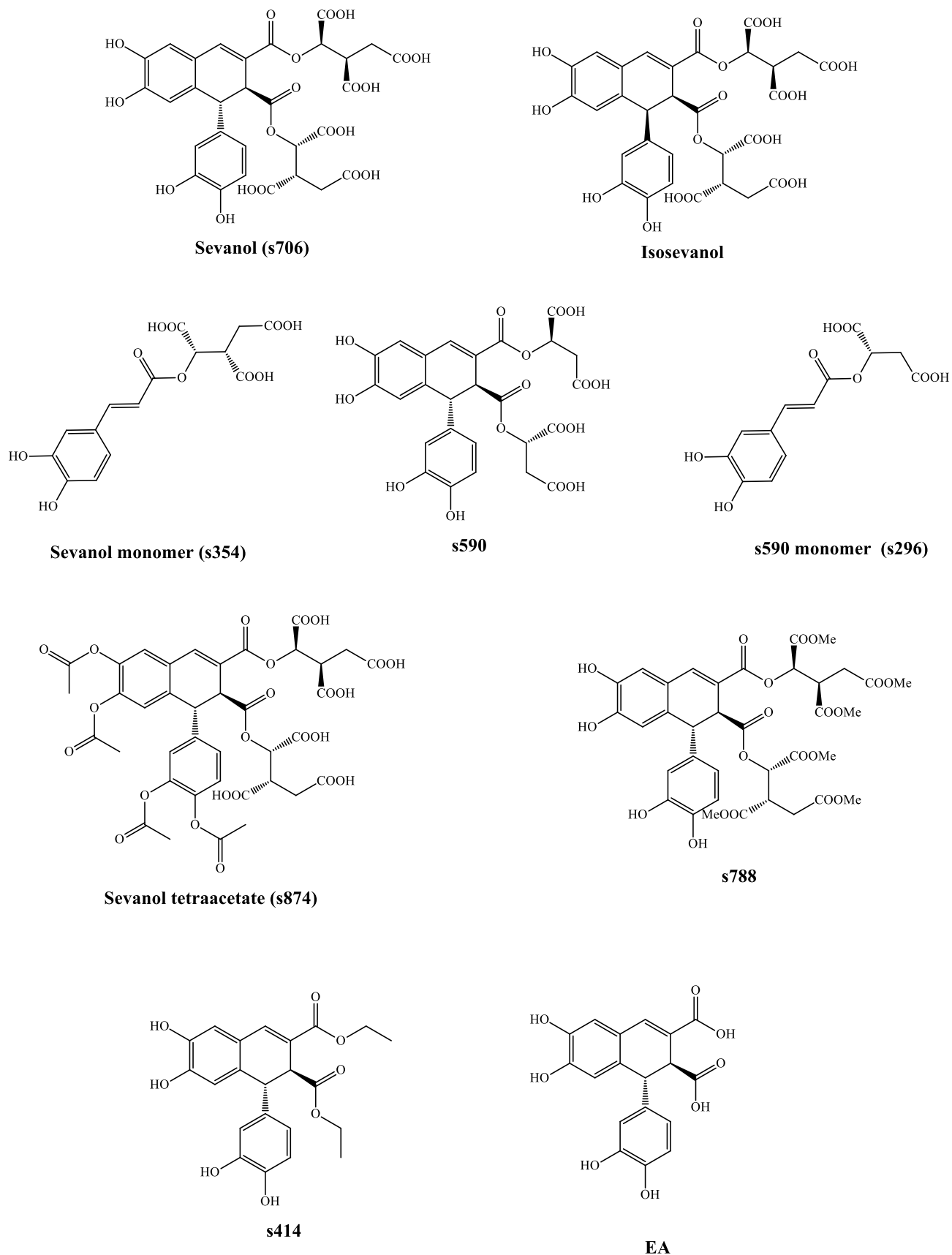


Схема 1. Пространственные структуры севанола и его аналогов, исследуемых в диссертационной работе.

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 FeCl₃, Ag₂O, MnO₂ 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 три-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты (3) и соответствующе защищенной кофейной кислоты (4). Далее планировалось провести окислительную димеризацию двух молекул эфира кофейной кислоты в соответствующих условиях с последующим снятием защитных групп с карбоксильных частей севанола (Схема 2).

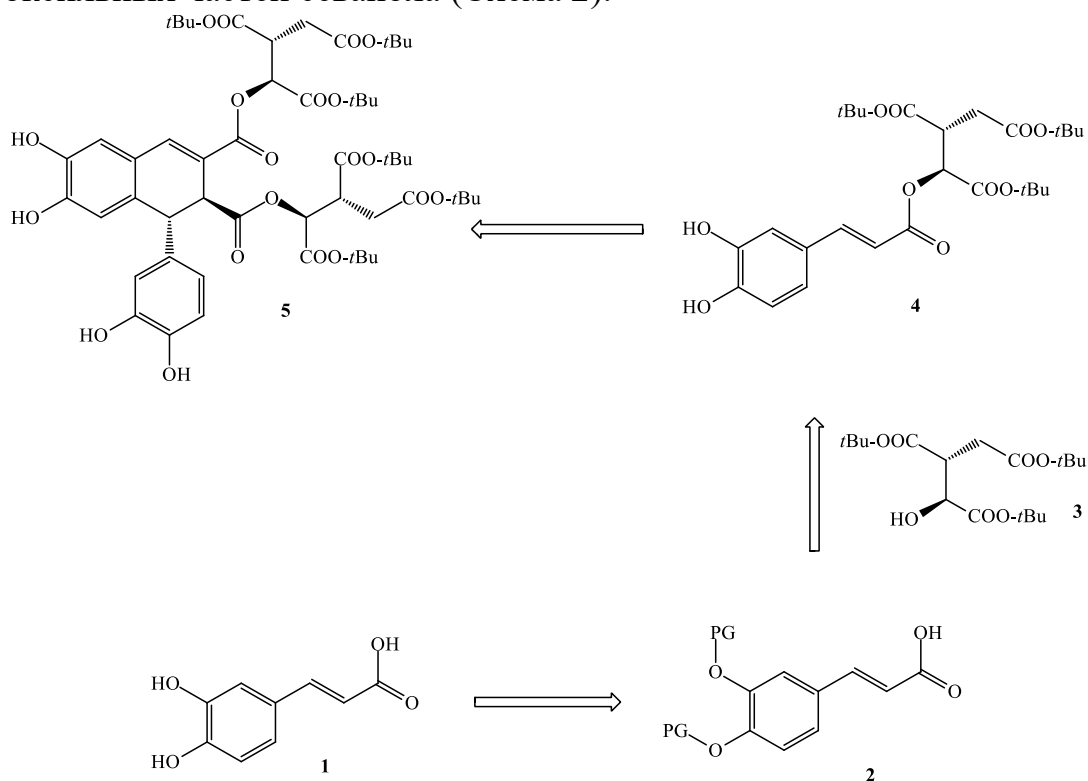


Схема 2. Ретросинтетический путь получения севанола.

1.1 Синтез три-трет-бутилового 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. Исходя из структуры севанола (**s706**), которая представляет собой дигидронафталиновый скелет с присоединенными к нему по сложноэфирным связям остатками изолимонной кислоты очевидно, что удаление 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 удаления защитных групп соединения **5**. В качестве претендентов для защиты гидроксильных групп изолимонной кислоты были выбраны кислото-чувствительные третбутильные защитные группы.

Первоначально для получения одного из ключевых интермедиатов **3** нами за основу была взята методика, опубликованная Ф. Кало с соавторами². Метод синтеза три-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты **3** состоял из семи последовательных стадий, где исходным соединением выступала природная (L)-яблочная кислота **9** (схема 3). Общий выход по литературным данным составлял 17%.

В результате модификаций первых двух стадий изложенной методики были подобраны оптимальные условия, позволяющие получить бис-трет-бутиловый эфир (L)-яблочной кислоты **10** с общим выходом за две стадии 59% (схема 4). Последующие стадии, описанные в методике Кало с соавторами, протекали без существенных трудностей и не требовали подбора более подходящих условий. 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-трет-бутиловых эфиров (L)-яблочной кислоты в качестве алкилирующих реагентов также возможно использование самых разных алкилирующих агентов. 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 трет-бутилбромацетата **11** (схема 4) позволило получить молекулу три-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты **3** в одну стадию вместо описанных в методике Кало с соавторами четырех последовательных превращений.

В результате проведенных экспериментов нам успешно удалось повысить общий выход три-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты **3** и существенно сократить количество стадий, что повысило эффективность наработки ключевого

² Calo F., Richardson J., Barrett A. G. M. Total synthesis of citrafungin A. // *J. Org. Chem.* 2008. Т. 73. С. 9692-9697

интермедиата **3**, а в дальнейшем увеличивало общий выход полного синтеза аналога природного севанола (**s706**).

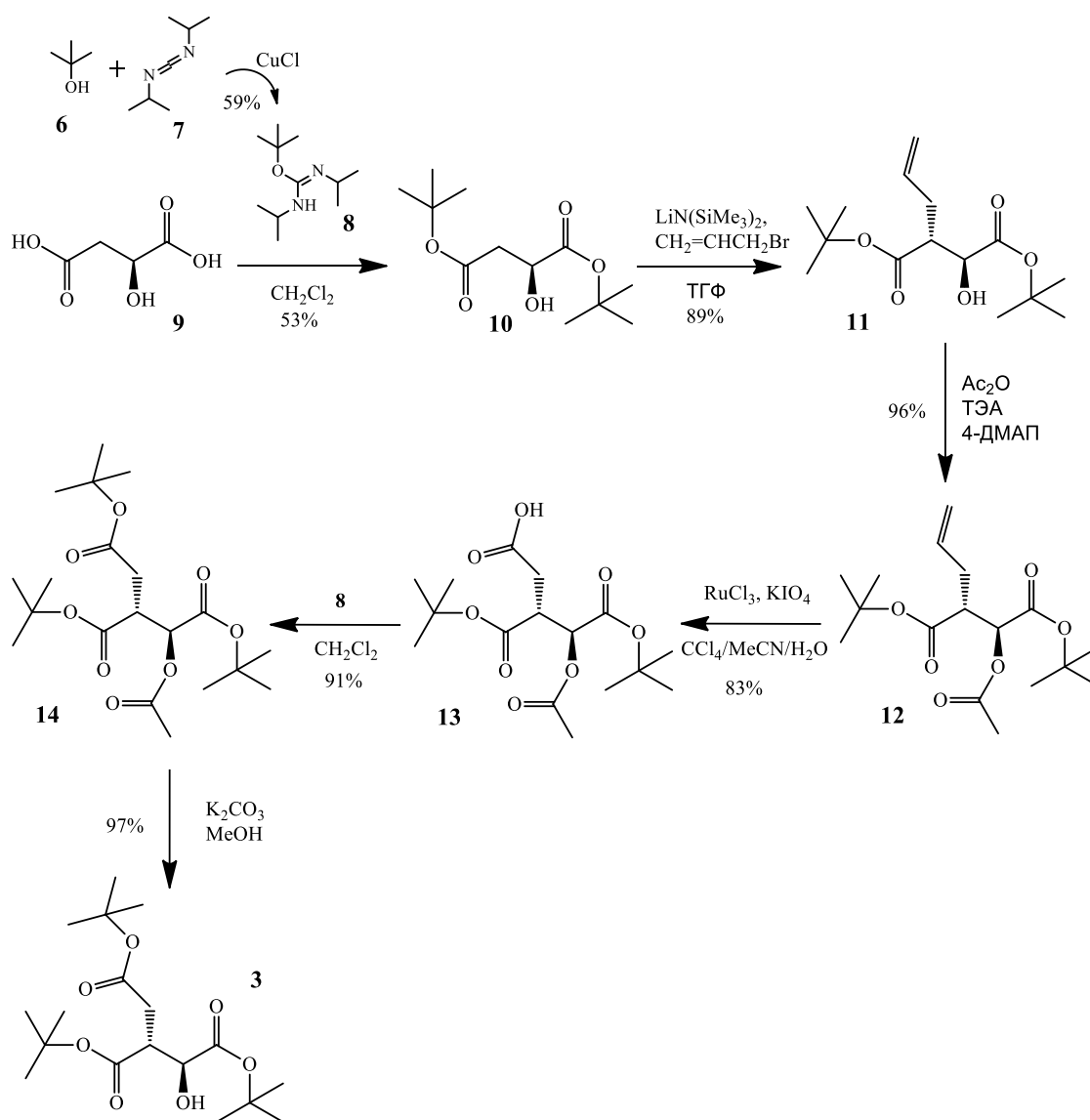


Схема 3. Синтез три-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты **3**.

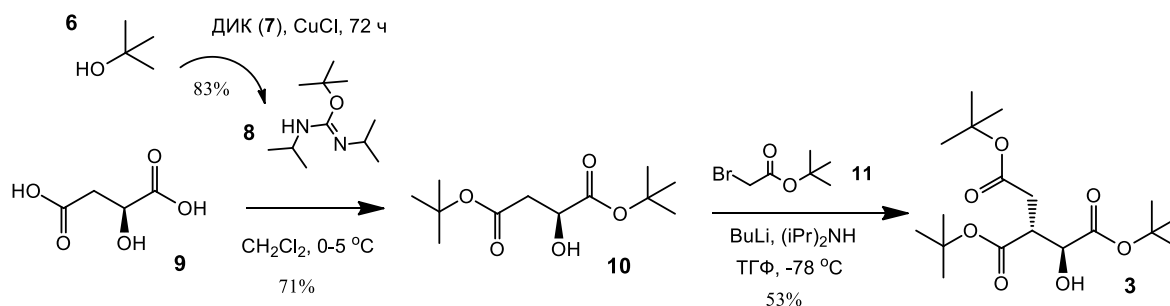


Схема 4. Оптимизированный синтез три-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты **3**.

1.2 Синтез сложного эфира три-трет-бутилового 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 **1**. Впоследствии именно это соединение подвергалось окислительной димеризации с последующим снятием третбутильных защит в целевую молекулу севанола (**s706**). В данном случае защитные группы (PG) для гидроксильных групп выбирались по принципу 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 2).

Первоначально в качестве защитных групп были выбраны силильные и аллильные группы. 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 севанола³. 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 5). 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%. Однако, последующие попытки качественно удалить силильные группы с использованием различных условий провалились ввиду частичного или полного гидролиза сложного эфира коричной кислоты. Для удаления защитных групп пробовали использовать такие условия как тетрабутиламмоний фторид в ТГФ, тетрабутиламмоний фторид в уксусной кислоте и KF в спиртах.

Вследствие того, что TBDMS – защитные группы оказались неподходящими, было решено попробовать использовать в качестве защиты гидроксильных групп соединения кофейной кислоты **1** аллильную защиту. 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 защитить гидроксилы метоксиметильными группами (MOM). 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. Затем в результате

³ 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. Т 75. С. 1783-1794.

конденсации соединения **18** с малоновой кислотой **19** в присутствии N-метилпиперидина была получен 3,4-бис-метоксиметилбензальдегид **15в** с выходом 90% (схема 6).

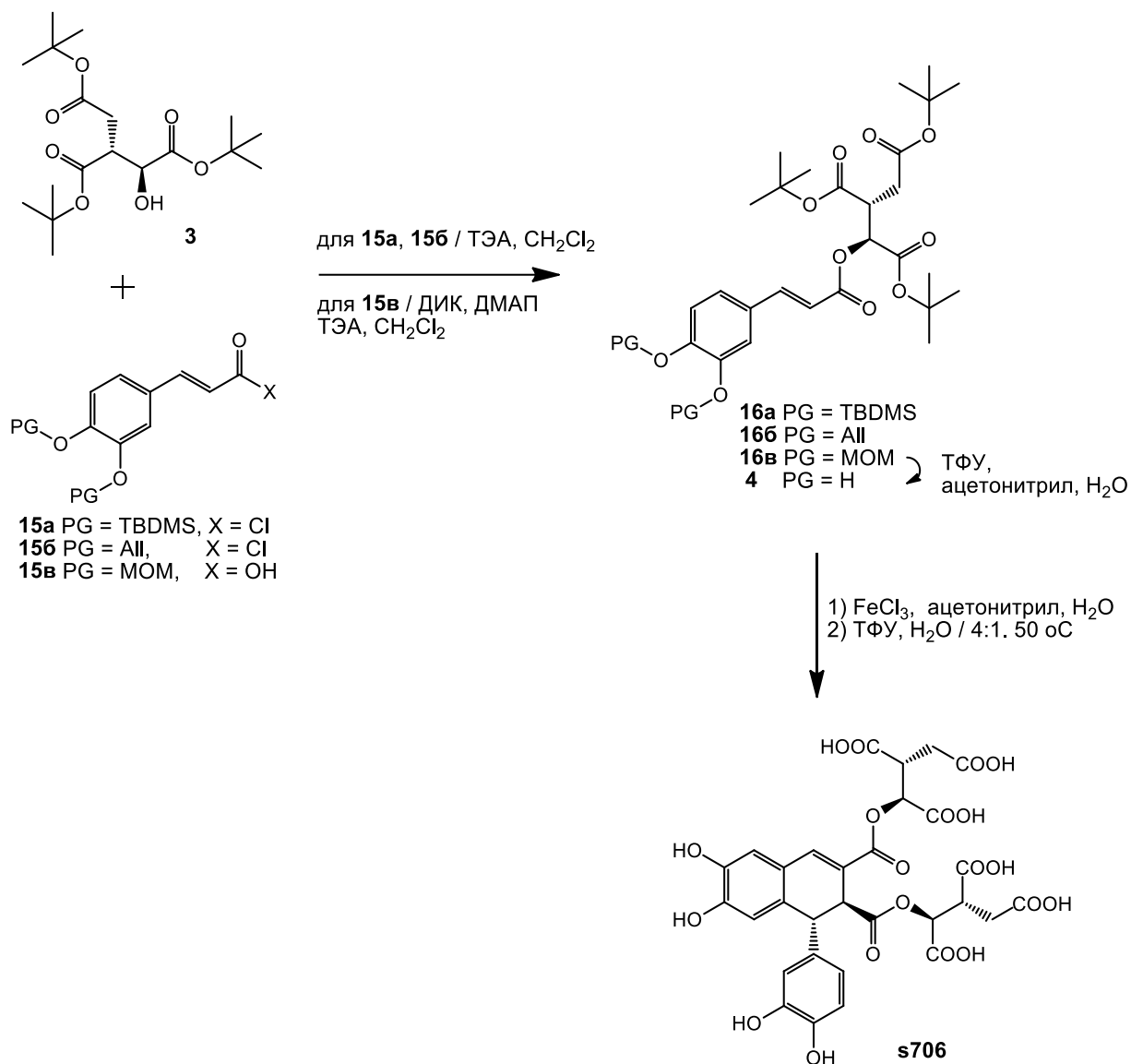


Схема 5. Первичная схема полного синтеза севанола (s706).

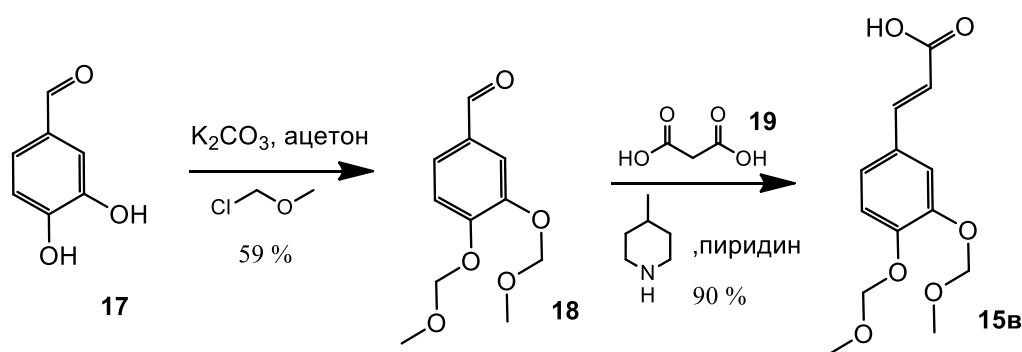


Схема 6. Схема синтеза 3,4-бис-метоксиметил защищенной коричной кислоты **15в**.

Изоцитрат кофейной кислоты **16в** был получен в одну стадию путем конденсации три-трет-бутильного эфира изолимонной кислоты **3** с синтезированной ранее 3,4-бисметоксиметил защищенной коричной кислотой **15в** в присутствии триэтиламина, диизопропилкарбодиимида (ДИК) и каталитического количества диметиламинопиридина (ДМАП) (схема 5). 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 5). 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**).

Исходя из этого, было продолжено проведение дальнейшей экспериментальной работы по подбору подходящей защиты для гидроксильных групп молекулы кофейной кислоты **1** (схема 2). В ходе очередного анализа существующих публикаций, посвященных получению аналогов природных лигнанов и неолигнанов было обнаружено, что также могут использоваться и ацетильные защитные группы^{4,5}. В качестве исходного материала для такой стратегии была выбрана кофейная кислота **1**, которая подвергалась обработке 5 эквивалентами уксусного ангидрида (Ac₂O) в присутствии пиридина в качестве основания при низкой температуре -20 °С (схема 7). Далее к бис-ацетил кофейной кислоте **20а**, растворенной в бензоле, прикапывали 1,2 эквивалента тионил хлорида (SOCl₂) и кипятили четыре часа в присутствии диметилформамида (ДМФ) как катализатора.

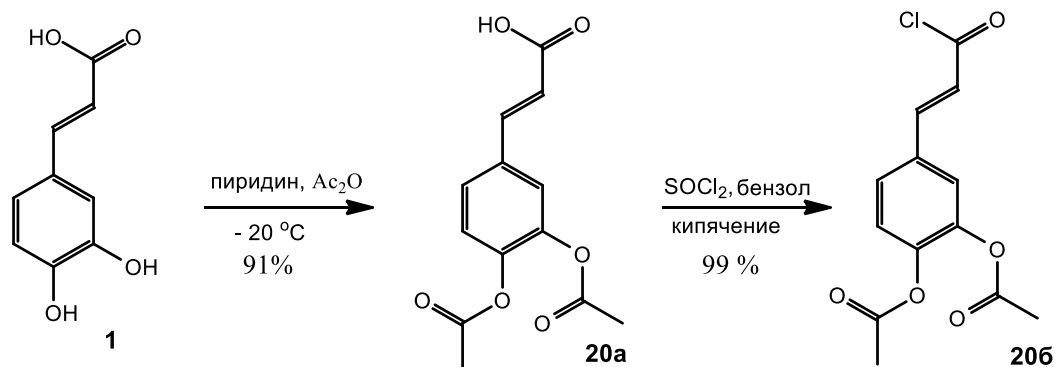


Схема 7. Схема синтеза хлорида 3,4-бисацетил защищенной коричной кислоты **20б**.

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

⁴ 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. Т. 59. № 4. С. 502-507

⁵ 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*)-chiroic acid. // *Helvetica Chimica Acta.* 2002. Т. 85. С. 2328-2334.

группы, при перемешивании реакционной смеси в ТГФ при охлаждении до 0-5 °С (схема 8). N-метилпиперазин эффективно гидролизовал соответствующе защищенный кофейный изоцитрат **21** и сохранял третбутиловые эфиры на изолимонной части ключевого интермедиата **4**. Выход на данной стадии получения продукта **4** оказался достаточно высоким и составил 96%.

Финальная схема синтеза продукта **4** отражена на схеме 8. Далее требовалось подобрать эффективные условия окислительной димеризации мономера **4** и условия удаления третбутильных защит с изолимонной части с целью трансформации в необходимый дигидронафталиновый лигнан севанола (**s706**).

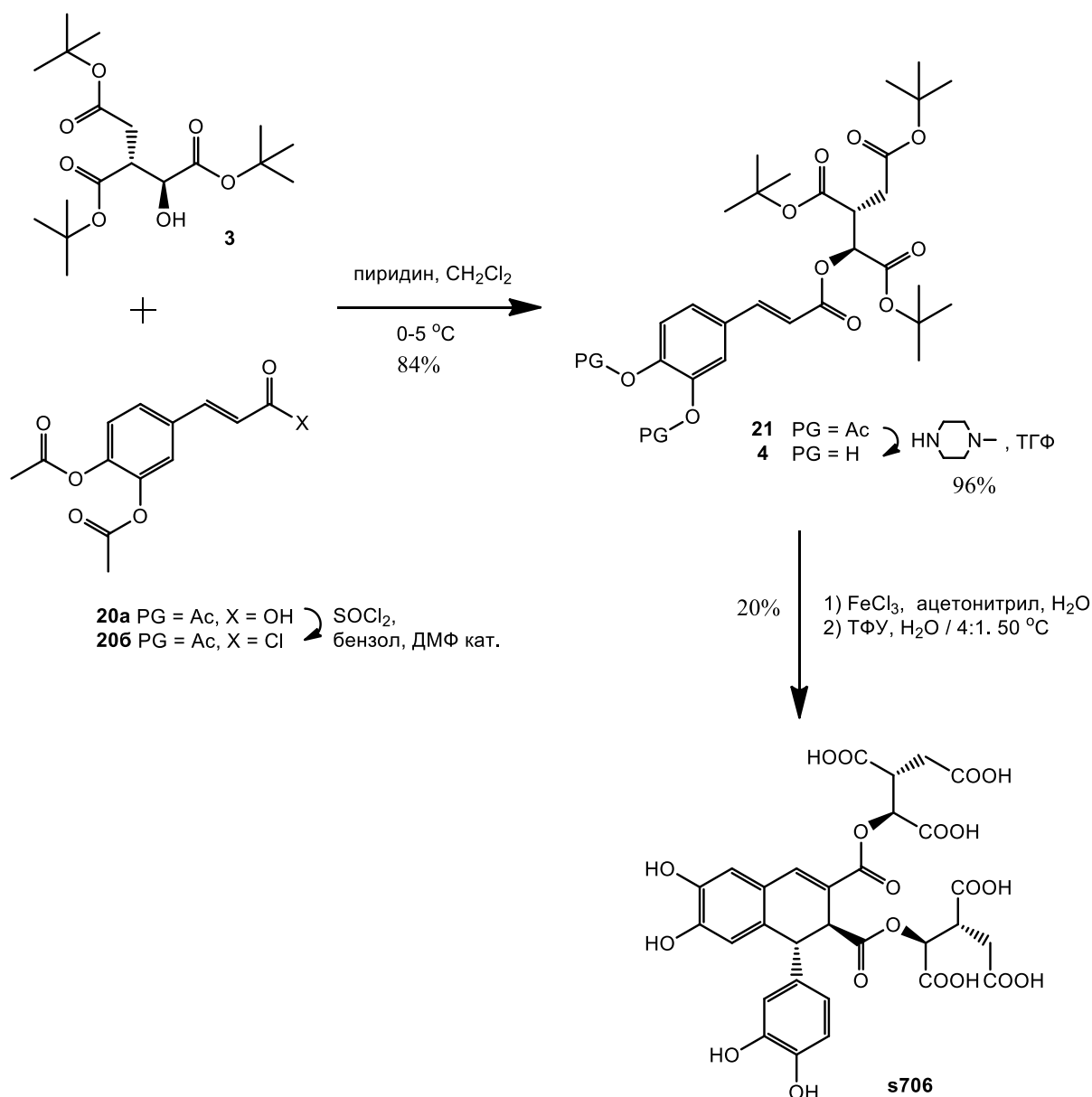


Схема 8. Оптимизированная схема полного синтеза севанола (**s706**).

1.3 Окислительная димеризация три-трет-бутилового 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^{6,7}. 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 8). Основные эксперименты по подбору условий отражены в таблице 1.

Попытки димеризовать изоцитрат кофейной кислоты **4** с использованием в качестве окислительных агентов таких соединений, как $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, $\text{Fe}(\text{acac})$, $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, MnO_2 , $\text{Mn}(\text{acac})$, KMnO_4 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ при комнатной температуре не приводили к образованию целевого дигидронафталинового лигнана **5** (схема 2). Анализ реакционной смеси выполнялся при помощи хромато-масс-спектрометрического анализа LCMS. 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 целевого продукта также было подтверждено методами ЯМР-спектроскопии. Использование Ag_2O для окислительного сочетания приводило к выходу продукта лигнана менее 1% и первостепенному образованию неолигнанных структур.

Значительная часть литературных данных посвящена проведению окислительной димеризации производных сложных эфиров кофейных кислот в присутствии FeCl_3 ^{3,8}. 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 три-трет-бутилового 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** в присутствии FeCl_3 . После изучения образовавшихся побочных продуктов была обнаружена проблема формирования хлорированных продуктов реакции. Эта проблема могла бы быть решена путем проведения реакции

⁶C. 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. С. 6289-6300.

⁷ 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.

⁸ 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. С. 574-578

димеризации при более низкой температуре, в отсутствии 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 °С проходила в течение двух часов. При повышении температуры до 10 °С мы наблюдали образование продукта окисления дигидрохинолинового цикла целевой молекулы **5** в хинолиновый. При 0 °С 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 (таблица 1). Полученные продукты реакции были выделены и проанализированы с помощью хромато-масс-спектрометрии LCMS.

Таблица 1. 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

Таким образом, в ходе проведенных многочисленных экспериментов было выявлено, что использование 2.5 эквивалентов $FeCl_3$ в качестве окислителя и смеси

ацетонитрил-вода в качестве растворителя при охлаждении до 5 °С в отсутствие доступа света в течение двух часов является оптимальным для синтеза подобного дигидронафталинового лигнана **5**.

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** 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**, 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 9). Из сравнительного анализа очевидно, что химический сдвиг 4.09 относится к натуральному севанолу, а 4.02 к его изомеру (схема 10).

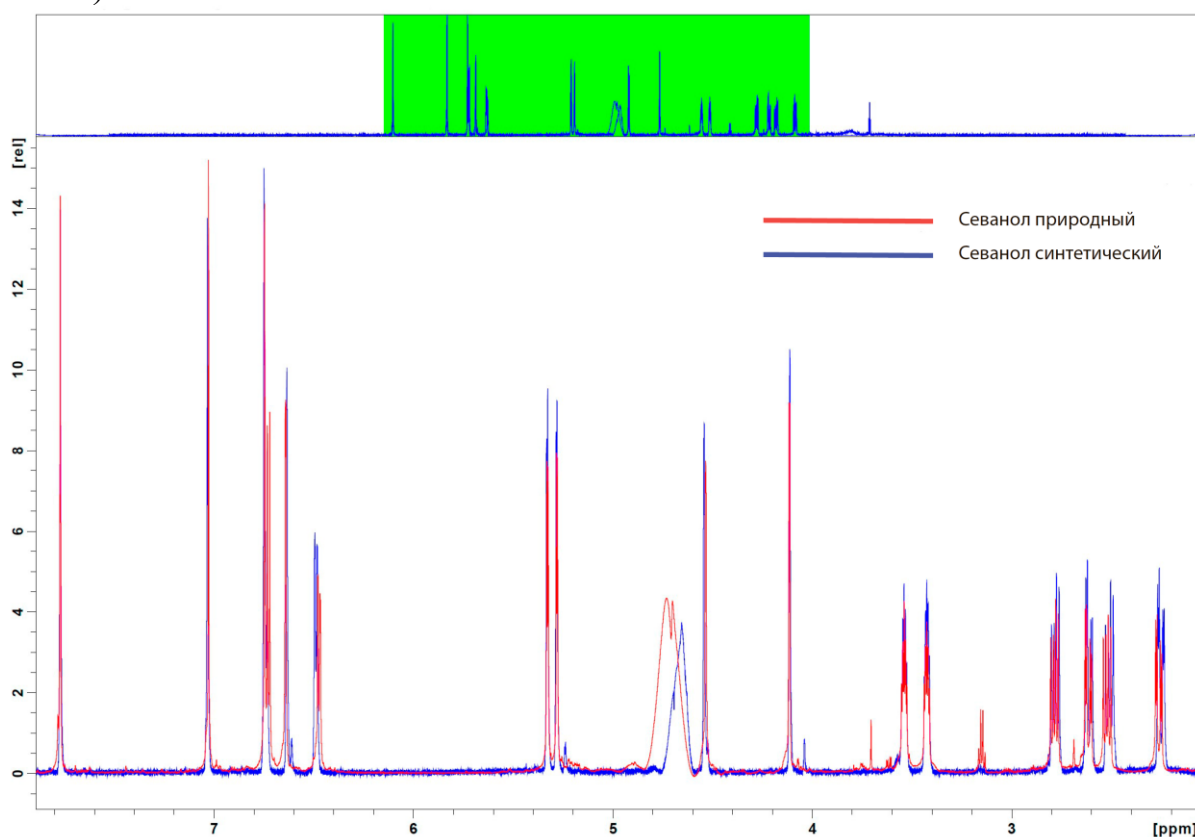


Схема 9. Сравнение химических сдвигов протонов основного диастереомера **s706** в ¹H ЯМР спектрах природного севанола (красный) и синтетического аналога севанола (синий). Спектр снят в растворителе D₂O при pH 2.51.

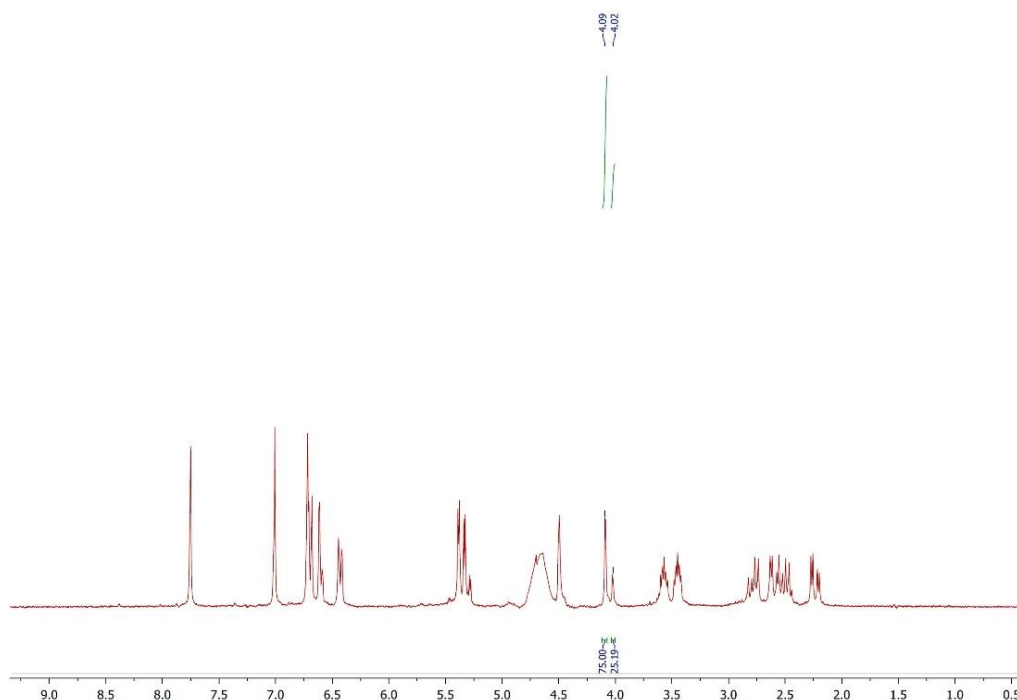


Схема 10. ЯМР спектр образца сравнения с содержанием стереоизомеров 1:3. Химический сдвиг 4.09 соответствует аналогу природного севанола, 4.02 – его диастереомеру.

2. Синтез модифицированных по сложноэфирной части аналогов севанола

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 необходимым 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 (**Isosevanol**, **s354**, **s874**, **s788**) и его аналоги (**s590**, **s296**, **s414**, **EA**) (схема 2). Некоторые из аналогов потребовали небольшого изменения в общей методике синтеза.

2.1 Синтез аналогов севанола: изосеванол s706, s354, s788, s874

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 удастся 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.

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-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты и кофейной кислоты **4** (схема 8) и последующим снятием 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 соединения **s706** (схема 10).

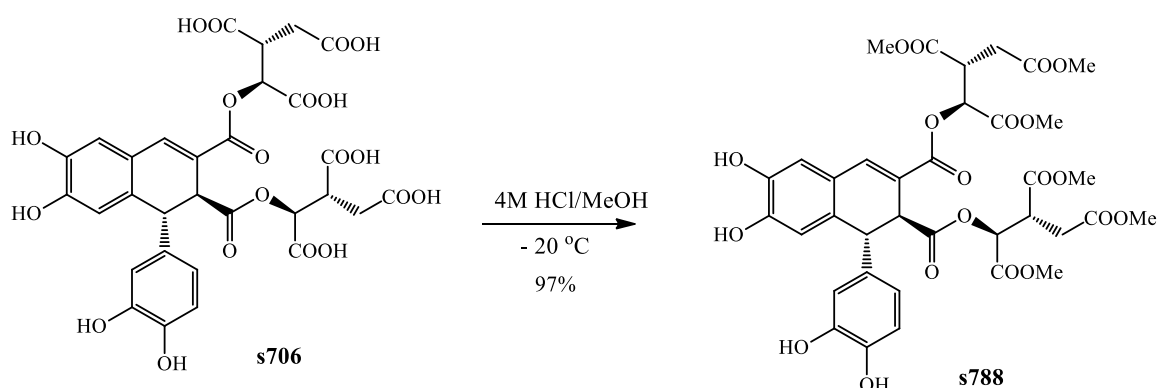


Схема 10. Схема синтеза аналога севанола **s788**.

Димер с дополнительными ацетильными группами на фенольной части молекулы **s874** был получен 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** (схема 11).

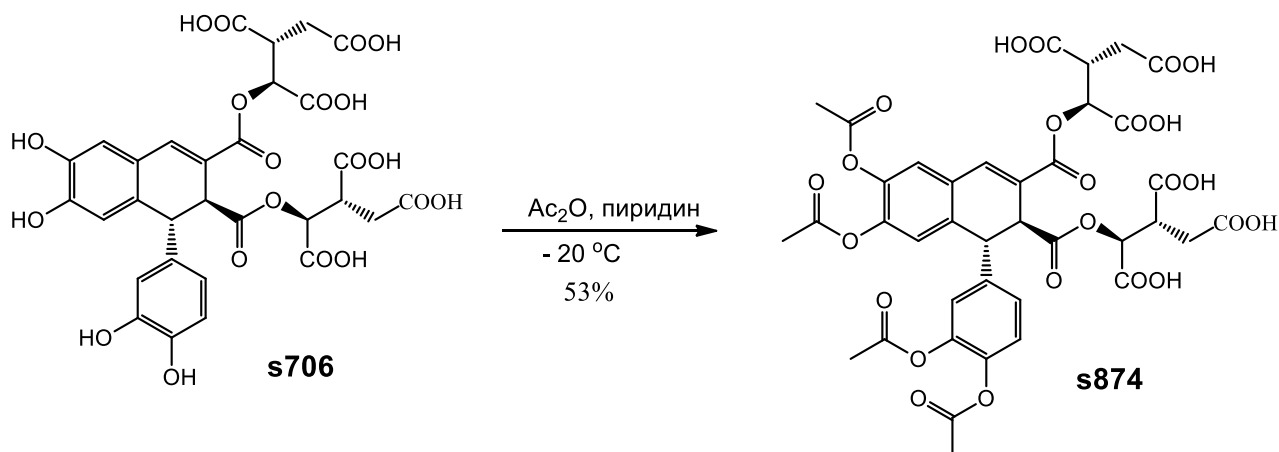


Схема 11. Схема синтеза аналога севанола **s874**.

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 карбоксиллов 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-трет-бутиловый эфир яблочной кислоты **10** (схема 12).

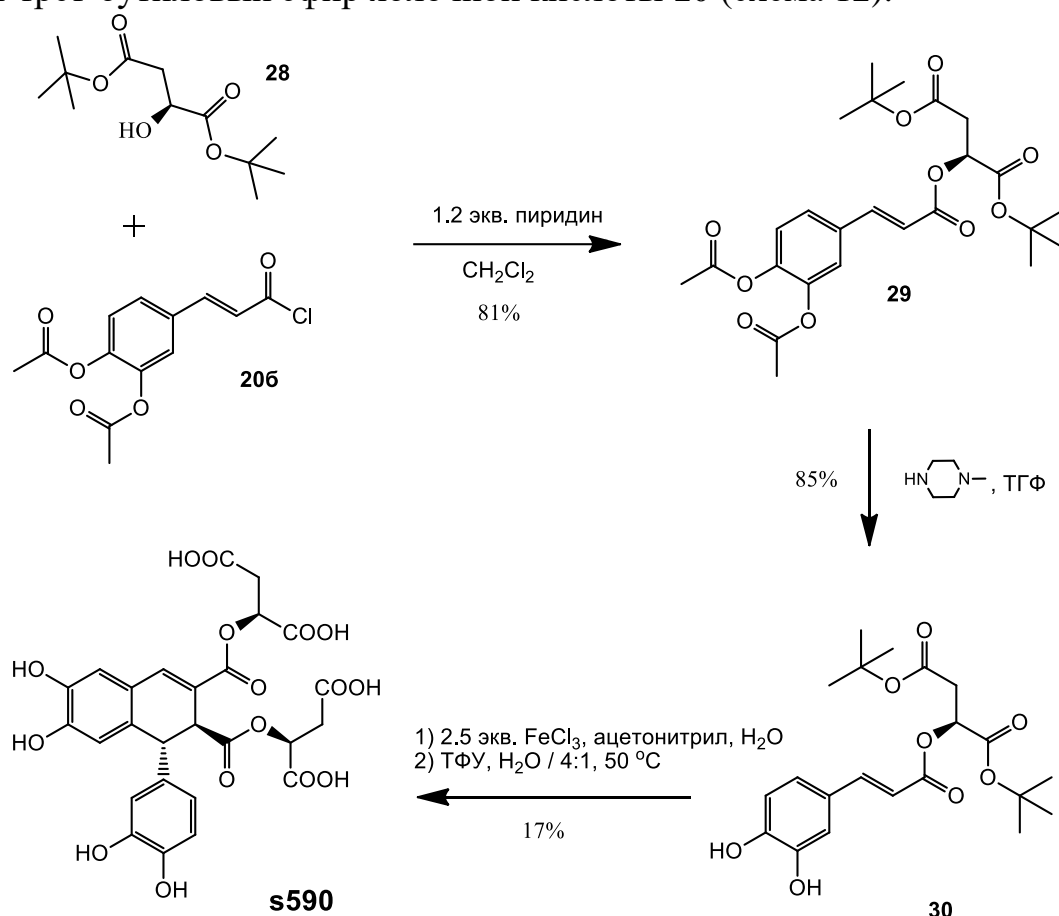


Схема 12. Схема полного синтеза аналога севанола сложного эфира эпифиловой кислоты и двух остатков (L)-яблочной кислоты **s590**.

Соединение **s296** было синтезировано путем снятия третбутильных защит с сложного эфира бис-ацетил защищенной кофейной кислоты и (L)-яблочной кислоты **30** с использованием смеси ТФУ – вода = 4:1 при нагревании 50 °С.

2.3 Синтез производных и аналогов севанола: **s414**, **EA**

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 отсутствии доступа света (схема 13).

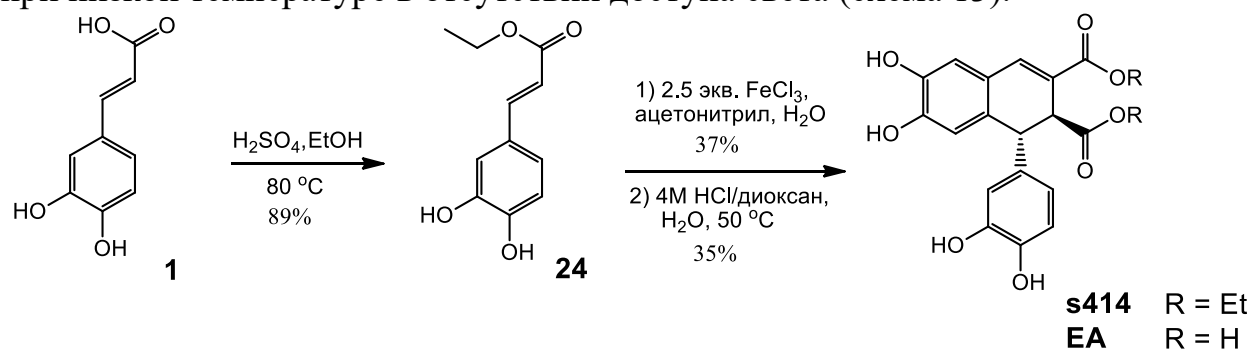


Схема 13. Схема полного синтеза аналога севанола ди-этилового эфира эпифиловой кислоты **s414** и эпифиловой кислоты **EA**.

Исходным материалом являлась кофейная кислота **1**, которая была трансформирована в этиловый эфир **24** с помощью этерификации в этаноле в присутствии каталитических количеств серной кислоты при кипячении. 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 снятия защит с 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 5М 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 4М HCl в диоксане в присутствии воды при комнатной температуре. После соответствующей обработки реакционной смеси, очистки при помощи полупрепаративной системы ВЭЖХ соединений эпифиловой кислоты **EA** было успешно выделено с выходом 35%.

3. Биологическая активность синтетического севанола и его аналогов

Данный раздел посвящен исследованию биологической активности полученных соединений, с помощью методов электрофизиологии и структурно-функционального анализа. Основной целью было:

- определить биологическую активность и эффективность изучаемых синтетического севанола (**s706**) и его аналогов (схема 2);
- провести анализ структурно-функциональной зависимости лиганд-рецепторного взаимодействия;
- определить структурные особенности, влияющие на селективность изоформ ASICs, 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.

3.1 Изучение и сравнение биологической активности синтетического аналога севанола (**s706**), диастереомера севанола (**Isosevanol**) 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 ASICs-канал. Синтезированный оптически чистый севанол и севанол, выделенный из природного сырья, в результате экспериментов показали одинаковую активность. При тестировании изомера (**Isosevanol**) и мономера севанола (**s354**) была показана значительно меньшая ингибирующая активность этих соединений по отношению к ASIC каналам (схема 14). Данный результат демонстрирует, что пространственное положение стереоцентра кора севанола **s706** значительно влияет на проявляемую лигнаном биологическую активность, а

именно эффект подавления токов ASIC каналов изомера **Isosevanol** 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 ASICs-каналам. Результаты электрофизиологических тестов показали, что существенного отличия от оптически чистого синтетического лигнана **s706** не наблюдалось (схема 15).

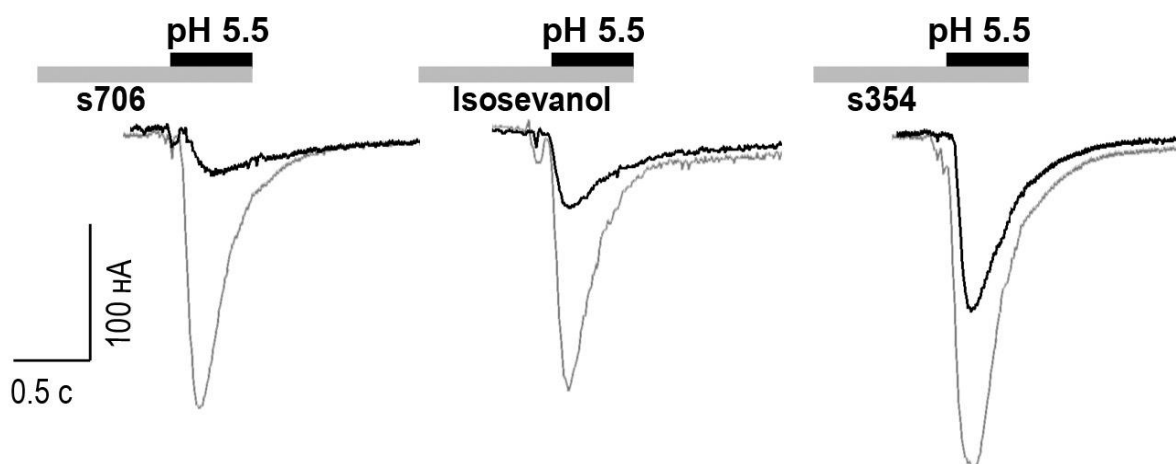


Схема 14. Измерение ингибирующей активности севанола **s706**, диастереомера севанола **Isosevanol** и мономера севанола **s354** в концентрации 0.2 мМ на ASIC3-каналах человека, экспрессированных в ооцитах лягушки *X.laevis*. Приведены записи измеренных токов через мембрану клетки, вызванных изменением pH наружного раствора с 7.8 до 5.5.

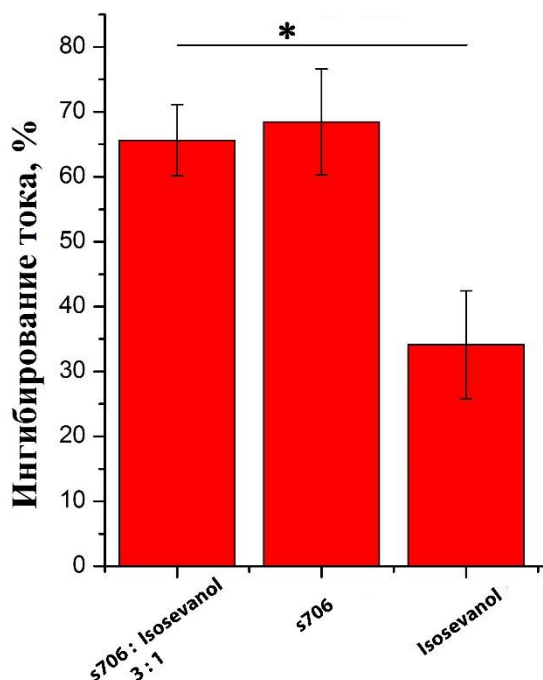


Схема 15. Сравнение ингибирующей активности севанола **s706**, диастереомера севанола **Isosevanol** и смеси севанола (**s706**) и изомера севанола (**Isosevanol**) в соотношении 1:3 в концентрации 0.3 мМ на ASIC1a-каналах. На графике указана обратная величина значения IC₅₀ для ингибирующих эффектов на ASIC1a каналах.

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 16-17). В результате проведенных электрофизиологических экспериментов была продемонстрирована ингибирующая способность по отношению к обеим изоформам ASIC1a и ASIC3 у лигнанов севанола и трех его аналогов **s590**, **EA**, **s874**. 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 16). 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 2).

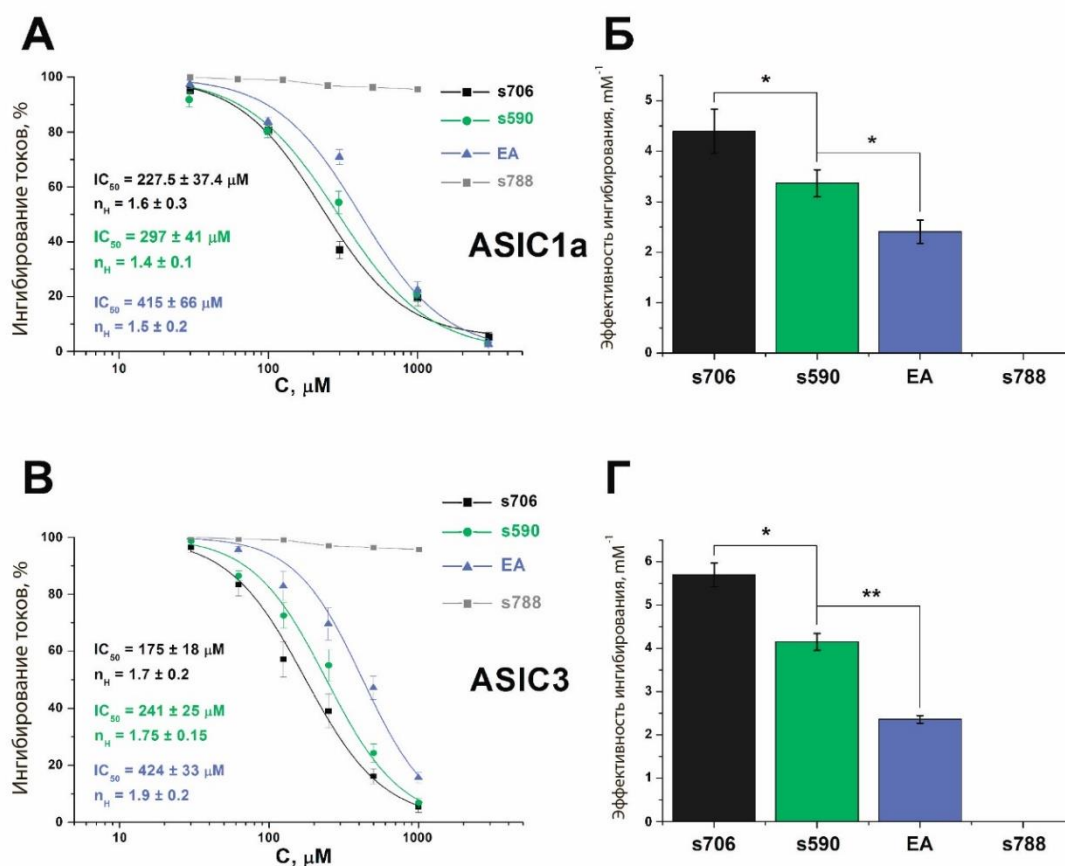


Схема 16. Ингибирующая активность севанола (**s706**) и его аналогов (**s590**, **EA**, **s788**). Измеренные токи были вызваны изменением pH наружного раствора с 7.4 до 5.5, фиксированы при значении потенциала -50 мВ. (А) и (В) являются графиками дозозависимости ингибирующего эффекта по отношению к ASIC1a и ASIC3 для соединения **s706**, **s590**, **EA**. (Б) и (Г) показывают обратную величину значений IC_{50} для ингибирующих эффектов на ASIC1a и ASIC3 для соединений **s706**, **s590**, **EA**. Статистически достоверные различия * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

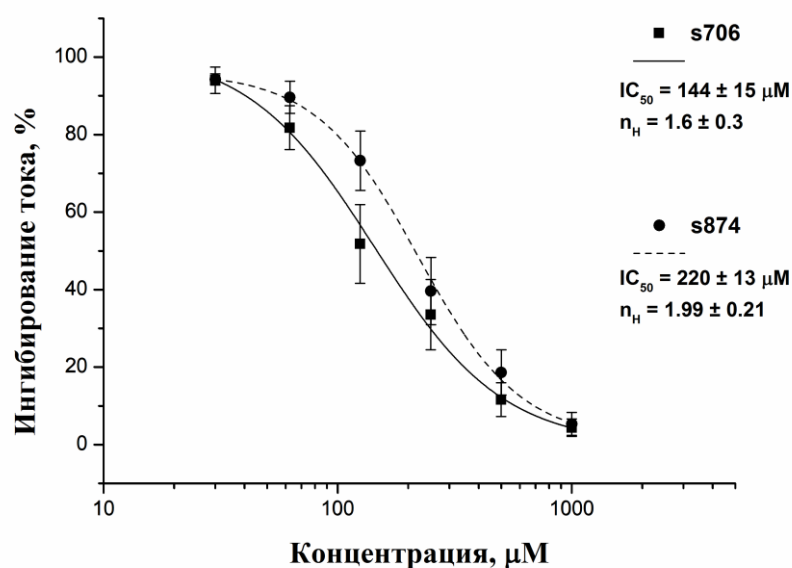


Схема 17. Ингибирующая активность севанола **s706** и его защищенного ацетильными группами по гидроксилам аналога **s874**. Измеренные токи были вызваны изменением pH наружного раствора с 7.4 до 5.5, фиксированы при значении потенциала -50 мВ.

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 16). 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.

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 (центральный вестибюль куриного канала). На схеме 18 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. Таким образом, можно предположить, что сайт связывания севанола также находится в области центрального вестибюля.

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 лиганна севанола является центральный вестибюль (схема 19).

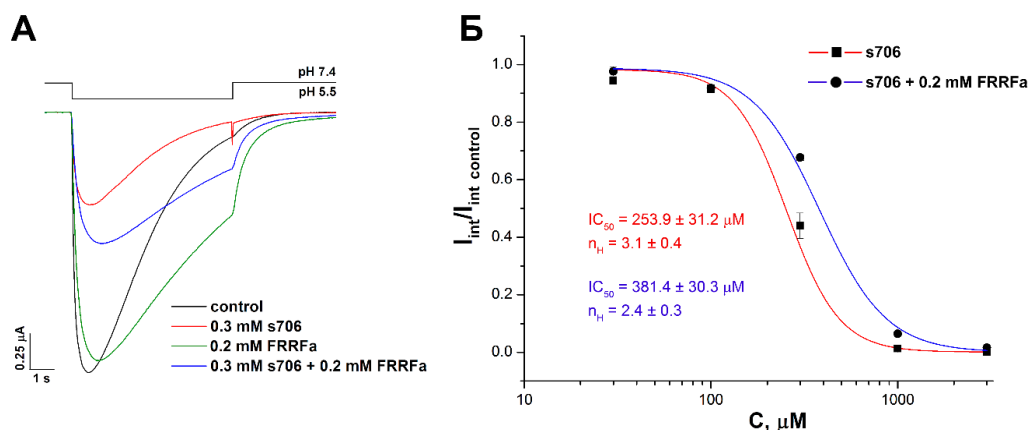


Схема 18. Сравнение ингибирующего эффекта севанола (**s706**) и пептида FRRF-амида (FRRFa) на ток ASIC1a. **(А)** Репрезентативные следы вызванных pH 5,5 токов только ASIC1a (черная кривая) и ASIC1a с 15-секундной предварительной инкубацией 300 мкМ **s706** (красная кривая), 200 мкМ FRRFa (зеленая кривая) 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.

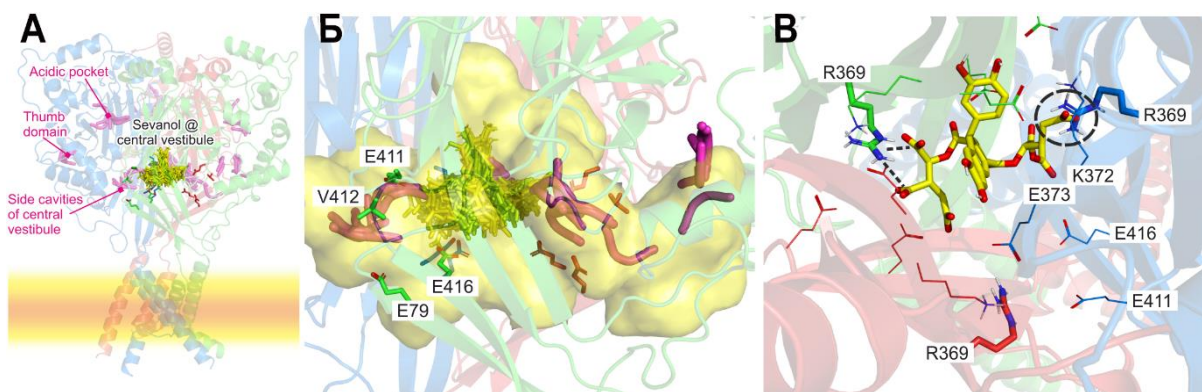


Схема 19. Докинг севанола **s706** на модели крысиного ASIC1a-канала **(А-В)** и сравнение с докингом FRRFa-пептида **(А,Б)**. **(А)** Модель закрытого ASIC1аканала крысы. Желтые фрагменты отображают 20 решений по возможному положению севанола в центральном вестибюле; пурпурные фрагменты отображают результаты докинга для FRRFa-пептида [210]. **(Б)** Приближенный вид центрального вестибюля **(А)**. Отмечены несколько а.о. канала, необходимые для связывания FRRFa (подтверждено мутагенезом). На рисунке можно отметить частичное перекрытие сайтов связывания севанола и FRRFa-пептида. **(В)** 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 лигнад-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 2). При этом неактивный аналог **s788**, характеризующийся полным отсутствием незащищенных карбоксилатов, подтверждает значимость этих функциональных групп в проявлении биологической активности подобных лигнанов.

3.3 Анальгетическая активность севанола.

Сотрудниками лаб. 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 дистрибуции севанола **s706** наблюдалось уменьшение количества уксусных корчей (схема 20). 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 20, 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 21).

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 уксусные корчи и горячую пластину ясно показали преимущества перорального метода введения севанола, который, несомненно, должен быть предпочтительнее для использования севанола в качестве фармацевтического обезболивающего препарата.

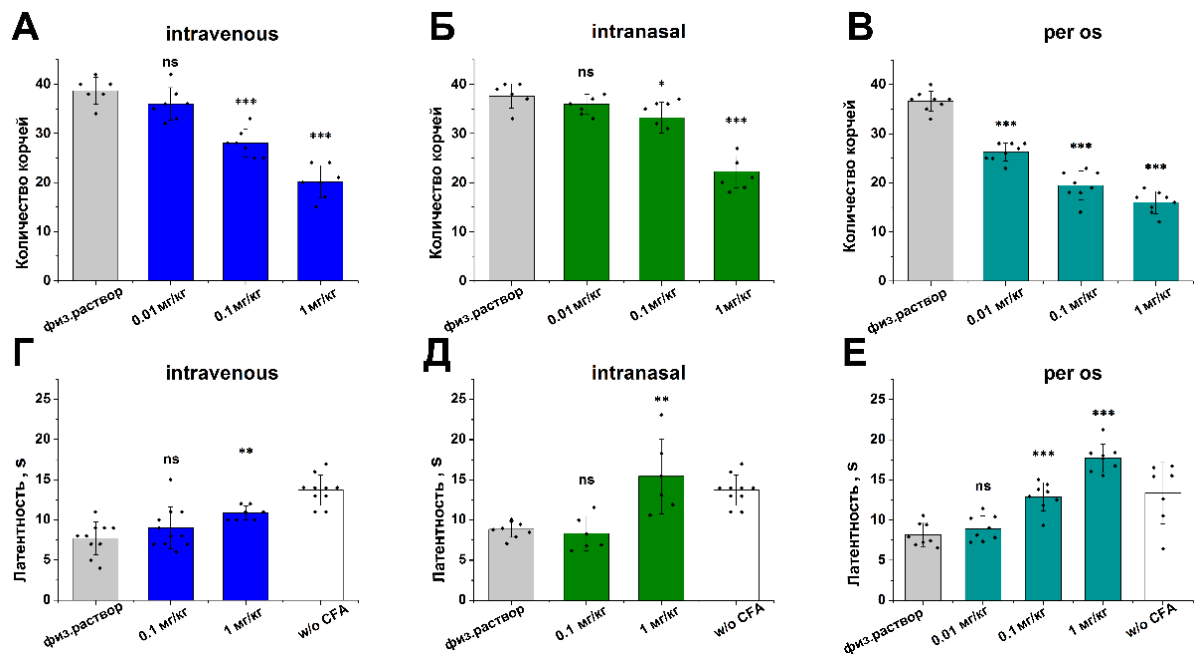


Схема 20. Анальгетический и противовоспалительный эффекты севола s706 при внутривенном, интраназальном и пероральном методе доставки препарата. Влияние севола на корчи, вызванные уксусной кислотой (А, Б, В), и на латентный период вывода мышей на горячей пластине в тесте на тепловую гипералгезию после инъекции CFA (Г, Д, Е) при внутривенном введении (А и Г) интраназальное (Б и Д) и пероральное (В и Е) введение.

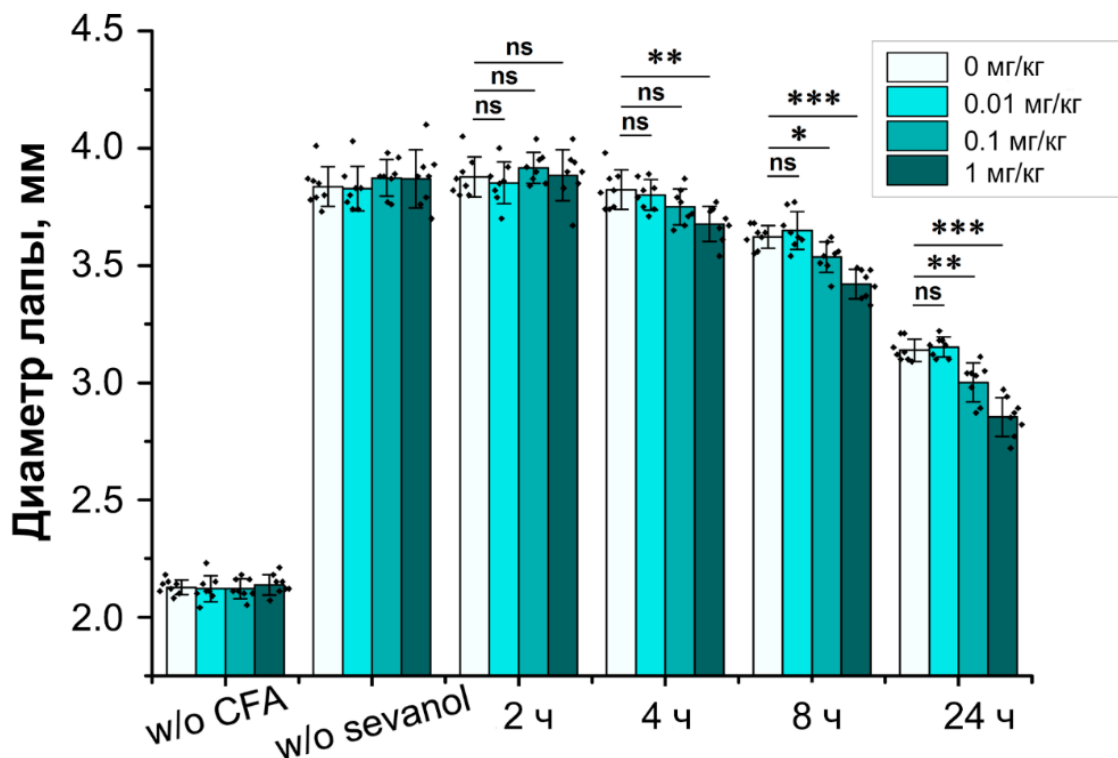


Схема 21. Противовоспалительный эффект севола после перорального приема препарата. Отек лапы, вызванный инъекцией CFA, оценивался до введения CFA и севола, а также через 2, 4, 8 и 24 часа после перорального введения севола в разных дозах.

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.

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. **Belozerova 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. **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, 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. **Belozerova 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., **Belozerova 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