

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ  
ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ԵՎ ԴԵՂԱԳՈՐԾԱԿԱՆ ՔԻՄԻԱՅԻ  
ԳԻՏԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԿԵՆՏՐՈՆ

**ՄԱԿԻՉՅԱՆ ԱՆԻ ՏԻԳՐԱՆԻ**

**ԿԱՆԱԶ ՖԼՈՒՈՐԵՍԵՆՏՈՂ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԻ ՔՐՈՄՈՖՈՐԻ ԱԾԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ  
ՍԻՆԹԵԶԸ, *IN VITRO* ԵՎ *IN SILICO* ՀԱԿԱԽՈԼԻՆԵՍԹԵՐԱԶԱՅԻՆ  
ՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ**

Բ.00.03-«Օրգանական քիմիա» մասնագիտությամբ  
քիմիական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

**Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր**

**ԵՐԵՎԱՆ – 2023**

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР  
ОРГАНИЧЕСКОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

**МАКИЧЯН АНИ ТИГРАНОВНА**

**СИНТЕЗ, *IN VITRO* И *IN SILICO* ИССЛЕДОВАНИЕ  
АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОФОРА  
ЗЕЛЕНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук по специальности  
02.00.03 – «Органическая химия»

**ЕРЕВАН – 2023**

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Օրգանական և դեղագործական քիմիայի գիտատեխնոլոգիական կենտրոնում:

**Գիտական ղեկավար՝**

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ,  
քիմ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր

Թոփուզյան Վիգեն Օնիկի

**Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝**

քիմ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր  
քիմ. գիտ. թեկնածու

Ենգոյան Ալեքսանդր Փայլակի  
Գյուլբուդայան Աշոտ Լիպարիտի  
Երևանի պետական համալսարան:

**Առաջատար կազմակերպություն՝**

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2023 թ. նոյեմբերի 24-ին ժամը 15<sup>00</sup>-ին ՀՀ ԳԱԱ Օրգանական և դեղագործական քիմիայի գիտատեխնոլոգիական կենտրոնում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի Քիմիայի 010 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0014, ք. Երևան, Ազատության պող. 26):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ ՕԴՔԳՏԿ-ի գրադարանում:  
Սեղմագիրն առաքված է 2023 թ. հոկտեմբերի 24-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական  
քարտուղար, քիմ. գիտ. դոկտոր, դոցենտ



Ն.Գ. Հորոսյան

---

Тема диссертации утверждена в Научно-технологическом центре органической и фармацевтической химии НАН РА.

**Научный руководитель:**

член-корр. НАН РА,  
доктор хим. наук, профессор

Топузян Виген Оникович

**Официальные оппоненты:**

доктор хим. наук, профессор  
кандидат хим. наук

Енгоян Александр Пайлакович  
Гюльбудагян Ашот Липаритович

**Ведущая организация:** Ереванский государственный университет.

Защита диссертации состоится 24-ого ноября 2023 г. в 15<sup>00</sup> часов на заседании специализированного совета 010 по химии ВАК РА, действующего в Научно-технологическом центре органической и фармацевтической химии НАН РА (0014, г. Ереван, пр. Азатутян 26).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НТЦОФХ НАН РА.

Автореферат разослан 24-ого октября 2023 г.

Ученый секретарь специализированного  
совета, доктор. хим. наук, доцент



Н.Г.Обосян

## ОСНОВНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Болезнь Альцгеймера (БА) является одним из старческих когнитивных расстройств, широко распространенных среди взрослого населения мира. В 2017 г. насчитывалось более 48 миллиона пациентов, страдающих этой болезнью, и предполагается, что их количество до 2025г. достигнет 131 миллиона человек.

Основываясь на холинергической гипотезе, холинэстеразы стали важными мишенями для лечения БА. Механизм действия холинэстеразных ингибиторов включает усиление холинергической передачи в ЦНС, дефекты которой приводят к нарушениям памяти и мышления. Тем не менее, этот вид лечения не является полностью эффективным. В течение последних нескольких лет было показано, что холинэстеразы могут влиять на ряд других процессов, таких как агрегация  $\beta$ -амилоидов, благодаря наличию периферического анионного сайта (ПАС) в их структуре. Эти открытия привели к возрождению интереса к холинэстеразам, как к важной мишени в терапии болезни Альцгеймера, и многочисленные научные группы предприняли исследования относительно дизайна и синтеза новых ингибиторов холинэстераз.

Окислительный стресс также играет решающую роль в развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как БА. Предполагается, что система антиоксидантной защиты у пожилых людей ослаблена и не может нейтрализовать вредные для здоровья радикалы кислорода. В связи с этим для лечения БА предлагается использовать препараты, способные поглощать кислородные радикалы – антиоксиданты (антирадикальные вещества). Исходя из вышесказанного, можно заключить, что создание препаратов, обладающих мультифункциональными нейрозащитными функциями, является актуальной задачей. Известно, что 4(H)-имидазол-4-оны обладают антихолинэстеразными свойствами. С другой стороны имеются многочисленные свидетельства об антирадикальных свойствах соединений, содержащих фрагмент фенола. Комбинация этих структурных фрагментов может привести к соединениям, обладающим как антихолинэстеразными, так и антирадикальными свойствами. При конструировании таких молекул легко убедиться, что одним из вариантов являющиеся аналоги хромофора зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ).

**Цель работы.** Разработать методы синтеза производных хромофора ЗФБ, *in vitro* методом установить их антихолинэстеразные и антирадикальные свойства. Провести *in silico* исследования с целью выявления способов и закономерностей взаимодействия этих лигандов как с ацетилхолинэстеразой, так и с бутирилхолинэстеразой, а также некоторых биохимических свойств.

**Научная новизна.** Установлена пригодность О-бензоильной защитной группы для синтеза  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащих амидов и пептидов, а также соответствующих 4-имидазолонов, являющихся производными хромофора ЗФБ. Предложен метод синтеза аналогов хромофора ЗФБ, основанный на дегидратационной способности 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазана при взаимодействии с  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащими амидами и пептидами, а также ненасыщенными 5(4H)-оксазолонами. Выявлены антихолинэстеразные и антирадикальные свойства как N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащих амидов и пептидов, так и соответствующих 4-имидазолонов.

Найдены особенности лиганд – фермент комплексообразования синтезированных соединений с холинэстеразами.

**Практическая ценность.** Разработаны методы синтеза производных хромофора ЗФБ. Предложен метод синтеза  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащих пептидов с осуществлением двух стадий в одной колбе. Разработан метод этерификации аминокислот с использованием дихлордиметилсилана. Установлены антирадикальные и антихолинэстеразные свойства синтезированных соединений. Найдены закономерности лиганд – фермент взаимодействия для  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащих амидов и пептидов, а также соответствующих 4-имидазолонов как с ацетилхолинэстеразой, так и с бутирилхолинэстеразой.

**Публикации.** Основное содержание диссертационной работы изложено в 7-и статьях и 7-и тезисах докладов конференций.

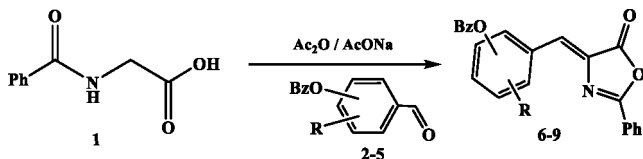
**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на Годичной научной конференции РАУ-2019 г.; VI Научной конференции армянского химического общества (с международным участием) “Вызовы 21 века” – 2019 г.; XXVII Онлайн симпозиуме “Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств” 2021 г.; конференций “Ломоносов” 2020 и 2022 гг.; 15-ой Годичной научной конференции РАУ 2021 г.; Российско-Армянской конференции “Химия в Армении” 2022 г.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 138 страницах компьютерного набора. Состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, 20 таблиц, 20 рисунков и списка цитируемой литературы (205 библиографических ссылок).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Синтез O-защищенных 5-(гидроксibenзильден)-2-фенил-5(4H)-оксазолонов

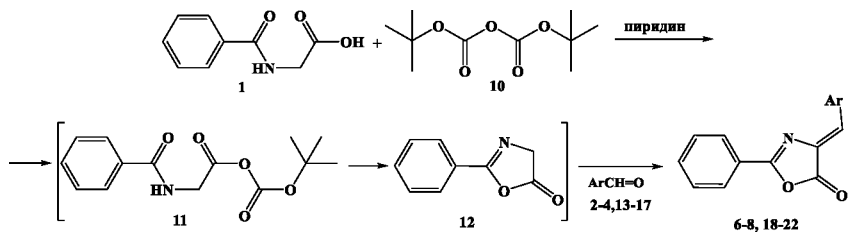
Одним из подходов к синтезу 4-имидазолонов является метод, основанный на применении ненасыщенных 5(4H)-оксазолонов. Этот метод выбран нами для синтеза целевых продуктов. В качестве исходных ненасыщенных оксазолонов нами использовались 4-(бензилоксибензильден)-2-фенил-5-оксазолони (6-9), которые были синтезированы двумя методами: А) классическим методом – с применением в качестве дегидратирующего реагента смеси уксусного ангидрида с ацетатом натрия и Б) для активации карбоксильной группы гипшуровой кислоты (1) использована смесь третбутилпирокарбонат / пиридин.



2,6 OBz-4, R = H; 3,7 OBz-4, R = 3-MeO; 4,8 OBz-4, R = 3-EtO; 5,9 OBz-2, R = 5-Br.

Синтез 4-(n-бензилокси-3-замещенных бензильден)-2-фенил-5(4H)-оксазолонов (6-9) по методу А) осуществляли с участием N-бензоилглицина (1) и замещенных бензальдегидов 2-5 в среде уксусного ангидрида в присутствии ацетата натрия. Реакционную смесь кипятили 20-40 мин. При этом выходы оксазолонов 6-9 колеблются в пределах 58-72%. Исследовали метод синтеза 4-арильден-2-фенил-5(4H)-оксазолонов с применением системы Voc<sub>2</sub>O / Py. Ожидалось, что с гипшуровой кислотой (1) система

Вос<sub>2</sub>O (**10**) / Py приведет к образованию смешанного ангидрида **11**, который может трансформироваться в 2-фенил-5(4*H*)-оксазолон **12**, а последний легко может конденсироваться с ароматическим альдегидом с образованием ненасыщенного оксазолона. Для разработки оптимальных условий синтеза варьировались соотношения реагентов, температура, время и способ проведения опыта. В результате установлено, что приемлемые выходы оксазолонов **6-8** и **18-22** (38-79%) получены при соотношении гипсуровой кислоты **1**, Вос<sub>2</sub>O и пиридина 1:1.2:2.



Ar = 4-НОС<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**13**); 4-НО-3-МеОС<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**14**); 4-*t*-С<sub>4</sub>H<sub>9</sub>ОСОС<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**18**); 4-(*t*-С<sub>4</sub>H<sub>9</sub>ОСОО)-3-МеОС<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**19**); 4-BrС<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**15,20**); 3-О<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**16,21**); 4-МеОС<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**17,22**); 4-С<sub>6</sub>H<sub>5</sub>СООС<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**2,6**); 4-(С<sub>6</sub>H<sub>5</sub>СОО)-3-ОМе (**3,7**); 4-(С<sub>6</sub>H<sub>5</sub>СОО)-3-ОEt (**4,8**)

В случае 4-(4-бензилоксибензилиден)-5-(4*H*)-оксазолонов **6-8** выходы составляют 45-49%.

## 2. Применение бензоильной O-защитной группы при синтезе α,β-дегидротирозинсодержащих амидов и имидазолонов

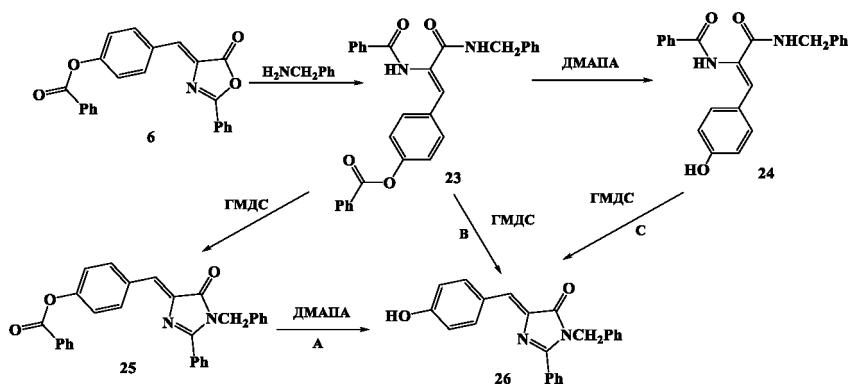
Исследована возможность применения O-бензоильной защитной группы для синтеза как бензиламида N,O-дibenзоил-α,β-дегидротирозина (**23**), так и соответствующего имидазол-4-она (**25**).

Синтез бензиламида (**23**) осуществлен взаимодействием ненасыщенного 5(*H*)-оксазолон **6** с бензиламином при комнатной температуре в ДМФА. Установлено, что при соотношении оксазолон **6** и бензиламина 1:1 в течение 24 ч выход бензиламида **23** составляет 39%, тогда как увеличение количества бензиламина до 3-х эквивалентов в течение 3 ч приводит к образованию амида **23** с выходом 81%.

В последнем случае увеличение реакционного времени до 24 ч приводит к 99% образованию амида **23**. В этих условиях O-бензоильная группа амида **23** сохраняется.

Удаление O-бензоильной защитной группы из бензиламида **23** осуществлено с помощью 3-(диметиламино)-1-пропиламина (ДМАПА) или 2-(диметиламино)-1-этиламина (ДМАЭА) при комнатной температуре в ацетонитриле в течение 24 ч. На примере синтеза бензиламида **24** установлено, что применение ДМАЭА для удаления O-бензоильной защиты из амида **23** в течение 8 ч приводит к целевому продукту **24** с выходом 76%, а увеличение длительности реакции до 24 ч – с выходом 94%. В случае применения ДМАПА в течение 24 ч продукт **24** получается с выходом 92%. При кипячении реакционной смеси в течение 2.5 ч выход амида α,β-дегидротирозина **24** составляет 78%.

Синтез 5-(4-(бензилоксибензилиден)-2-фенил-4-имидазолон (**25**) осуществлен кипячением смеси амида **23** с 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазаном (ГМДС) в ДМФА в течение 0.5 ч. При этом получена смесь имидазолонов **25** и **26**.



В результате обработки реакционной смеси удалось выделить имидазолон **25** с выходом 45%. Однако, в случае увеличения времени реакции до 1.5 ч процесс приводит к образованию имидазол-4-она **26** с выходом 70%. Очевидно, что при взаимодействии ГМДС и амида **23** протекают две параллельные реакции – циклизация (путь А) и удаление О-бензоильной защитной группы (путь В). Синтез имидазол-4-она **26** осуществлен также из соединения **25** с помощью ДМАПА с выходом 75% (путь А) или циклизацией бензиламида  $\alpha,\beta$ -дегидротирозина **24** с помощью ГМДС (путь С). В последнем случае выход целевого продукта **26** составляет 83%.

Исследованы антирадикальные и антихолинэстеразные свойства соединений **23-26** (табл. 1). Из них сравнительно высокую антирадикальную активность проявляет бензиламид N-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидротирозина (**24**). Последний также обладает более высоким ингибирующим свойством по отношению к ацетилхолинэстеразе (АХЭ). В случае бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) сравнительно высокую ингибирующую активность проявляет имидазол-4-он (**25**).

Таблица 1

Данные антирадикальных и антихолинэстеразных свойств соединений **23-26**

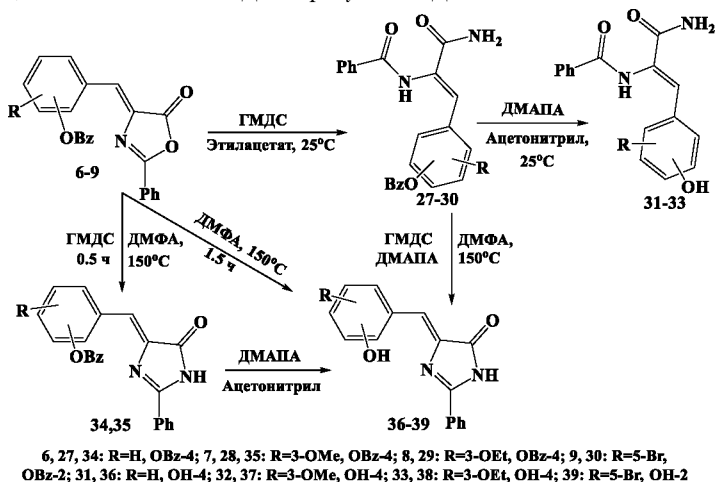
No соединения	Ингибирование, %		
	ДФПГ·	АХЭ	БуХЭ
<b>23</b>	43.1	63.6	28.7
<b>24</b>	85.1	76.6	40.5
<b>25</b>	6.86	43.0	54.5
<b>26</b>	16.2	37.0	16.1

В целом данные, приведенные в табл.1, показывают, что переход от О-бензоильных производных (**23** и **25**) к незащищенным аналогам **24** и **26** приводит к увеличению антирадикальной активности. Такое положение сохраняется для антихолинэстеразных свойств бензиламидов **23** и **25**. В случае же имидазолонов **25** и **26** при изучении антихолинэстеразной активности наблюдается обратная картина.

### 3. Синтез 2,5-дизамещенных имидазол-4-онов – производных хромофора зеленого флуоресцентного белка

Синтез 2,5-дизамещенных имидазол-4-онов – производных хромофора ЗФБ – осуществляли взаимодействием ненасыщенных 5(4*H*)-оксазолонов **6–9** с ГМДС при различных условиях.

Проведение реакции в этилацетате при комнатной температуре приводит к первичным амидам *N*,*O*-добензоил- $\alpha,\beta$ -дегидротирозинов **27–30**, выходы которых колеблются в пределах 52–89%. В случае же кипячения в ДМФА (0.5 ч) образуются 2,4-дизамещенные 4-имидазолы **34, 35** с выходами 75.9% и 61% соответственно. Увеличение продолжительности нагревания реакционной смеси до 1.5 ч, наряду с дегидратацией приводит к удалению *O*-бензоильной защитной группы с образованием производных 5-гидроксиарилиден-4-имидазолонов **36–39**. Такой же результат получен при реакции оксазолона **6** и ГМДС в присутствии ДМАПА.



В последнем случае 4-имидазолон **36** получен с выходом 84% при кипячении реакционной смеси в течение 1 ч.

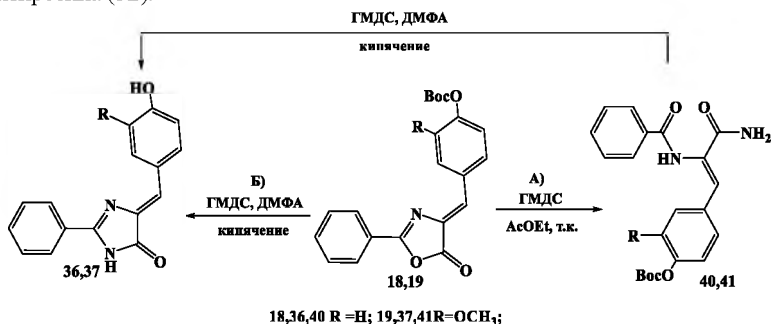
Из производных  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинов **27–30** и 4-имидазолонов **34** и **35** *O*-бензоильную группу удаляли реакцией с ДМАПА в среде ацетонитрила. При этом с хорошими выходами получены амиды **31–33** и 4-имидазолы **36** и **37**.

Оксазолон **18** и **19** также применяли для синтеза аналогов хромофора ЗФБ **36** и **37**. Взаимодействие оксазолонов **18** и **19** с ГМДС в соотношении 1:3 осуществляли двумя способами: А) при комнатной температуре в этилацетате и Б) при кипячении реакционной смеси в ДМФА.

В случае метода А) получены первичные амиды *N*-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидро-*O*-трет-бутилкарбонилтирозина (**40,41**) с выходами 62-69%. При методе Б) получены 4-имидазолы **36, 37** с выходами 38-49%. Аналогичная реакция с участием амида **40** тоже приводит к 4-имидазолону **36** с выходом 88%.

Исследованы антирадикальные свойства соединений **27–39** (табл.2). Согласно полученным данным по ингибированию ДФПГ<sup>•</sup>, производные  $\alpha,\beta$ -дегидротирозина **31–33** и 5-гидроксибензилиден-4-имидазолона **36–39** превосходят их *O*-бензоильные аналоги (**27–30** и **34, 35**). Из данных табл.2 видно, что в ряду соединений **27–39** высокой

антирадикальной активностью (99%) обладает амид N-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидро-3-метокситирозина (**32**).



Исследованы также антихолинэстеразные свойства синтезированных соединений **27–40** в отношении как АХЭ, так и БуХЭ. Все исследованные соединения обладают антихолинэстеразной активностью (табл.2).

Таблица 2

Антирадикальная и антихолинэстеразная активность соединений **27–40**

Соединение	Ингибирование, %		
	ДФПГ•	АХЭ	БуХЭ
<b>27</b>	7	67.2	46
<b>28</b>	7.5	75.2	81
<b>29</b>	9.7	28	74.4
<b>30</b>	31.9	51.35	87.5
<b>31</b>	67.1	31.9	67.1
<b>32</b>	99.1	44.8	33.3
<b>33</b>	79.8	69.6	52.4
<b>34</b>	23.5	94.8	96
<b>35</b>	35.8	48.4	11.3
<b>36*</b>	<b>78.5</b>	<b>90</b>	<b>100</b>
<b>37</b>	77.7	91.4	94.8
<b>38</b>	72.2	79.6	69.4
<b>39</b>	55.2	88.2	71.2
<b>40</b>	-	62.4	85.9

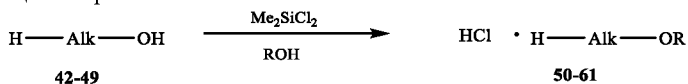
В случае АХЭ она колеблется в пределах 28–94%, а БуХЭ – 11–96%. При этом по ингибирующим свойствам из амидов  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот **27–33** сравнительно высокую антихолинэстеразную активность проявляет амид N-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидро-3-метокси-O-бензоилтирозина (**28**, АХЭ–75%; БуХЭ–81%), тогда как из 4-имидазолонов **34–39** сравнительно высокую антихолинэстеразную активность проявляет 2-фенил-5-(4-гидроксibenzилиден)-4-имидазолон (**36**, АХЭ–90%; БуХЭ –100%). Надо отметить, что 4-имидазолон **36** также проявляет довольно высокую антирадикальную активность (78%). При уменьшении концентрации соединения **36** в 2 раза антихолинэстеразная активность составляет: АХЭ –21.6%, БуХЭ –59.2%. Из данных табл. 2 видно, что при переходе от амидов  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот **27–33** к 4-имидазолонам **34–39** антихолинэстеразная активность в отношении обоих ферментов возрастает.



#### 4. Простой и высокоэффективный метод синтеза алкиловых эфиров аминокислот

В синтезе алкиловых эфиров аминокислот применялись такие производные кремния, как тетрахлорсилан и триметилхлорсилан. Последний был применен также в синтезе эфиров N-замещенных аминокислот и пептидов.

Нами исследована возможность применения дихлордиметилсилана (ДХДМС) для синтеза гидрохлоридов алкиловых эфиров как природных аминокислот, так и их N-замещенных аналогов и *n*-аминобензойной кислоты. Синтез целевых соединений осуществлен при комнатной температуре взаимодействием ДХДМС и аминокислоты в соответствующем спирте.

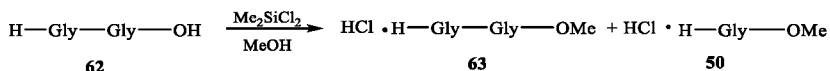


**Alk = Gly 42,50,51, 52; DL-Ala 43,53,54; DL-Val 44,55; L-Ser 45,56; DL-Phe 46,57; L-Tyr 47,58; L-Trp 48,59, β-Ala 49,60,61; R=Me 50,53,55-60; Et 51,54; Pr 52,61.**

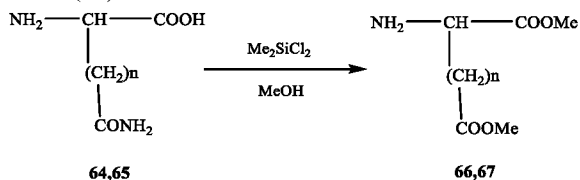
При этом соотношение ДХДМС к аминокислоте варьировалось в пределах 2:1 эквивалента. Гидрохлорид метилового эфира глицина (**50**) получается с высоким выходом при соотношении ДХДМС – аминокислота 2:1 и 1.5:1 при проведении синтеза в течение 24 ч. Однако, в случае соотношения реагентов 1:1 в течение 24 ч выход целевого продукта **50** составляет 68%. Соединение **50** с высоким выходом (99%) получается также при соотношении ДХДМС / глицин 1.5:1 в течение 3 ч.

Установлено, что на выход целевого продукта влияет также порядок добавления реагентов. В связи с этим алкиловые (метиловые, этиловые и пропиловые) эфиры ряда аминокислот получены при соотношении аминокислота – ДХДМС 1:1.5 или 1:2 при комнатной температуре в течение 3-24 ч с выходами 71-99 %.

В случае этерификации глицилглицина (**62**) в присутствии ДХДМС при комнатной температуре в течение 24 ч выделена смесь гидрохлоридов метилового эфира глицилглицина (**63**) и глицина (**50**) в соотношении 4:1, соответственно.



Очевидно, что при этом происходит частичная трансформация пептидной связи в эфирную. Похожий результат зафиксирован в случае этерификации этим методом аспарагина (**64**) и глутамина (**65**), получены диметиловые эфиры аспарагиновой (**66**) и глутаминовой кислот (**67**).

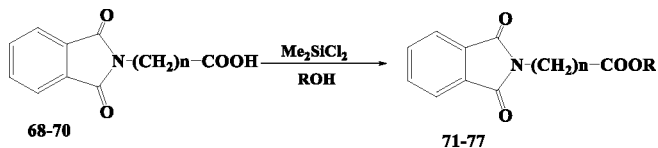


**n = 1 (64, 66); n = 2 (65, 67).**

С целью выяснения стабильности фталоильной N-защитной группы в условиях предлагаемого метода синтеза эфиров аминокислот исследован синтез алкиловых эфиров ряда фталоиламинокислот (**71-77**).

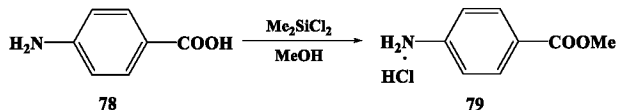
При этом установлено, что в присутствии 1.5 эквивалента ДХДМС при комнатной температуре в течение 24 ч выход метилового эфира фталоилоилглицина (**71**) составляет

95%. Хорошие результаты (80-95%) получены также в случае фталоил-β-аланина (**69**) и фталоил-ГАМК (**70**). При синтезе метилового эфира **69** установлено, что фтальная группа сохраняется даже в случае кипячения реакционной смеси в течение 3 ч.



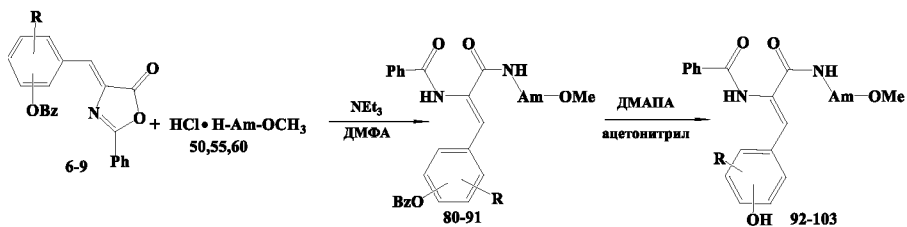
$n=1$  (**68,71,72**);  $n=2$  (**69,73-75**);  $n=3$  (**70,76,77**).  $R=Me$  (**71,73,76**);  $Et$  (**72,74**);  $n-Pr$  (**75,77**)

Этерификацию *n*-аминобензойной кислоты (**78**) проводили при соотношении аминокислота – ДХДМС 1:2 и кипячении реакционной среды, что привело к получению метилового эфира *n*-аминобензойной кислоты (**79**) с выходом 75.8%.



## 5. Синтез α,β-дегидротирозинсодержащих дипептидов

Некоторые из полученных метиловых эфиров аминокислот (**50,55,57** и **60**) применяли для синтеза ненасыщенных дипептидов, содержащих остаток α,β-дегидротирозина. Синтез целевых пептидов осуществлен азлактонным методом. При этом применялись *O*-бензоилзамещенные ненасыщенные 4-(гидроксиарилиден)-5(4*H*)-оксазолоны **6-9**, реакция которых с метиловыми эфирами аминокислот приводит к образованию *O*-бензоилзащищенных дипептидов, содержащих остаток α,β-дегидротирозина **80-91**, с выходом 50-100%.



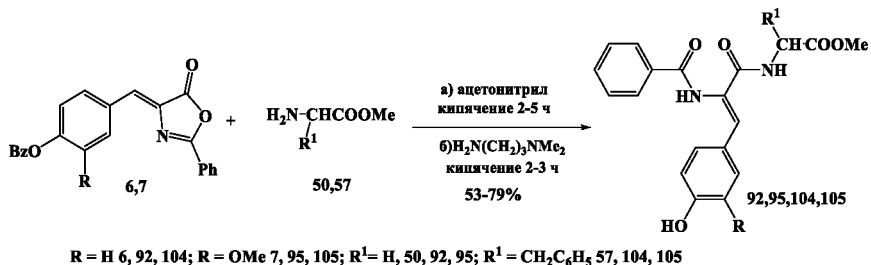
**6,80-82**  $R=H$ ,  $OBz-4$ ; **7,83-85**  $R=3-OMe$ ,  $OBz-4$ ; **8,86-88**  $R=3-OEt$ ,  $OBz-4$ ; **9,89-91**  $R=5-Br$ ,  $OBz-2$ ; **92-94**  $R=H$ ;  $OH-4$ ; **95-97**  $R=3-MeO$ ,  $OH-4$ ; **98-100**  $R=3-EtO$ ,  $OH-4$ ; **101-103**  $R=5-Br$ ,  $OH-2$ .  $Am = Gly = 50,80,83,86,89,92,95,98,101$ ;  $\beta-Ala = 60,81,84,87,90,93,96,99,102$ ;  $DL-Val = 55,82,85,88,91,94,97,100,103$ .

Из последних *O*-бензоильную группу удаляли двумя эквивалентами ДМАПА в ацетонитриле при комнатной температуре в течение 24 ч. Таким способом выход полученных ненасыщенных пептидов **92-103** составил 51-83%.

Глицин- и фенилаланинсодержащие дипептиды **92, 95, 104, 105** получены также одnoreакторным (one-pot) синтезом, проведением синтеза в две стадии – а) конденсация метиловых эфиров аминокислот **50** или **57** с соответствующими оксазолонами

6 или 7 и б) удаление О-бензоильной группы из полученных N,O-дibenzoил-дипептидов ДМАПА в одной колбе.

Синтез О-бензоилзащищенного пептида проводили в кипящем ацетонитриле (2-5 ч), после чего добавляли 2 эквивалента ДМАПА и нагревание продолжали 2-3 ч. Общее время синтеза в «одной колбе» составляет 5-8 ч. При этом выходы пептидов **92,95,104** и **105**, полученных этим способом, колеблются в пределах 53-79%. Для сравнения отметим, что первым способом N-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидротирозилпептиды **92** и **95** получены с выходами 47% и 40% соответственно, из расчета на оксазолон.



Исследованы антирадикальные и антихолинэстеразные свойства соединений **80-105** (табл.3).

Таблица 3

Данные антирадикальных и антихолинэстеразных свойств дипептидов **80-105**

№ Соедин.	Ингибирование, %			№ Соедин.	Ингибирование, %		
	ДФПГ·	АХЭ	БуХЭ		ДФПГ·	АХЭ	БуХЭ
<b>80</b>	5.2	61.5	75.9	<b>93</b>	61.1	63.6	28.3
<b>81</b>	4.9	47	55.8	<b>94</b>	77.4	84.7	62.1
<b>82</b>	5	68.5	64.5	<b>95</b>	83.0	79.4	14.5
<b>83</b>	7.3	71.6	77.5	<b>96</b>	84.2	67.2	35.6
<b>84</b>	3.2	42.6	43.0	<b>97</b>	88.2	67.4	57.4
<b>85</b>	7.5	67.6	77.4	<b>98</b>	82.3	80.4	43.2
<b>86</b>	5.9	83.0	67.0	<b>99</b>	83.5	69.0	19.7
<b>87</b>	5.3	8.3	42.0	<b>100</b>	82.9	71.4	80.0
<b>88</b>	8.3	64.0	31.0	<b>101</b>	49.0	78.8	59.3
<b>89</b>	3.4	43.0	75.9	<b>102</b>	51.5	78.9	41.0
<b>90</b>	7.7	72.2	38.3	<b>103</b>	74.0	71.1	85.9
<b>91</b>	14.4	81.4	42.5	<b>104</b>	46.6	3.3	52.1
<b>92</b>	67.7	73.1	9.5	<b>105</b>	88.1	0	33

На основании полученных результатов можно заключить, что дипептиды с О-защитой **80-91** по антирадикальным свойствам (ингибирование ДФПГ· 3-14%) уступают  $\alpha,\beta$ -дегидротирозилпептидам **92-105** (ингибирование ДФПГ· 49-88%). Из синтезированных соединений **92-105** сравнительно высокую антирадикальную активность проявляет метиловый эфир N-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидро-3-метокситирозил-DL-валина **97** (88.2%).

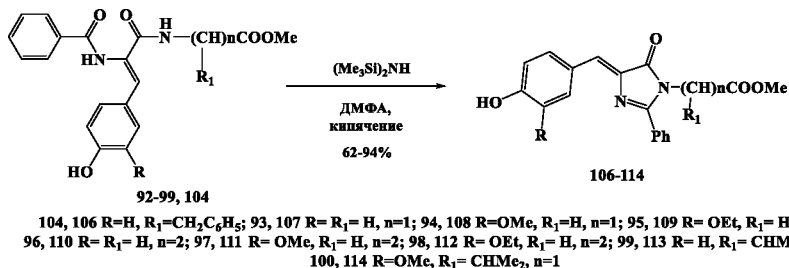
Определяли антихолинэстеразные свойства  $\alpha,\beta$ -дегидропептидов **80-105** как по отношению к ацетилхолинэстеразе (АХЭ), так и бутирилхолинэстеразе (БуХЭ). Из *O*-бензоилпептидов (**80-91**) высокую антихолинэстеразную активность по отношению к обоим ферментам проявляют глицинсодержащие пептиды (**86** – ингибирование АХЭ 83%, **83** – ингибирование БуХЭ 77%).

В ряду  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащих дипептидов **91-105** по антихолинэстеразным свойствам выделяются валинсодержащие дипептиды (**94** – ингибирование АХЭ 84%, **103** – ингибирование БуХЭ 85%). При этом в случае *O*-бензоильных пептидов **80-91** высокая активность выявлена у производных, содержащих в тирозиновом остатке алкоксильные (MeO или EtO) заместители. В случае же отсутствия *O*-защитной группы (соединения **92-105**) сравнительно активными соединениями являются производное тирозина (соединение **94** при АХЭ), либо 2-гидрокси-5-бромпроизводное тирозина (соединение **103** при БуХЭ).

## 6. Синтез 2,3,5-тризамещенных (4*H*)-имидазол-4-онов аналогов зеленого флуоресцентного белка

Для синтеза целевых имидазолонов в качестве исходных веществ применяли метиловые эфиры *N*-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидротирозилдипептидов.

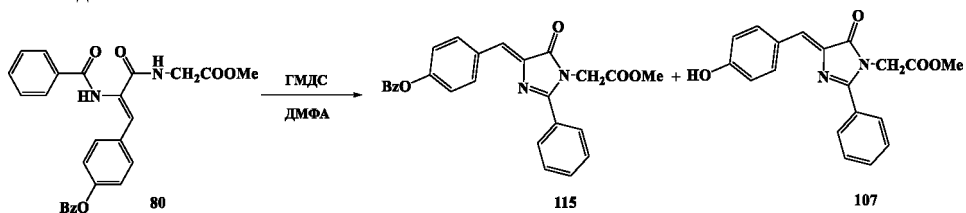
Дегидратация дипептидов **92-99, 104** в ДМФА ГМДС-ом, при кипячении 15-25 мин привела к образованию целевых 2,3,5-тризамещенных 4-имидазолонов **106-114** с выходами 62-94%.



Изучение реакции метилового эфира *N,O*-дibenzoил- $\alpha,\beta$ -дегидротирозилглицина **80** с ГМДС (соотношение реагентов 1:4) в ДМФА при 150°C показало, что в течение 15 мин образуется смесь, состоящая из двух соединений с  $R_f$  0.57 и 0.83. Отметим, что исходный пептид **80** на ТСХ проявляется при  $R_f$  0.50. На основании <sup>1</sup>H ЯМР спектра установлено, что смесь состоит из метилового эфира (*Z*)-2-(4-(4-бензоилоксибензилиден)-5-оксо-2-фенил-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил) уксусной кислоты (**115**  $R_f$  0.83) и метилового эфира (*Z*)-2-(4-(4-гидроксибензилиден)-5-оксо-2-фенил-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил) уксусной кислоты (**107**  $R_f$  0.57) в соотношении 0.3:1.

В <sup>1</sup>H ЯМР спектрах неочищенного продукта реакции пептида **80** и ГМДС после кипячения в течение 15 мин наблюдаются сигналы при 7.22 и 7.09 м.д., которые относятся к винильной водородной связи *O*-бензоил-4-имидазолон **115** и 4-гидроксибензилиден-4-имидазола **107**. Соотношение интегралов этих сигналов составляет 1:0.25. В <sup>1</sup>H ЯМР спектре неочищенного продукта в пределах 4.46-4.60 м.д. также наблюдаются два сигнала при 4.53 м.д., соответствующие имидазолону **115** и при 4.49 м.д., соответствующие имидазолону **107**. Увеличение времени проведения реакции

дипептида **80** и ГМДС до 1.5 ч привело к образованию имидазолана **107** с 88.6% выходом.



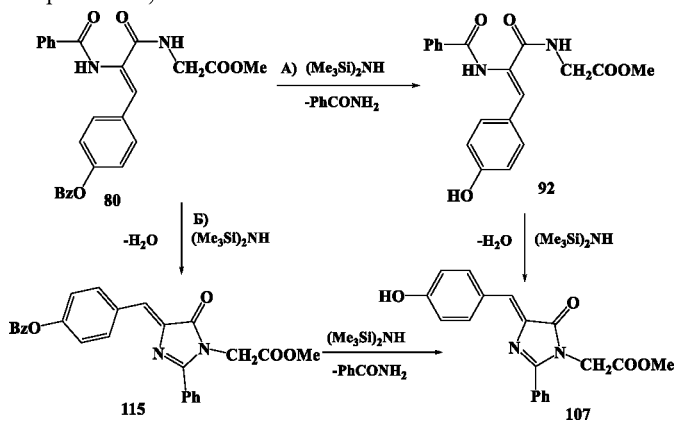
В этом случае соотношение пиков составляет 1:0.3, что подтверждает сделанное предположение. Кроме этого, в  $^1\text{H}$  ЯМР спектре неочищенного продукта **115** наблюдается сигнал при 9.87 м.д., который соответствует протону гидроксильной группы имидазолана **107**.

После перекристаллизации этанолом, выделили очищенный имидазолон **115** с выходом 31.3 %.

Образование имидазолана **107** из пептида **80** под воздействием ГМДС может протекать по двум направлениям: А) через незащищенный пептид **92** и Б) через имидазолон **115**. В связи с этим УФ спектрофотометрическим методом изучали реакции пептидов **80** и **92** с ГМДС в соотношении 1:3 в ДМФА при 150°C.

Отметим, что О-бензоилпептид **80** в УФ спектре имеет максимум поглощения при 282 нм, в то время как пептид **92** поглощает при 309 нм, а имидазолон **107** – при 392 нм. Также имидазолон **115** имеет максимумы поглощения при 368 и 373 нм. Химический сдвиг протона гидроксильной группы (НО-Ph-C=) 9.83 м.д.

Для выяснения пути образования имидазолана **107** из пептида **80** УФ спектроскопическим методом изучена реакция пептида **80** и ГМДС (в соотношении 1:3) в ДМФА при нагревании при 150°C. Пробы, взятые через каждые 30 мин из реакционной смеси пептида **80** с ГМДС в ДМФА, с последующим разбавлением этанолом, показывают, что уже через 30 мин пептид **80** превращается в пептид **92** (поглощение при 309 нм).

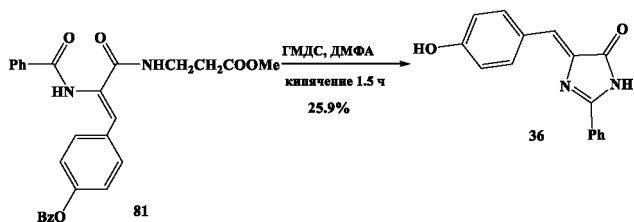


Одновременно наблюдается поглощение и увеличение интенсивности при 385 нм, что можно отнести к имидазолону **107**. Дальнейшее изучение процесса показывает, что

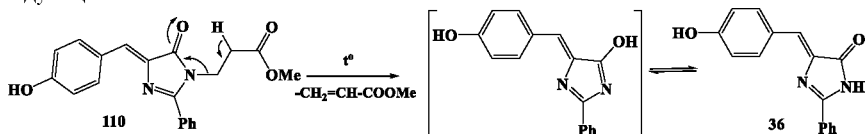
в течение 30-40 мин наблюдается накопление пептида **92**, после чего наблюдается его расход. Параллельно превращению пептида **80** в пептид **92** происходит образование имидазолон **107**. Полученный результат свидетельствует о том, что образование имидазолон **107** из *О*-бензоилзащищенного пептида **80**, в основном, протекает по пути А.

Надо отметить, что в течение всего эксперимента не наблюдается какого-либо поглощения при 368 нм, характерного для имидазолон **115**. Таким образом, можно предположить, что реакция циклизации пептида **80** в имидазолон **107** является тандемной и протекает через образование пептида **92**.

В случае метилового эфира *N,O*-добензоил- $\alpha,\beta$ -дегидротирозил- $\beta$ -аланина (**81**) реакция дегидратации с участием ГМДС в течение как 30 мин, так и 1.5 ч приводит к образованию смеси веществ. В последнем случае удалось из реакционной смеси выделить 2-фенил-5-(4-гидроксibenзилиден)-4-имидазолон (**36**) с выходом 25.9%.



Образование последнего можно объяснить термическим разложением метилового эфира 2-фенил-5-(4-гидроксibenзилиден)-4-имидазолонпропионовой кислоты **110** по следующей схеме:



Термогравиметрическое исследование соединения **110**, проведенное синхронно с масс-спектроскопией, показало наличие фрагмента  $\text{CH}_2=\text{CHCO}$  ( $M/z$  55). Это дает основание предполагать, что под воздействием высоких температур (в растворе ДМФА при 150°C и в твердом состоянии при 316°C) происходит отрыв молекулы метилового эфира акриловой кислоты.

Исследованы антирадикальные и антихолинэстеразные свойства синтезированных соединений (табл.4). В целом данные, приведенные в табл. 4, показывают, что имидазолон **106-114** обладают от слабой до средней (2-54%) антирадикальной активностью. Из них сравнительно высокую антирадикальную активность проявляет метиловый эфир (*Z*)-3-(4-(4-гидрокси-3-метоксибензилиден)-5-оксо-2-фенил-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил)пропионовой кислоты **111**. Надо отметить, что введение в положение 3 бензиленового фрагмента имидазолон метокси- (соединения **108,111,114**) или этокси группы (соединения **109,112**) приводит к возрастанию ингибиторных свойств по отношению к стабильному радикалу ДФП<sup>•</sup>.

Антихолинэстеразные свойства имидазолонов **106-114** исследовались в отношении как ацетил- (АХЭ), так и бутирилхолинэстеразы (БуХЭ). Данные, приведенные в табл.4, показывают, что имидазолон **106-114** ингибируют как АХЭ, так и БуХЭ. Из них сравнительно высокую антиацетилхолинэстеразную активность проявляет имидазол-4-он **109**. В случае БуХЭ сравнительно высокая активность наблюдается у

имидазол-4-она **110**. Надо отметить, что имидазолон **111** обладает сравнительно хорошими ингибирующими свойствами как по отношению ДФПГ\*, так и БУХЭ. Сопоставлением данных антихолинэстеразной активности имидазолонов **107** и **115** гидроксисбензилиденового фрагмента имидазолона **107** имеет ощутимое влияние только на антиацетилхолинэстеразные свойства.

Таблица 4

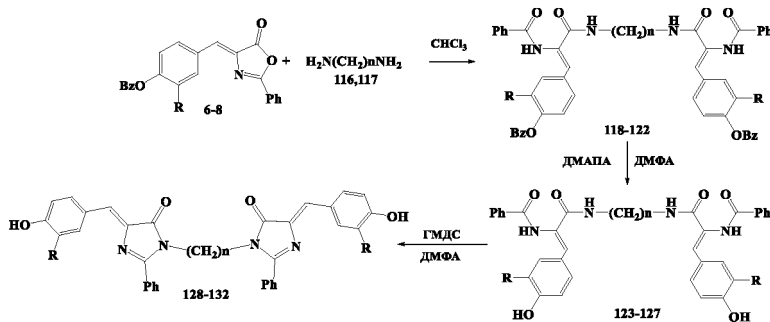
Данные антирадикальных и антихолинэстеразных свойств имидазолонов **106-115**

Ингибирование, %							
№	ДФПГ*	АХЭ	БУХЭ	№	ДФПГ*	АХЭ	БУХЭ
<b>106</b>	5.0	11.3	42.6	<b>111</b>	54.5	22.4	72.7
<b>107</b>	2.9	11.0	35.5	<b>112</b>	36.7	19.0	44.8
<b>108</b>	43.1	46.9	35.6	<b>113</b>	10.8	53.5	68.7
<b>109</b>	41.4	63.6	12.2	<b>114</b>	41.2	41.4	76.4
<b>110</b>	12.7	62.2	79.1	<b>115</b>	2.6	38.0	28.4

### 7. Синтез соединений, содержащих в молекуле два остатка 4-имидазолона – бис-аналогов хромофора зеленого флуоресцентного белка

Осуществлен синтез соединений, содержащих в молекуле два остатка 5-(4-гидроксисбензилиден)-4-имидазолона **128-132**. Синтез проводили взаимодействием оксазолонов **6-8** с тетраметилен- (**116**) или гексаметилендиаминами (**117**) в хлороформе при комнатной температуре. Из полученных бисамидов **118-122** О-защитную группу удаляли методом с применением ДМАПА в диметилформамиде при комнатной температуре. При этом бис-амиды **123-127** получены с выходами 84-95%.

Циклизация последних была осуществлена с помощью ГМДС. В этом случае был применен шестикратный избыток ГМДС. Кипячение смеси бис-амида и ГМДС в ДМФА в течение 1.5-3 ч дает удовлетворительные выходы целевых бис-имидазолонов **128-132**.



6 R=H; 7 R=OMe; 8 R=OEt; 116 n=4; 117 n=6;  
**118, 123, 128** R=H, n=4; **119, 124, 129** R=OMe, n=4; **120, 125, 130** R=H, n=6;  
**121, 126, 131** R=OMe, n=6; **122, 127, 132** R=OEt, n=6.

Изучены антирадикальные и антихолинэстеразные свойства как бис-амидов **118-127**, так и бис-имидазолонов **128-132** (табл. 5).

При рассмотрении антирадикальных свойств бис-амидов О-добензоильных производных **118-122** (16-36%) становится очевидным, что они по активности

уступают бис-амидам, содержащим фрагменты  $\alpha,\beta$ -дегидротирозина **123-127** (61-82%), что можно объяснить наличием фенольной гидроксильной группы. В случае бис-имидазолонов **128-132** антирадикальная активность существенно не изменяется по сравнению с активностью соответствующих бис-амидов **123-127**. Однако в этом ряду имеется соединение – бис-имидазолон **131**, который по активности превосходит контрольные вещества – галловую кислоту и не уступает витамину С.

Таблица 5

Данные антирадикальных свойств бис-амидов **118-130**,  
витамина С и галловой кислоты.

Ингибирование, %			
№	ДФПГ	№	ДФПГ
<b>118</b>	27.5	<b>127</b>	63.7
<b>119</b>	36.7	<b>128</b>	10.9
<b>120</b>	17.1	<b>129</b>	55.0
<b>121</b>	16.8	<b>130</b>	21.5; 5.0*
<b>122</b>	22.2	<b>131</b>	83.9; 85.2**
<b>123</b>	62.6	<b>132</b>	51.1
<b>124</b>	82.2	<b>Витамин С</b>	85.7
<b>125</b>	70.3	<b>Галловая кислота</b>	76.7
<b>126</b>	61.4	-	-

\*Соотношение ДФПГ и испытуемого вещества 1:2

\*\*Соотношение ДФПГ и испытуемого вещества 1:0.5

Данные антихолинэстеразных свойств бис-имидазолонов **128-132** показывают, что бис-имидазолы **128-132** являются слабыми ингибиторами как по отношению к ацетилхолинэстеразе, так и к бутирилхолинэстеразе и значительно уступают соответствующим 2,5-дизамещенным-4-имидазолонам.

## 8. Определение $IC_{50\%}$ некоторых синтезированных соединений

Исследованы также значения  $IC_{50\%}$  некоторых соединений, проявляющих сравнительно высокий процент ингибирования. Полученные данные  $IC_{50\%}$  приведены в таблице 6.

Таблица 6

Данные  $IC_{50\%}$  некоторых синтезированных соединений

Соединение	$IC_{50\%}$ АХЭ, $\mu\text{mol}$	$IC_{50\%}$ БуХЭ, $\mu\text{mol}$	Специфичность А/Б
<b>30</b>	12.8	21.3	0.60
<b>34</b>	34.5	13.3	2.59
<b>36</b>	3.4	6.99	0.49
<b>37</b>	3.9	38.5	0.10
<b>39</b>	13	17	0.76
<b>81</b>	15.6	38.5	0.41
<b>98</b>	18.5	18.9	0.98
<b>103</b>	9.6	23.3	0.41
<b>110</b>	9.5	12.3	0.77



Установлено, что соединение **36** является самым активным блокатором как для АХЭ ( $IC_{50} = 3.4 \mu\text{mol}$ ), так и для БУХЭ ( $IC_{50} = 6.99 \mu\text{mol}$ ). Одновременно имидазолон **36** проявляет высокую антирадикальную активность (78%). В связи с этим соединение **36** предлагается для дальнейших углубленных биологических исследований.

## 9. Молекулярный докинг

Для выяснения способов взаимодействия синтезированных соединений с холинэстеразами, осуществлен молекулярный докинг как с АХЭ, так и с БУХЭ. Установлено, что из синтезированных 53 соединений 50 образуют комплексы с АХЭ за счет гидрофобных и водородных связей. При этом в процесс комплексообразования вовлечены аминокислотные остатки различных участков активного центра АХЭ. Основная часть лигандов (90%) взаимодействует с Trp286, аминокислотным остатком периферического анионного сайта (ПАС) активного центра (АЦ). Кроме ПАС лиганды образуют комплексы с АХЭ с вовлечением Trp86 – основным аминокислотным остатком анионного участка (АУ) АЦ АХЭ (Trp86 – 54%). С другим аминокислотным остатком АУ – Tyr337 связываются 76% лигандов. Сравнительно мало соединений проявляют взаимодействие с His447, входящим в состав каталитической триады (His447 – 18%). Также самое наблюдается с оксиамониевым участком (ОУ) (Gly121 – 24%) и ацильным участком (АУ) (Phe295 – 12% и Phe297 – 26%) активного центра АХЭ. Полученные стерические параметры взаимодействия с АХЭ свидетельствуют, что синтезированные амиды, пептиды  $\alpha, \beta$ -дегидроаминокислот и их соответствующие 4-имидазолон, в основном, связываются с периферийной зоной АЦ фермента.

В случае БУХЭ из 53 синтезированных соединений при комплексообразовании, в основном, 96% взаимодействуют с Trp-82 формирующий АУ АЦ. Последнее обосновывается также тем, что ощутимый процент лигандов (54%) при комплексообразовании с БУХЭ связываются с His438, одним из основных аминокислотных остатков каталитической триады фермента. Такая разница в поведение лигандов с БУХЭ по сравнению с АХЭ можно объяснить сравнительно большим объемом и параметрами входа АЦ.

Одновременно 60% лигандов взаимодействуют с ПАС БУХЭ с вовлечением аминокислотных остатков Asp74 – 17% и Tyr332 -40%. Исходя из этих данных можно заключить, что в случае БУХЭ лиганды располагаются перпендикулярно оси горлышка фермента, одновременно блокируя и вход, и активный центр.

Таким образом, можно заключить, что в случае комплексообразования с АХЭ синтезированные соединения, в основном, располагаются у входа АЦ, тогда как при комплексообразовании с БУХЭ, лиганды, находясь во внутри АЦ, ближе к анионному участку, одновременно взаимодействуют с ПАС активного центра фермента.

Для сравнения, были выбраны несколько известных лекарственных препаратов (донепезил, ревастигмин, такрин и галантамин), использующиеся на сегодняшний день в профилактике и лечении БА. Полученные результаты показывают, что все исследованные лекарства взаимодействуют с АЦ АХЭ с вовлечением Trp-286. В случае с БУХЭ ключевым аминокислотным остатком является Trp-82.

Были рассчитаны биофизические параметры комплексообразования ( $\Delta G$  - энергия связывания и  $K_s$  - константа связывания) молекулярных моделей синтезированных соединений и моделей некоторых антихолинэстеразных лекарств с АХЭ и БУХЭ. Полученные данные показывают, что многие синтезированные нами лиганды как по  $\Delta G$ , так и по  $K_s$  превосходят вышеуказанные лекарства.

## 10. Фармакокинетические свойства и токсичность исследуемых соединений

*In silico* способом получены значения доноров и акцепторов водородных связей, топологический индекс полярной поверхности, липофильность. Полученные данные свидетельствуют, что показатель всасываемости через желудочно-кишечный тракт имеет высокое значение для всех исследуемых соединений, что касается перехода через гематоэнцефалический барьер, соединения в основном показывают низкие значения, кроме соединений **24,25,26,34,35,36,37,38,39**. По оценке мутагенности соединения **24** и **30** показали положительный результат, а прогноз канцерогенности у всех соединений отрицателен. По оценке раздражительности на кожу и глаза, у всех исследуемых соединений наблюдается отрицательный результат. Большая часть соединений показали умеренную гепатотоксичность. Расчитанные показатели острой оральной токсичности в пределах 0.54-0.75 кг/моль. Все исследуемые соединения имеют высокое значение коэффициента биоразложения.

### ВЫВОДЫ

1. Разработан новый способ синтеза ненасыщенных 5(4*H*)-оксазолонов с применением системы  $\text{Wos}_2\text{O}$  / пиридин.
2. Установлена перспективность *O*-бензоильной защитной группы для синтеза  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащих амидов и пептидов, а также соответствующих 4-имидазолонов.
3. Установлено, что 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазан является хорошим дегидратирующим агентом при синтезе 4-имидазолонов из  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащих амидов и пептидов.
4. Разработан метод синтеза алкиловых эфиров аминокислот и их *N*-замещенных производных.
5. Предложен метод синтеза  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащих пептидов из ненасыщенных 5(4*H*)-оксазолонов проведением двух стадий в одной колбе.
6. Выявлено, что как амиды и пептиды  $\alpha,\beta$ -дегидротирозина, так и соответствующие 4-имидазолны проявляют антихолинэстеразные и антирадикальные свойства. На основании полученных данных  $\text{IC}_{50}$  и антирадикальных свойств 5(4-гидроксибензилден)-2-фенил-4(*H*)-имидазол-4-он предложен для дальнейших биологических исследований.
7. На основании докинг-исследований выявлен способ взаимодействия синтезированных соединений и холинэстераз. При этом установлено, что в случае комплексообразования с ацетилхолинэстеразой, синтезированные лиганды, в основном, располагаются у входа активного центра, в то время как в случае бутирилхолинэстеразы лиганды находятся внутри активного центра.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ ОТРАЖЕНО В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ

1. Оганесян А.А., **Макичян А.Т.**, Топузьян В.О., Оганесян Н.А. Простой и высокоэффективный синтез алкиловых эфиров аминокислот. // Хим. Ж. Арм., **2020**, т.73, N4, с.381-390.
2. Оганесян А.А., **Макичян А.Т.**, Алексанян Е.Р., Топузьян В.О. Синтез 4-арилден-2-арил-5(4*H*)-оксазолонов с применением системы  $\text{Wos}_2\text{O}$ /пиридин. // Хим. Ж. Армении, **2022**, т.75, N2, с.203-212.

3. Топузьян В.О., Оганнесян А.А., **Макичян А.Т.**, Унанян Л.С., Галстян Л.Х. Применение бензоильной O-защитной группы при синтезе  $\alpha,\beta$ -дегидротирозинсодержащих амидов и имидазолонов. // ЖОрХ, **2022**, т.58, N2, с.200-209.
4. Топузьян В.О., Оганнесян А.А., **Макичян А.Т.**, Унанян Л.С. Синтез и антихолинэстеразная активность некоторых 2,5-дизамещенных имидазол-4-онов – производных хромофора зеленого флуоресцентного белка. // ЖОрХ, **2022**, том 58, N7, с.706–717.
5. **Макичян А.Т.** Синтез и некоторые биологические свойства соединений, содержащих в молекуле два остатка 5-(4-гидроксибензилден)-4-имидазолна. // Хим. Ж. Арм., **2022**, т.75, N 3-4, с.304-314.
6. Топузьян В.О., Оганнесян А.А., **Макичян А.Т.**, Унанян Л.С. Синтез и некоторые фармакологические свойства дипептидов, включающих N-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидротирозин. // ЖОХ, **2022**, т.92, N5, с.755-768.
7. Топузьян В.О., Тосунян С.Р., **Макичян А.Т.**, Акопян Э.А., Галстян Л.Х., Оганнесян А.А. Синтез, антихолинэстеразная и антирадикальная активность 2,3,5-тризамещенных 4(H)-имидазол-4-онов, аналогов хромофора зеленого флуоресцентного белка // ЖОХ, **2023**, т.93(4), с.495-50.

## ՍԱԿԻՉՅԱՆ ԱՆԻ ՏԻԳՐԱՆԻ

### ԿԱՆԱՉ ՖԼՈՒՈՐԵՍԵՆՏԵՆՏՈՂ ՍԴԻՏԱԿՈՒՑԻ ՔՐՈՄՓՈՐԻ ԱԾԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ ՍԻՆԹԵԶԸ, *IN VITRO* ԵՎ *IN SILICO* ՀԱԿԱՆՈՒԽՆԵՍԹԵՐԱԶԱՅԻՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

*Ամփոփագիր*

Աշխատանքը նվիրված է կանաչ ֆլուորեսցենտող սպիտակուցի (ԿՖՍ) քրոմոֆորի ածանցյալների՝ 5-(4-հիդրօքսիբենզիլդեն)-2-ֆենիլ-4H-իմիդազոլ-4-ոնների, սինթեզի եղանակների մշակմանը և *in vitro* ու *in silico* հակախոլինէսթերազային հատկությունների ուսումնասիրմանը:

Մշակվել է չհագեցած 5(4H)-օքսազոլոնների սինթեզի եղանակ, օգտագործելով  $\text{Boc}_2\text{O}$ /պիրիդին համակարգը: Յուրյ է տրվել O-բենզոլի պաշտպանիչ խմբի կիրառելիությունը N-տեղակալված  $\alpha,\beta$ -դեհիդրոթիրոզին պարունակող ամիդների և պեպտիդների, ինչպես նաև համապատասխան 4(H)-իմիդազոլ-4-ոնների ածանցյալների սինթեզի համար: Մշակվել են O-բենզոլի պաշտպանիչ խմբի հեռացման մեղմ պայմաններ՝ կիրառելով 3-դիմեթիլամինոպրոպիլամինը:

Պարզվել է, որ N,O-դիբենզոլի- $\alpha,\beta$ -դեհիդրոթիրոզինի բենզիլամիդի փոխազդեցությունը 1,1,1,3,3,3-հեքսամեթիլդիսիլազանի հետ դիմեթիլֆորմամիդում եռացնելիս հանգեցնում է 5-(4-բենզոլիօքսիբենզիլդեն)-2-ֆենիլ-4-իմիդազոլոնի և 5-(4-հիդրօքսիբենզիլդեն)-2-ֆենիլ-4-իմիդազոլոնի խառնուրդի գոյացմանը: Ընդ որում ռեակցիոն խառնուրդը 0,5 ժամ եռացնելիս բենզոլիպաշտպանված ածանցյալը ստացվում է 45% ելքով, միջլեռ 1,5 ժամ եռացումը հանգեցնում է 70% 4-հիդրօքսիածանցյալի գոյացմանը:

Ուսումնասիրվել է չհագեցած 4-(4-բենզիլօքսիբենզիլիդեն)-5-օքսազոլոնների ռեակցիան 1,1,1,3,3,3-հեքսամերիլդիսիլազանի (ՀՄԴՍ) հետ: Արդյունքում պարզվել է, որ կախված ռեակցիայի իրականացման պայմաններից գոյանում են N-տեղակալված  $\alpha,\beta$ -դեհիդրո-0-բենզոլիթիրոզինի առաջնային ամիդներ (էթիլացետատ, սենյակային ջերմաստիճան, 24 ժամ) կամ 2,5-երկտեղակալված (4H)-իմիդազոլ-4-ոններ (ԴՄՖԱ, եռացում 1-1,5 ժամ):

Մշակվել է ամինաթթուների և դրանց N-տեղակալված ածանցյալների էսթերացման եղանակ՝ հիմնված դիքլորդիմեթիլսիլանի օգտագործման վրա: Որոշ ամինաթթուների մեթիլ էսթերները (Gly,  $\beta$ -Ala, DL-Val) օգտագործվել են օքսազոլոնային եղանակով N-տեղակալված  $\alpha,\beta$ -դեհիդրո-0-բենզոլիթիրոզին պարունակող դիպեպտիդների սինթեզում: Մշակվել է ազատ հիդրօքսիլ խմբով այդ պեպտիդների միառեակտոր սինթեզի եղանակ, որում երկու փուլերը՝ կոնդենսումը և պաշտպանիչ խմբի հեռացումը իրականացվում է նույն կոլբայում:

Առաջարկվել է 1,2,5-եռտեղակալված (4H)-իմիդազոլ-4-ոնների ստացման եղանակ N-տեղակալված  $\alpha,\beta$ -դեհիդրոթիրոզինի դիպեպտիդների ՀՄԴՍ-ով իրականացվող դեհիդրատացումով: Մեթոդի կիրառման ընթացքում պեպտիդի C-ծայրում  $\beta$ -ալանինի մնացորդ պարունակող միացության դեհիդրատացման ժամանակ նկատվել է իմիդազոլի էկզոցիկլիկ N1-C կապի խզում: Առաջարկվել է այդ թերմոլիտիկ ռեակցիայի մեխանիզմը:

Հետազոտվել են սինթեզված N-տեղակալված  $\alpha,\beta$ -դեհիդրոթիրոզինի ամիդների ու պեպտիդների, ինչպես նաև դրանցից ստացված ԿՖՍ ածանցյալների՝ 1,2-երկ- և 1,2,3-եռտեղակալված (4H)-իմիդազոլ-4-ոնների հակախոլինէսթերազային և հակառադիկալային հատկությունները: Արդյունքում պարզվել է, որ դրանց մեծամասնությունը հանդիսանում են ինչպես ացետիլխոլինէսթերազի (ԱԽԷ), այդպես էլ բուֆորիլխոլինէսթերազի (ԲուԽԷ) արգելակիչներ: Սինթեզված միացություններից  $\alpha,\beta$ -դեհիդրոթիրոզինի և 5-(4-հիդրօքսիբենզիլիդեն)-4(H)-իմիդազոլ-4-ոնները ցուցաբերում են նաև հակառադիկալային ակտիվություն: Իրականացվել է նաև դոկինգ-ուսումնասիրություն, որի արդյունքում պարզվել է, որ փորձարկվող միացությունները ԱԽԷ-ի դեպքում փոխազդվում են էնզիմի ակտիվ կենտրոնի մուտքի մոտ գտնվող կատիոնային հատվածի (ԿՀ-ի Trp286 և Trp341 ամինաթթվային մնացորդների) հետ: Մինչդեռ ԲուԽԷ-ի դեպքում դրանք կոմպլեքս են առաջացնում ինչպես այդ, այդպես էլ ակտիվ կենտրոնի գրպանիկի ներսում գտնվող ԿՀ-ի (Trp82 և Tyr332 ամինաթթվային մնացորդների) հետ: Նշենք նաև, որ կիրառություն գտած այնպիսի դեղամիջոցներ ինչպիսիք են՝ դոնեպեզիլը, րևաստիզմինը, տակրինը և գալանտամինը, դոկինգ-հետազոտություններում ցուցաբերել են նույնատիպ վարք:

*In silico* հետազոտությունները վկայում են, որ սինթեզված որոշ միացություններ էնզիմների հետ կոմպլեքսագոյացման էներգիայի ( $\Delta G$ ) և գոյացման հաստատունի (Kc) տվյալներով գերազանցում են վերոհիշյալ դեղամիջոցների նույն տվյալները:

Մի քանի միացությունների համար որոշվել են լիզանդ - էնզիմ փախազդեցության IC<sub>50</sub> արժեքները: Պարզվել է, որ 5-(4-հիդրօքսիբենզիլիդեն)-2-ֆենիլ-4(*H*)-իմիդազոլ-4-ոնը (**36**) ամենաակտիվ արգելակիչն է ինչպես Ախէ-ի (IC<sub>50</sub>=3.4 նմո), այնպես էլ Բուխէ-ի (IC<sub>50</sub>=6.9 նմո) հանդեպ: Նույն միացությունը ցուցաբերում է նաև բարձր հակառադիկալային ակտիվություն (78%): Այդ իսկ պատճառով միացություն **36**-ը առաջարկվել է հետագա խորը կենսաբանական հետազոտության անցկացման համար:

## MAKICHYAN ANI TIGRAN

### SYNTHESIS, *IN VITRO* AND *IN SILICO* STUDY OF THE ANTICHOLINESTERASE PROPERTIES OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN CHROMOPHORE DERIVATIVES

#### SUMMARY

The work is devoted to the development of synthesis methods of green fluorescent protein (GFP) chromophore derivatives, 5-(4-hydroxybenzylidene)-2-phenyl-4*H*-imidazol-4-ones, and to the study of *in vitro* and *in silico* anticholinesterase properties.

A method for the synthesis of unsaturated 5(4*H*)-oxazolones using the Boc<sub>2</sub>O/pyridine system was developed. It has been established that relatively good results (43-79%) of unsaturated 5(4*H*)-oxazolones are obtained with a ratio of hippuric acid - pyrocarbonate - pyridine 1: 1.2: 2.

The applicability of the O-benzoyl protecting group for the synthesis of N-substituted  $\alpha,\beta$ -dehydrotyrosine-containing amides and peptides, as well as the corresponding 4(*H*)-imidazol-4-one derivatives, was demonstrated 3-dimethylaminopropylamine by applying mild conditions for removal of the O-benzoyl protecting group was developed.

The interaction of N,O-dibenzoyl- $\alpha,\beta$ -dehydrotyrosine benzylamide with 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS) on boiling in dimethylformamide was found to lead to 5-(4-benzoyloxybenzylidene)-2-phenyl-4-imidazolone and 5-(4-hydroxybenzylidene)-2-phenyl-4-imidazolone mixture. Moreover, when the reaction mixture is boiled for 0.5 hours, the benzoyl-protected derivative is obtained with a yield of 45%. Meanwhile, boiling the reaction mixture for 1.5 hours leads to the formation of 70% 4-dihydroxy derivative.

The interaction of unsaturated 4-(4-benzoyloxybenzylidene)-5-oxazolones with HMDS was studied. As a result, it was found that depending on the reaction conditions, primary amides of N-substituted  $\alpha,\beta$ -dehydro-O-benzoyltyrosine (ethyl acetate, room temperature, 24 hours) or 2,5-disubstituted 4(*H*)-imidazol-4-ones (dimethylformamide, boiling 1-1.5 hours). A method of esterification of amino acids and their N-substituted derivatives based on the use of dichlorodimethylsilane was investigated. As a result, it was found that the synthesis of alkyl esters of amino acids with high yields (71-99%) is realized in the case of 1:1.5 ratio of amino acid and dimethyldichlorosilane, in the appropriate alcohol environment for 24 hours at room temperature or under boiling conditions for 3 hours.

It has been found that in the case of asparagine and glutamine, the diesters of aspartic acid and glutamic acid are obtained, respectively, during the synthesis in the above-mentioned way.

Dimethyldichlorosilane has been shown to be a good reagent for the synthesis of alkyl esters of N-substituted amino acids as well. The developed method was also used for obtaining *p*-aminobenzoic acid methyl ester.

The methyl esters of several amino acids (Gly,  $\beta$ -Ala, DL-Val) have been used in the synthesis of dipeptides containing N-substituted  $\alpha,\beta$ -dehydrotyrosine residues. Methyl esters of N-substituted tyrosyl peptides were obtained in two ways. In the first way, the methyl esters of N,O-dibenzoyltyrosyl dipeptides were obtained by the oxazolone method. The O-benzoyl protecting group was removed from the latter.

In the second approach, the acylation of the amino acid methyl ester with oxazolone and the removal of the O-protecting group were carried out in the same flask. In other words, one-pot synthesis has been achieved. In the latter case N-benzoyltyrosyl peptides are obtained in good yields (53-79%).

We carried out the synthesis of 1,2,5-trisubstituted 4-imidazolones (GFP chromophore derivatives) by reacting methyl esters of peptides containing N-substituted  $\alpha,\beta$ -dehydrotyrosine residue in dimethylformamide medium with HMDS under boiling conditions. The yields of GFP chromophore derivatives obtained in this way range from 62-94%.

It was found that in the case of N,O-dibenzoyl dipeptides, the synthesis of trisubstituted 4-imidazolones in this way leads to the formation of a mixture. The mixture consists of 4-imidazolones containing O-benzoyl and free hydroxyl groups in a ratio of 1:0.25. UV research revealed that the production of 4-imidazolone with a free hydroxyl group from O-benzoyl protected dipeptide is mainly realized after removal of the peptide protecting group by HMDS.

During the application of the method, it was observed that the dehydration of the compound containing the  $\beta$ -alanine residue at the C-terminus of the peptide, is underway by the cleavage of the exocyclic N1-C bond of the imidazolone. A mechanism for this thermolytic reaction has been proposed.

The anticholinesterase and antiradical properties of the synthesized N-substituted  $\alpha,\beta$ -dehydrotyrosine amides and peptides, as well as their GFP derivatives, 1,2-di- and 1,2,3-trisubstituted (4*H*)-imidazol-4-ones, were investigated.

As a result, it has been found that most of them are both acetylcholinesterase (ACE) and butyrylcholinesterase (BuCE) inhibitors. Among the synthesized compounds,  $\alpha,\beta$ -dehydrotyrosine and 5-(4-hydroxybenzylidene)-4(*H*)-imidazol-4-ones also exhibit antiradical activity. A docking study was also carried out, as a result of which it was found that the tested compounds interact with the cationic region near the entrance of the active center (amino acid residues Trp286 –interaction of 90% synthesized compounds and Trp341- interaction of 88% synthesized compounds) of the enzyme in the case of ACE. Meanwhile, in the case of BuCE, they form a complex both with that and with the cationic region inside the pocket of the active center (Trp 82 interaction of 96% synthesized compounds and Tyr 332 interaction of 60% synthesized compounds). It should also be noted that some commonly used drugs such as donepezil, revastigmine, tacrine and galantamine have shown similar behavior in docking studies.

*In silico* studies indicate that some of the synthesized compounds with enzymes exceed the same data of the above-mentioned drugs in terms of complexation energy ( $\Delta G$ ) and formation constant ( $K_c$ ).

$IC_{50}$  values for ligand–enzyme interactions were determined for several compounds. 5-(4-Hydroxybenzylidene)-2-phenyl-4(*H*)-imidazol-4-one (**36**) was found to be the most active inhibitor of both ACE ( $IC_{50}$ =3.4 nmol) and BuCE ( $IC_{50}$ =6.9 nmol). The same compound also shows high antiradical activity (78%). Therefore, compound **36** was proposed for further in-depth biological investigation.