

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ХИМИЧЕСКИЙ
Кафедра высокомолекулярных соединений

ЯКОВЕЦ Полина Сергеевна

**СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
НЕКОТОРЫХ NBD-ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОВ,
СОДЕРЖАЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ ЗАМЕСТИТЕЛИ**

Магистерская диссертация
специальность 1-31 80 06 «Химия»

Научный руководитель
Фалетров Ярослав Вячеславович
к.х.н., доцент

Допущена к защите
«____» _____ 2023 г.
Зав. кафедрой _____
Костюк Сергей Викторович
д.х.н., профессор

Минск, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	7
АГУЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	10
GENERAL CHARACTERIZATION OF THE WORK	13
ВВЕДЕНИЕ.....	Ошибка! Закладка не определена.
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	Ошибка! Закладка не определена.
1.1 7-Хлор-4-нитробензоксадиазол	Ошибка! Закладка не определена.
1.2 Фотофизические и фотохимические свойства NBD-производных....	Ошибка! Закладка не определена.
1.3 Примеры использования NBD-производных в биохимических исследованиях	Ошибка! Закладка не определена.
1.3.1 Зонды на основе NBD для распознавания белков	Ошибка! Закладка не определена.
1.3.2 Зонды на основе NBD для распознавания малых молекул.....	Ошибка! Закладка не определена.
1.4 NBD-пиперазин	Ошибка! Закладка не определена.
1.5 Вещества с электрофильными группами для модификации белков по цистеину	Ошибка! Закладка не определена.
1.6 Флуоресцирующие производные β -лактамных антибиотиков	Ошибка! Закладка не определена.
1.7 Модификация флуорофорами противогрибковых фармакофоров для получения новых флуоресцентных проб и лекарственных соединений.	Ошибка! Закладка не определена.
1.8 NBD-производные, содержащие гидрофобные фрагменты	Ошибка! Закладка не определена.
1.9 Краткие выводы.....	Ошибка! Закладка не определена.
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	Ошибка! Закладка не определена.
2.1 Реактивы и растворители	Ошибка! Закладка не определена.
2.2 Оборудование	Ошибка! Закладка не определена.
2.3 Методики синтеза соединений	Ошибка! Закладка не определена.
2.3.1 Синтез NBD-ампициллина (3)	Ошибка! Закладка не определена.
2.3.2 Синтез NBD-аминопенициллановой кислоты (5)	Ошибка! Закладка не определена.

- 2.3.3 Синтез 1-(4-((2-((1H-имидазол-1-ил)метил)-2-(2,4-дихлорфенил)-1,3-диоксолан-4-ил)метокси)фенил)пиперазина (6)**Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.4 Синтез 4-(4-(4-((2-((1H-имидазол-1-ил)метил)-2-(2,4-дихлорфенил)-1,3-диоксолан-4-ил)метокси)фенил)пиперазин -1-ил)-7-нитробензофуразана (7) **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.5 Синтез 4-нитро-7-(4-(2,3,4-триметоксибензил)пиперазин-1-ил)бензофуразана (9)..... **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.6 Синтез N1-(7-нитробензофуразан-4-ил)этан-1,2-диамина (10)... **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.7 Синтез N-{2-[(7-нитро-2,1,3-бензофуразан-4-ил)амино]этил}гексанамида (11)..... **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.8 Синтез 4-(пиперазин-1-ил)-7-нитробензофуразана (12) **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.9 Синтез 2-бром-1-(пиперазин-1-ил)этанона (13)**Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.10 Синтез 2-бром-1-(4-(нитробензофуразан-4-ил)пиперазин-1-ил)этанона (14) **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.11 Синтез 1-(2-бромэтил)пиперазина (16)**Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.12 Синтез 4-(4-(2-бромэтил)пиперазин-1-ил)-7-нитробензофуразана (17) **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.13 Синтез 1-(пиперазин-1-ил)гексан-1-она (18)**Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.3.14 Синтез 1-(4-(7-нитробензофуразан-4-ил)пиперазин-1-ил)гексан-1-он (19) **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.4 Исследование сольватохромного эффекта**Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.5 Оптическое титрование с бычьим сывороточным альбумином **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.6 Методики микробиологического исследования влияния полученных соединений на рост дрожжей *Y. Lipolytica* и *S. Cerevisiae*, бактерий *B. Subtilis* и *E. Coli*..... **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.7 Методика микробиологического исследование биопревращения NBD-Pz-Нex в дрожжах *Yarrowia lipolytica* **Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.8 Методика микробиологического исследования *in situ* распределения NBD-Pz-Нex в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae***Ошибка! Закладка не определена.**
- 2.9 Молекулярный докинг **Ошибка! Закладка не определена.**

2.10 Расчет проницаемости молекул через мембрану **Ошибка! Закладка не определена.**

2.11 Краткие выводы..... **Ошибка! Закладка не определена.**

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ **Ошибка! Закладка не определена.**

3.1 Синтез NBD-ампициллина и NBD-аминопенициллановой кислоты **Ошибка! Закладка не определена.**

3.2 Деацетилирование кетоконазола **Ошибка! Закладка не определена.**

3.3 Синтез NBD-производного продукта деацетилирования кетоконазола **Ошибка! Закладка не определена.**

3.4 Синтез 4-нитро-7-(4-(2,3,4-триметоксибензил)пиперазин-1-ил)бензофуразана (NBD-TMZ) **Ошибка! Закладка не определена.**

3.5 Синтез N-{2-[(7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)амино]этил}гексанамида (NBD-EDA-Нex) **Ошибка! Закладка не определена.**

3.6 Синтез NBD-производного пиперазина **Ошибка! Закладка не определена.**

3.7 Синтез 2-бром-1-(4-(7-нитробензофуразан-4-ил)пиперазин-1-ил)этанона **Ошибка! Закладка не определена.**

3.8 Синтез 4-(4-(2-бромэтил)пиперазин-1-ил)-7-нитробензофуразана **Ошибка! Закладка не определена.**

3.9 Синтез 1-(4-(7-нитробензофуразан-4-ил)пиперазин-1-ил)гексан-1-она (NBD-PZ-Нex)..... **Ошибка! Закладка не определена.**

3.10 Исследование сольватохромного эффекта N-(2-бромэтил)-7-нитробензофуразан-4-амин (7), NBD-производных изомеров пиколиламинов (19, 21) и NBD-пиперазина (12)..... **Ошибка! Закладка не определена.**

3.11 Взаимодействие некоторых соединений с бычьим сывороточным альбумином..... **Ошибка! Закладка не определена.**

3.12 Микробиологическое исследование влияния соединений 2-бром-N-(4-бромфенил)ацетамида, 2-бром-N-(4-фторфенил)ацетамида и N-(4-бромфенил)-7-нитробензофуразан-4-амин на рост дрожжей **Ошибка! Закладка не определена.**

3.13 Микробиологическое исследование биопревращения NBD-Pz-Нex в дрожжах *Yarrowia lipolytica* **Ошибка! Закладка не определена.**

3.14 Микробиологическое исследование *in situ* распределения NBD-Pz-Нex в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* **Ошибка! Закладка не определена.**

3.15 Компьютерные расчеты: молекулярный докинг, проницаемость молекул через мембрану **Ошибка! Закладка не определена.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ **Ошибка! Закладка не определена.**
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... **Ошибка! Закладка не определена.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Общие:

Ac – ацетил;

ACN – ацетонитрил;

Bu – бутил;

CBS – цистатионин-β-синтаза;

CSE – цистатионин-γ-лиаза;

CYP – цитохром P450;

DMF – N,N-диметилформамид;

DMSO – диметилсульфоксид;

EDG – electron donating group (электронодонорная группа);

EISA – enzyme-instructed self-assembly (самосборка, запускаемая ферментами);

Et – этил;

EWG – electron withdrawing group (электроноакцепторная группа);

FDA – Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов);

FRET – fluorescence resonance energy transfer (флуоресцентный резонансный перенос энергии, Фёрстеровский перенос энергии);

GDI – ингибитор диссоциации гуанозиндифосфата;

HDAC – гистоновая деацетилаза;

HSA – human serum albumin (человеческий сывороточный альбумин);

iPrOH – изопропанол;

Kac – ацетилирование лизина в белке;

KAT – лизин-ацетилтрансфераза;

m-CPBA – м-хлорнадбензойная кислота;

MDR – multidrug resistant (множественная лекарственная устойчивость)

Me – метил;

MeOH – метанол;

NAD – nicotinamide adenine dinucleotide (никотинамидадениндинуклеотид);

NBD – 7-нитробензофуразан;

NBD-Cl – 4-хлор-7-нитробензофуразан;

NBD-PZ – 4-(пиперазин-1-ил)-7-нитробензофуразан;

NIR – near infrared (ближняя инфракрасная область);

PDB – Protein Data Bank;

PhH – бензол;

PPI – protein-protein interactions (белок-белковые взаимодействия);

PTM – post-translational modification (посттрансляционные модификации);

PZ – пиперазин;
REP – белок сопровождения Rab;
TEA – триэтиламин;
THF – тетрагидрофуран;
TNF – tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли);
TOG – ген сверхэкспрессии опухоли;
TRP – трифенилфосфин;
АМФ – аденозинмонофосфат;
БСА – бычий сывороточный альбумин;
ГТФ – гуанозинтрифосфат;
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер;
Pr – пропил;
ФМО – флавин-содержащая монооксигеназа
ФПЭ – фотоиндуцированный перенос электронов;

Синтезированные в работе вещества:

Ююю

Ююю

ююю

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Магистерская работа: 134 страницы, 123 рисунка, 21 таблица, 110 литературных источника (в том числе 2 авторские публикации).

Ключевые слова: NBD-амины, флуоресценция, пиперазин, электрофильные фрагменты, лизосомотропные зонды, β -лактамы антибиотики, противогрибковые азолы, триметазидин, гидрофобные NBD-производные, дрожжи, бактерии, альбумин, сольватохромизм, микроскопия, *in silico* анализ проницаемости мембран, докинг.

Объект исследования: NBD-производные аминов, содержащие различные функциональные заместители.

Предмет исследования: синтез и исследование биологических и физико-химических свойств полученных соединений.

Цель работы: осуществить дизайн и синтез структур на основе 7-нитробензофуразана и различных аминов, дополнительно содержащих различные функциональные фрагменты, а также провести первичную оценку их биологических свойств с использованием методов *in silico* и клеток дрожжей и бактерий для разработки новых биоактивных веществ.

Задачи:

1. Синтезировать NBD-производных аминов, содержащих дополнительно группу $-\text{CH}_2\text{-Br}$, лизосомотропное пиперазиновое звено, гидрофобные остатки жирных кислот и/или известные фармакофорные фрагменты;
2. Провести *in silico* молекулярный докинг соединений с множествами структур белков *Mycobacterium tuberculosis* и некоторых других видов бактерий, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, цитохромов P450, катепсинов, ФМО, а также структур пенициллин-связывающих белков и β -лактамаз;
3. *In silico* оценить проницаемость полученных молекул через фосфолипидные мембраны;
4. Провести микробиологическое исследование влияния полученных соединений на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Yarrowia lipolytica*, а также влияние NBD-производных пенициллинов на рост грамположительных бактерий *Bacillus Subtilis* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*;
5. Оценить сольватохромные эффекты, присутствия кислоты и основания на спектры поглощения и флуоресценции некоторых полученных веществ;
6. Провести флуориметрическое титрование соединений NBD-PZ-Нex и NBD-производных пенициллинов с белком сыворотки крови (БСА) для оценки их аффинности к данному белку.

Полученные результаты: в данной работе разработаны методики и осуществлен синтез некоторых 7-нитробензофуразан-4-ил производных первичных

и вторичных аминов, в том числе дополнительно содержащих функциональные группы бромометиленовую ($-\text{CH}_2-\text{Br}$), амида гексановой кислоты, пенициллинов и кетоконазола: NBD-ампициллина, NBD-аминопенициллановой кислоты, 4-нитро-7-(4-(2,3,4-триметоксибензил)пиперазин-1-ил)бензофуразана (NBD-TMZ), NBD-пиперазина (NBD-PZ), 2-бром-1-(4-(7-нитробензофуразан-4-ил)пиперазин-1-ил)этанона (NBD-PZ-BAB), 4-(4-(2-бромэтил)пиперазин-1-ил)-7-нитробензофуразана (NBD-PZ-EtBr), 1-(4-(7-нитробензофуразан-4-ил)пиперазин-1-ил)гексан-1-она (NBD-PZ-Hex), N-{2-[(7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)амино]этил}гексанамида (NBD-EDA-Hex), N-деацетил-кетоконазола (deAcKTZ) и его NBD-производного NBDdeAcKTZ. Получены данные масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением, ^1H -ЯМР-спектроскопии, спектрофотометрии, спектрофлуориметрии и ТСХ, подтверждающие получение целевых продуктов. Было установлено взаимодействие некоторых из полученных соединений с бычьим сывороточным альбумином, выявлено влияние растворителя (сольватохромные эффекты) и изменения pH среды на спектры поглощения и флуоресценции, согласующиеся с данными литературы. В ходе работы проведено микробиологическое исследование влияния полученных соединений на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Yarrowia Lipolytica*, а также влияние NBD-производных пенициллинов на рост грамположительных бактерий *Bacillus Subtilis* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*. Соединения NBDdeAcKTZ и deAcKTZ ингибировали рост дрожжей. При проведении микробиологического исследования с дрожжами *Yarrowia lipolytica* соединение NBD-PZ-Hex претерпело превращение с образованием более гидрофобного продукта, установление которого требует дальнейшего анализа. По результатам исследования *in situ* внутриклеточного распределения NBD-PZ-Hex в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* данное соединение было способно проникать внутрь дрожжевых клеток. При исследовании ингибирования роста грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* наблюдалось частичное подавление их роста NBD-ампициллином.

Методом молекулярного докинга определялись параметры взаимодействия с некоторыми структурами белков *Mycobacterium tuberculosis* и других видов бактерий, всеми структурами белков дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, подборкой структур цитохромов P450, катепсинов, ФМО, а также структур пенициллин-связывающих белков и β -лактамаз. Энергии связывания с белками мишенями находились в диапазоне от -13,9 до -6,5 ккал/моль. Посредством компьютерных расчетов дополнительно была оценена проницаемость соединений через фосфолипидную мембрану. Все полученные соединения показали данные, указывающие на их способность проникать через мембраны, за исключением гидрофильных NBD-производных пенициллинов. Полученные *in silico* и *in vitro*

данные открывают перспективы для дальнейших исследований данных соединений как потенциальных молекулярных зондов и ингибиторов ферментов микроорганизмов либо человека, вовлеченных в различные патогенетические процессы.

АГУЛЬНАЯ ХАРАКТАРЫСТЫКА РАБОТЫ

Магістарская работа: 134 старонкі, 123 малюнкi, 21 табліца, 110 літаратурных крыніц (у тым ліку 2 аўтарскія публікацыі).

Ключавыя словы: NBD-аміны, флуоресценция, пиперазин, біартаганальныя электрафільныя фрагменты, лізасоматропныя агенты, β -лактамыны антыбіётыкі, супрацьгрыбковыя азолы, трыматазідін, гідрафобныя NBD-вытворная, дрожджы, бактэрыі, альбумін, сальвахрамiзм, мікраскапія, *in silico* аналіз пранікальнасці мембраны, докінг.

Аб'ект даследавання: NBD- вытворная амінаў з рознымі функцыянальнымі фрагментамі.

Прадмет даследавання: сінтэз і даследаванне біялагічных і фізіка-хімічных уласцівасцей атрыманых злучэнняў.

Мэта работы: здзейсніць дызайн і сінтэз структур на аснове 7-нітрабензафуразану і розных амінаў, якія дадаткова змяшчаюць розныя функцыянальныя фрагменты, а таксама правесці першапачатковую ацэнку іх біялагічных уласцівасцяў з выкарыстаннем метадаў *in silico* і клетак дрожджаў і бактэрыі для распрацоўкі новых біяактыўных рэчываў.

Заданні:

1. Сінтэзаваць шэраг NBD-вытворных амінаў, якія змяшчаюць фрагмент -CH₂-Br і / або лізасоматропныя пиперазінавае зв'язно і / або гідрафобныя рэшткі тлушчавай кіслаты і / або вядомыя фармакафорныя фрагменты;

2. Правесці малекулярны докінг злучэнняў з некаторымі структурамі бялкоў *Mycobacterium tuberculosis* і іншымі відамі бактэрыі, усімі структурамі бялкоў дрожджаў *Saccharomyces cerevisiae*, падборкай структур цытахромаў P450, катэпсінаў, флавінавых монааксігеназ, а таксама структур пеніцылін-звязваючых бялкоў і β -лактамаз, ацаніць разліковым метадам пранікальнасць малекул праз мембрану;

3. Правесці мікрабіялагічнае даследаванне ўплыву атрыманых злучэнняў на ўзрост дрожджаў *Saccharomyces cerevisiae* і *Yarrowia lipolytica*, а таксама ўплыву NBD-вытворных пеніцылінаў на ўзрост грамададатных бактэрыі *Bacillus Subtilis* і грамадмоўных бактэрыі *Escherichia coli*;

4. Правесці тэст *in vitro* на біяператварэнне NBD-PZ-Нex ў дрожджах *Yarrowia lipolytica*, а таксама даследаваць *in situ* яго размеркаванне ў дрожджах *Saccharomyces cerevisiae*;

5. Даследаваць сальватахромны эффект злучэнняў NBD-PZ-Нex, NBDdeAcKTZ, NBD-EDA-Нex, NBD-PZ і даследаваць іх рэакцыю на кіслую і шчолачную сераду;

6. Правесці аптычнае тытраванне злучэнняў NBD-PZ-Нex і NBD-вытворных пеніцылінаў з белкам сывараткі крыві (БСА).

Атрыманыя вынікі: у дадзенай працы распрацаваны метадыкі і здзейснен сінтэз некаторых вытворных 7-нітрабензафуразану, якія змяшчаюць розныя функцыянальныя фрагменты: NBD-ампіцыліну, NBD-амінапеніціланавай кіслаты, 4-нітра-7-(4-(2,3,4-трыметоксібензіл)піперазін-1-іл)бензафуразана (NBD-TMZ), NBD-піперазіну (NBD-PZ), 2-бром-1-(4-(7-нітрабензафуразан-4-іл)піперазін-1-іл) этанола (NBD-PZ-BAB), 4-(4-(2-бромэтил)піперазін-1-іл)-7-нітробензофуразана (NBD-PZ-EtBr), 1-(4-(7-нітрабензафуразан-4-іл) піперазін-1-іл)гексан-1-она (NBD-PZ-Нex), N-{2-[(7-нітра-2,1,3-бензоксадыазол-4-іл)аміна]этил}гексанаміда (NBD-EDA-Нex), N-дэацэтил-кетаканазолу (deAcKTZ) і яго NBD-вытворнага NBDdeAcKTZ. Атрыманне шэрага мэтавых прадуктаў пацверджана з дапамогай мас-спектраметрыі, ЯМР-спектраскапіі, спектрафотаметрыі, спектрафлуарыметрыі і ТСХ. У ходзе работы было даследавана ўзаемадзеянне некаторых злучэнняў з бычыным сыроватачным альбумінам і ацэнены іх сальватахромны эффект, а таксама ўплыў кіслотнага і шчолачнага асяроддзя на спектры паглынання і флуарэсцэнцыі абраных злучэнняў. Падчас працы праведзена мікрабіялагічнае даследаванне уплыву атрыманых злучэнняў на ўзрост дражджэй *Saccharomyces cerevisiae* і *Yarrowia Lipolytica*, а таксама ўплыў NBD-вытворных пеніцылінаў на ўзрост грамададных бактэрый *Bacillus Subtilis* і грамадмоўных бактэрый *Escherichia coli*. Злучэнні NBD-дэацэтылкетаканазол і дэацэтылкетаканазол інгібіравалі ўзрост дражджэй супастаўна з кантрольным растворам кетаканазола. У выпадку дражджэй *Saccharomyces cerevisiae* раствор дэацэтыляванага кетаканазолу ў значна большай ступені душыў узрост дражджэй у параўнанні з кантрольным растворам кетаканазолу. Пры даследаванні інгібіравання ўзросту грамадмоўных бактэрый *Escherichia coli* адбылося частковае інгібіраванне ўзросту ў лунцы з дададзеным NBD-вытворнам ампіцыліну. Пры правядзенні мікрабіялагічных даследаванняў з дрожджамі *Yarrowia lipolytica* злучэнне NBD-PZ-Нex зведала нейкае біяператварэнне з утварэннем больш гідрафобнага прадукту, які патрабуе далейшага аналізу. У выніку даследавання *in situ* ўнутрыклеткавага размеркавання NBD-PZ-Нex у дражджах *Saccharomyces cerevisiae* дадзенае злучэнне было здольна пранікаць унутр дражджавых клетак. Метадам малекулярнага докінга вызначаліся параметры ўзаемадзеяння з некаторымі структурамі бялкоў *Mycobacterium tuberculosis* і іншымі відамі бактэрый, усімі структурамі бялкоў дражджэй *Saccharomyces cerevisiae*, падборкай структур цытахромаў P450, катэпсінаў, флавінавых монааксігеназ, а таксама структур пеніцылін-звязваючых бялкоў і β -лактамаз.

Энергіі сувязі з бялкамі-мішэнямі знаходзіліся ў дыяпазоне ад -13,9 да -6,5 ккал/моль. З дапамогай кампутарных разлікаў дадаткова была ацэнена пранікальнасць злучэнняў праз фосфаліпідную мембрану. У выніку атрыманыя злучэння здольныя пранікаць праз мембраны, за выключэннем NBD-вытворных пеніцылінаў, гідрафільных па сваёй прыродзе. Сінтэзаваныя злучэння ў сваім складзе мелі фрагменты, якія палягчаюць маніторынг і аналіз і валодаюць ўласцівасцямі малекулярных зондаў, а таксама маюць фармакафорныя фрагменты. Атрыманыя *in silico* дадзеныя адкрываюць перспектывы для далейшых даследаванняў *in vitro* дадзеных злучэнняў як патэнцыйных малекулярных зондаў і інгібітараў.

GENERAL CHARACTERIZATION OF THE WORK

Master's thesis: 134 pages, 123 figures, 21 tables, 110 references (including 2 author's publications).

Keywords: NBD-amines, fluorescence, piperazine, bioorthogonal electrophilic fragments, lysosomotropic agents, β -lactam antibiotics, antifungal azoles, trimetazidine, hydrophobic NBD derivatives, yeast, bacteria, albumin, solvatochromism, microscopy, *in silico* analysis of membrane permeability, docking.

Object of research: NBD derivatives of amines containing various functional substituents.

Research subject: synthesis and study of biological and physico-chemical properties of the obtained compounds.

Purpose of the work: to carry out the design and synthesis of structures based on 7-nitrobenzofurazan and various amines, additionally containing various functional fragments, as well as to conduct a primary assessment of their biological properties using *in silico* methods and yeast and bacteria cells to develop new bioactive substances.

Tasks:

1. Synthesize a series of NBD-derivatives of amines containing a $-\text{CH}_2\text{-Br}$ fragment and/or either a lysosomotropic piperazine unit and/or hydrophobic fatty acid residues and/or known pharmacophore fragments;

2. Carry out molecular docking of compounds with some protein structures of *Mycobacterium tuberculosis* and other bacterial species, all protein structures of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a selection of cytochrome P450 structures, cathepsins, flavin-containing monooxygenases, as well as structures of penicillin-binding proteins and β -lactamase, evaluate the permeability of molecules through the membrane by the calculation method;

3. Conduct a microbiological study of the effect of the obtained compounds on the growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*, as well as the effect of NBD-derivatives of penicillins on the growth of gram-positive bacteria *Bacillus Subtilis* and gram-negative bacteria *Escherichia coli*;

4. Test for *in vitro* bioconversion of NBD-PZ-Hex in yeast *Yarrowia lipolytica* and study its distribution *in situ* in yeast *Saccharomyces cerevisiae*;

5. Investigate the solvatochromic effect of the compounds NBD-PZ-Hex, NBDdeAcKTZ, NBD-EDA-Hex, NBD-PZ and study their reaction to acidic and alkaline media;

6. Conduct optical titration of NBD-PZ-Hex and NBD-derivatives of penicillins with blood serum protein (BSA).

Results: in this work, methods have been developed and some 7-nitrobenzofurazan derivatives have been synthesized, additionally containing various functional fragments: NBD-ampicillin, NBD-aminopenicillanic acid, 4-nitro-7-(4-(2,3, 4-trimethoxybenzyl)piperazin-1-yl)benzofurazan (NBD-TMZ), NBD-piperazine (NBD-PZ), 2-bromo-1-(4-(7-nitrobenzofurazan-4-yl)piperazin-1-yl) ethanone (NBD-PZ-BAB), 4-(4-(2-bromoethyl)piperazin-1-yl)-7-nitrobenzofurazan (NBD-PZ-EtBr), 1-(4-(7-nitrobenzofurazan-4-yl)piperazin-1-yl)hexan-1-one (NBD-PZ-Hex), N-{2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethyl}hexanamide (NBD-EDA-Hex), N-deacetyl-ketoconazole (deAcKTZ) and its NBD derivative NBDdeAcKTZ. The receipt of a number of target products was confirmed by mass spectrometry, NMR spectroscopy, spectrophotometry, spectrofluorimetry and TLC. In the course of the work, the interaction of some compounds with bovine serum albumin was studied and their solfatochromic effect was evaluated, as well as the effect of acidic and alkaline media on the absorption and fluorescence spectra of selected compounds. In the course of the work, a microbiological study of the effect of the obtained compounds on the growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia Lipolytica*, as well as the effect of NBD-derivatives of penicillins on the growth of gram-positive bacteria *Bacillus Subtilis* and gram-negative bacteria *Escherichia coli* was carried out. The compounds NBD-deacetylketonazole and deacetylketonazole inhibited yeast growth comparable to the control solution of ketoconazole. In the case of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the deacetylated ketoconazole solution inhibited yeast growth to a significantly greater extent than the ketoconazole control solution. In a study of growth inhibition of gram-negative bacteria *Escherichia coli*, partial growth inhibition occurred in the well with the added NBD-derivative of ampicillin. When microbiologically tested with the yeast *Yarrowia lipolytica*, the NBD-PZ-Hex compound underwent some biotransformation to form a more hydrophobic product that requires further analysis. According to the results of an *in situ* study of the intracellular distribution of NBD-PZ-Hex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this compound was able to penetrate into yeast cells. The parameters of interaction with some protein structures of *Mycobacterium tuberculosis* and other bacterial species, all protein structures of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a selection of structures of cytochromes P450, cathepsins, flavin-containing monooxygenases, as well as structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases were determined by the molecular docking method. The binding energies to target proteins ranged from -13.9 to -6.5 kcal/mol. By means of computer calculations, the permeability of the compounds through the phospholipid membrane was additionally evaluated. As a result, the compounds obtained are able to penetrate membranes, with the exception of NBD-derivatives of penicillins, which are hydrophilic in nature. The synthesized compounds contained fragments that facilitate monitoring and analysis, endowing them with the properties of molecular probes, as well as pharmacophore fragments. The data obtained

in silico open up prospects for further *in vitro* studies of these compounds as potential molecular probes and inhibitors.