

На правах рукописи



САВАТЕЕВ Константин Валерьевич

**СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
НИТРОАЗОЛОПИРИМИДИНОВ**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент
Уломский Евгений Нарциссович

Официальные оппоненты: **Островский Владимир Аронович,**
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
технологический институт (технический
университет)», профессор кафедры химии и
технологии органических соединений азота;

Волчо Константин Петрович,
доктор химических наук, профессор РАН,
ФГБУН Новосибирский институт органической
химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения
Российской академии наук, главный научный
сотрудник лаборатории физиологически активных
веществ

Ведущая организация: ФГБУН Институт технической химии Уральского
отделения Российской академии наук, г. Пермь

Защита состоится «20» марта 2017 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.285.08 на базе ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу: 620002, г. Екатеринбург, пр. Мира, 19, ауд. И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», <http://lib.urfu.ru/mod/data/view.php?d=51&rid=264460>

Автореферат разослан «____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Поспелова Татьяна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Направленный поиск и конструирование соединений с широким спектром полезной биологической активности в качестве основы для создания новых лекарственных препаратов является одной из важнейших задач органической химии. На сегодняшний день одним из наиболее крупных классов структур с такими свойствами являются гетероциклические соединения, однако современные способы получения биологически активных гетероциклов представляют собой многоступенчатые синтезы с использованием нетривиальных реагентов, что приводит к высокой стоимости конечной субстанции лекарственного средства. Кроме того, существующие методики отличаются низкой селективностью, что само по себе означает удорожание продукта, а также приводит к сложной очистке конечной субстанции от изомерных примесей. Таким образом, разработка селективных методов синтеза известных биологически активных структур и поиск новых молекул, несущих полезные фармакологические свойства, представляют самостоятельный интерес.

С этой точки зрения одним из интересных классов гетероциклов являются нитроазолопиримидины, содержащие мостиковый атом азота в качестве важного структурного элемента. Как правило, в литературе соединения этого класса рассматриваются в качестве структурных аналогов природных нуклеозидов пуринового ряда, соответственно, основное внимание исследователи уделяют реакциям алкилирования по гетероциклическим атомам азота с целью получения аномальных нуклеозидов. При этом совершенно неисследованными остаются такие важные синтетические приемы химии гетероциклов как хлордезоксигенирование и деструкция циклов. Однако именно с помощью указанных модификаций возможен селективный синтез структур с потенциально высокой биологической активностью ряда азолопуринов. При этом ценность нитроазолопиримидинов не ограничивается рассмотрением их в качестве предшественников азолопуринов: структурное сродство с нексантиновыми ингибиторами аденозиновых рецепторов и нуклеозидными противовирусными препаратами позволяет рассматривать их в качестве основы для создания препаратов с активностью в отношении таких социально-значимых заболеваний как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, сепсис и грипп.

Целью работы является разработка методов синтеза сопряженных гетероциклических систем ряда нитроазолопиримидинов и азолопуринов на основе доступных азолопиримидинов: 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов, 1,3,4-тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидинов и 1,2,3,4-тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов, а также исследование строения, возможностей дальнейшей функционализации и аспектов практического применения новых синтезированных соединений. Кроме того, цели работы включают внедрение кандидата в лекарственные препараты с противовирусным действием в отношении гриппа и низкой цитотоксичностью ряда солей 6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **основные задачи**:

- разработать методы хлордезоксигенирования нитроазолопиримидинов, выделения хлоргетероциклов и последующего нуклеофильного замещения атома галогена на алкиламины;
- осуществить поиск удобных методов восстановления нитрогруппы в полученных структурах для синтеза вицинальных диаминопроизводных азолопиримидинов;
- разработать методы аннелирования имидазольного фрагмента с целью синтеза 8-алкилтриазоло[5,1-*b*]пуринов из вицинальных аминопроизводных азолопиримидинов;
- исследовать структуру и физико-химические свойства синтезированных соединений;
- оценить биологическую активность синтезированных гетероциклов;
- проанализировать данные по противовирусной активности солей 6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и выбрать наиболее перспективную структуру в качестве основы для создания нового лекарственного препарата;

- разработать масштабируемый метод синтеза выбранной соли 6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидина и провести наработку достаточного количества субстанции с целью выведения кандидата в лекарственные препараты на клинические испытания.

Научная новизна и теоретическая значимость:

- Исследовано влияние различных третичных аминов в качестве активаторов при проведении реакции хлордезоксигенирования в ряду 6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов;
- предложены подходы к синтезу 6-нитро-7-алкиламино-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинам, 6-нитро-7-алкиламино-1,2,3,4-тетразоло-[1,5-*a*]пиримидинам, а также 2*H*-5-алкиламино-6-нитро-1,3,4-тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидин-7-онам;
- кроме того, разработаны методы синтеза 6,7-диамино-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов, а также, на их основе, 8-алкилазоло[5,1-*b*]пуринов;
- исследовано влияние различных третичных аминов в качестве активаторов при проведении реакции хлордезоксигенирования в ряду 6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов;
- показано, что некоторые из полученных соединений обладают рядом полезных биологических свойств, в том числе в отношении различных мишеней, воздействие на которые оправдано в рамках терапии сахарного диабета, *in vitro*. Кроме того, некоторые структуры ряда нитротриазоло[1,5-*a*]пиримидинов продемонстрировали активность в отношении септического шока и вируса гриппа *in vivo*.

Практическая ценность работы:

- Разработаны препаративные методы синтеза производных 6-нитро-7-алкиламино-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов, 2*H*-5-алкиламино-6-нитро-1,3,4-тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидин-7-онов и 6-нитро-7-алкиламино-1,2,3,4-тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов, представляющих интерес с точки зрения структурного сродства с существующими антагонистами аденозиновых рецепторов;
- кроме того, на основании указанных структур были синтезированы 8-алкилтриазоло[5,1-*b*]пурины и 5-алкилтиадиазоло[3,2-*a*]пурин-8-оны, которые являются структурными аналогами природных нуклеозидов и представляют интерес с точки зрения их потенциальной противовирусной активности. Полученные 5-алкилтиадиаолопурины являются так же предшественниками существующих аномальных нуклеозидов ряда фамцикловира, а разработанные методы их получения открывают возможность для региоспецифического синтеза таких нуклеозидов;
- выявлено, что синтезированные производные проявляют противовирусную и противосептическую активность *in vivo*, а так же антигликирующую активность *in vitro*. При этом для 5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид L-аргининия моногидрата, т.н. «Тризида», был выполнен весь комплекс работ для выведения субстанции на клинические испытания, в результате чего, на данный момент, «Тризид» успешно прошел первую стадию клинических испытаний.

Личный вклад автора состоял в сборе, систематизации и анализе литературных данных по синтезу и свойствам азолопуринов, а также по реакционной способности азолопиримидинов в реакции хлордезоксигенирования и биологической активности азотсодержащих ди- и трициклических гетероциклов в отношении аденозиновых рецепторов, проведении экспериментальных синтетических исследований, обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций.

Методология и методы диссертационного исследования основаны на анализе литературных данных, квантово-химическом моделировании структуры новых гетероциклов, направленном органическом синтезе, использовании катализаторов при проведении синтеза органических соединений. Все вновь полученные соединения охарактеризованы необходимым набором физико-химических (температуры плавления, элементный анализ) и спектральных данных (спектры ЯМР, включая двумерные корреляционные спектры). Для ряда соединений

строение доказано методом рентгеноструктурного анализа.

Положения, выносимые на защиту:

- методы получения нитросодержащих алкиламиноазолопиримидинов с помощью реакции хлордезоксигенирования и нуклеофильного замещения галогена;
- результаты исследования влияния различных третичных аминов на течение реакции хлордезоксигенирования;
- методы получения триконденсированных гетероциклов группы триазоло[5,1-*b*]пуринов и тиадиазоло[3,2-*a*]пуринов;
- результаты работ по внедрению субстанции кандидата в новые лекарственные препараты «Триазида»;
- данные по структуре и физико-химическим свойствам синтезированных гетероциклов;
- анализ квантово-химических расчетов в отношении сродства к рецептору A_{2a}, а также результатов биологических испытаний в отношении сепсиса *in vivo*, противодиабетической активности *in vitro* и противовирусной активности некоторых синтезированных гетероциклов.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 2 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 патент РФ, а так же 6 тезисов и материалов докладов на международных конференциях.

Апробация результатов. Основные результаты были представлены на конференциях: 18th European Symposium on Organic Chemistry (Франция, Марсель, 2013), XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry (Португалия, Лиссабон, 2014), 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry (Новосибирск, 2015), Frontiers in Medicinal Chemistry 2015 (Бельгия, Антверпен, 2015), 1st European Young Chemists Meeting (Португалия, Гимарайнш, 2016), International symposium on medicinal chemistry 2016 (Манчестер, Великобритания, 2016).

Объем и структура работы. Диссертация выполнена на 182 страницах, состоит из введения, трех глав: аналитический обзор (глава 1), обсуждение результатов (глава 2), экспериментальная часть (глава 3) и выводов. Диссертация содержит 79 схем, 65 таблиц, 18 рисунков. Библиографический список цитируемой литературы содержит 113 наименования.

Благодарность. Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность доценту, к.х.н. Ельцову О.Н. (Уральский Федеральный Университет, г. Екатеринбург) за проведения исследований спектроскопии ЯМР, к.х.н. Слепухину П.А. (Институт органического синтеза УрО РАН, г. Екатеринбург) за проведение рентгеноструктурных исследований, к.х.н. Баженовой Л.Н. (Институт органического синтеза УрО РАН, г. Екатеринбург) за проведение исследований по элементному анализу, исследовательской группе под руководством академика, д.х.н. Киселева О.И. (НИИ Гриппа, г. Санкт-Петербург) за проведение расчетов сродства к A_{2a} аденозиновому рецептору *in silico*, а так же исследования биологической активности ряда синтезированных структур в отношении септического шока *in vivo*, исследовательской группе под руководством академика, д.х.н. Спасова А.А. (Государственный медицинский университет, г. Волгоград) за исследования биологической активности ряда синтезированных структур в отношении противодиабетических мишеней *in vitro*, коллективу технологической группы под руководством Артемьева Г.А. (Институт органического синтеза УрО РАН, г. Екатеринбург) за совместную работу по наработке субстанции «Триазида» для клинических испытаний.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

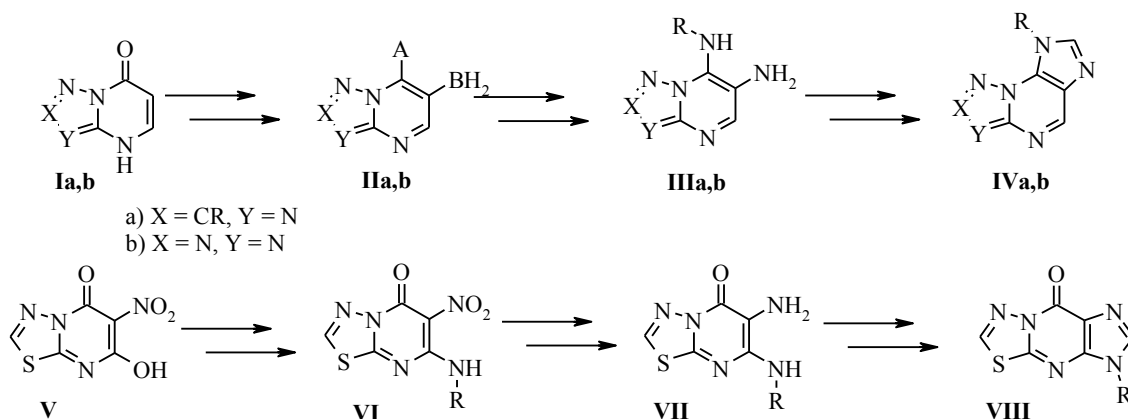
Результаты данной диссертационной работы изложены в трех основных разделах. В первом разделе описываются методы хлордезоксигенирования в ряду азолопиримидинов, подходы к синтезу триазолопуринов, а также соотношение структура-активность в отношении сродства к аденозиновым рецепторам среди наиболее перспективных азотсодержащих гетероциклических систем. Во втором разделе представлены результаты, полученные в ходе разработки методов хлордезоксигенирования нитроазолопиримидинов, дальнейшего восстановления нитрогруппы в их структуре с целью получения вицинальных диаминов, а также подбор синтетических условий для построения имидазольного фрагмента с целью синтеза азолопуринов; в дополнение к этому представлены результаты работ по внедрению 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она L-аргининия моногидрата «Триазида» в

качестве кандидата в противовирусные лекарственные препараты. В третьем разделе обсуждаются квантово-химические расчеты для некоторых синтезированных нитротриазолопиримидинов в отношении сродства к рецептору A_{2a} , а также результаты биологических испытаний в отношении сепсиса *in vivo* и антигликирующей активности *in vitro* (испытания биологической активности и квантово-химические расчеты были проведены в НИИ Гриппа г. Санкт-Петербург и Волгоградском государственном медицинском университете).

1. Подходы к синтезу триазолопуринов через промежуточное образование 6-галоген-, 6-азо-, 6-амино-триазолопиримидинов

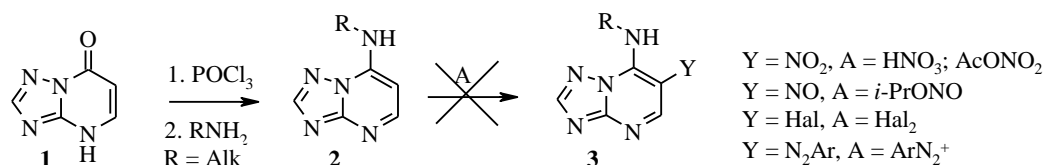
В соответствии со схемой 1, ключевыми интермедиатами для синтеза азолопуринов **IV** и **VIII** являются соответствующие вицинальные диаминопроизводные **III** и **VII**. Для синтеза последних необходимо выполнение двух условий: функционализация гетероциклического скелета остатком, который можно перевести в свободный амин, и трансформация соседней оксогруппы в алкиламинофрагмент.

Схема 1.



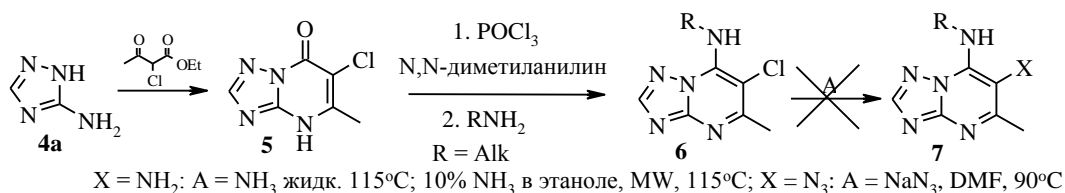
1,2,4-Триазоло[1,5-*a*]пиримидоны **Ia** были выбраны в качестве базовых структур для разработки подходов к синтезу соответствующих диаминопроизводных в силу наибольшей доступности этих соединений. При этом на первом этапе работ мы столкнулись с двумя основными трудностями: легкостью гидролиза алкиламиногруппы и значительной дезактивацией положения C6-триазолопиримидиновой системы к реакциям электрофильного замещения. Так, несмотря на простоту конвертации оксогруппы в алкиламинофрагмент в гетероцикле **1**, выполнить последующую функционализацию по соседнему положению не представилось возможным в силу легкости гидролиза алкиламиногруппы в соответствующих реакционных условиях (Схема 2).

Схема 2.



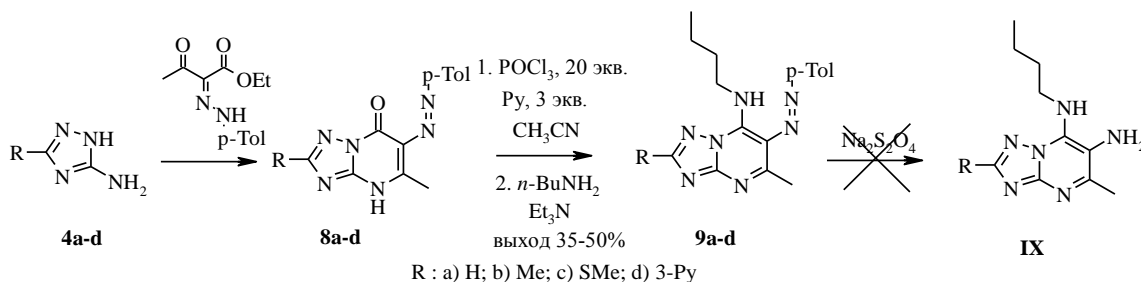
В случае предварительного введения атома галогена в C6-положение гетероциклической системы с помощью соответствующей реакции циклоконденсации с получением пиримидона **5**, последующего хлордезоксигенирования и аминирования, оказалось, что атом хлора в соединении **6** не вступает в реакцию нуклеофильного замещения с такими реагентами как жидкий аммиак или азид натрия (Схема 3).

Схема 3.



Более продуктивным оказался подход с использованием 6-азотриазолопиримидонов **8a-d**, которые удалось перевести в соответствующие алкиламинопроизводные **9a-d** с хорошими выходами последовательным действием смеси хлористого фосфорила и пиридина и затем *n*-бутиламино (Схема 4).

Схема 4.

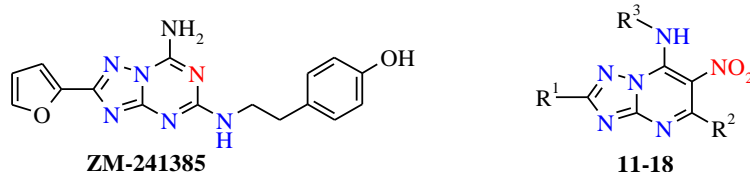


Стоит отметить, что в гетероциклах **9a-d** присутствуют вицинальные азотсодержащие фрагменты, что является необходимым условием для синтеза соответствующих диаминопроизводных **IIIa**. Однако набор реагентов для восстановления азофрагмента оказался лимитирован легкостью гидролиза алкиламина в кислой или щелочной среде, а также низкой растворимостью гетероциклов **9a-d** в водно-спиртовых средах, что не позволило осуществить получение соответствующих диаминопроизводных **IX**.

2. Подходы к синтезу триазолопуринов, основанные на применении нитропроизводных триазолопиримидинов

Нитропроизводные триазолопиримидонов **10** являются легкодоступными соединениями, которые образуются при нитровании незамещенных аналогов или циклизацией аминотриазола с соответствующими синтетическими эквивалентами, содержащими нитрогруппу. Несмотря на это реакционная способность и биологическая активность таких структур на сегодняшний день исследована недостаточно. Указанные гетероциклы стали отправной точкой для получения производных **11-18**, которые имеют структурное сходство с таким мощным ингибитором аденозиновых рецепторов как **ZM-241385**, дублируя ключевые элементы строения последнего, такие как алкиламиногруппу, ответственную за активность соединения в межклеточном пространстве, а также π -систему 1,2,4-триазольного цикла, которая ответственна за связывание с рецептором. Основное «ноу-хау» предлагаемого подхода состоит в моделировании одного из гетероциклических атомов азота в триазиновом цикле исходной структуры с помощью электронно-эквивалентной ему нитрогруппы (Схема 5).

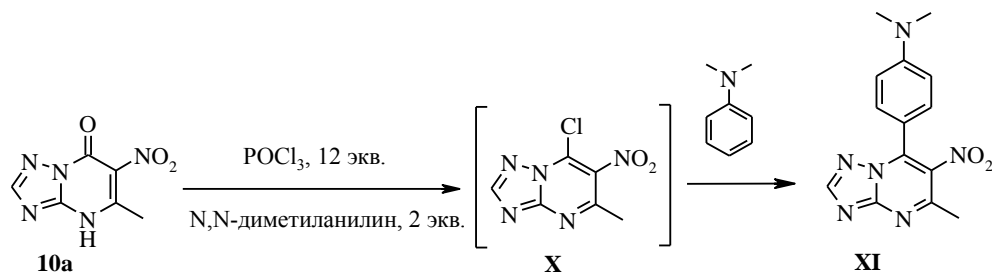
Схема 5.



Кроме того, такие 6-нитро-7-алкиламинотриазолопиримидины **11-18** являются прямыми предшественниками вицинальных диаминопроизводных **IIIa**, на основе которых можно осуществить стереоспецифичный синтез соединений ряда 8-алкилтриазолопуринов **IVa**.

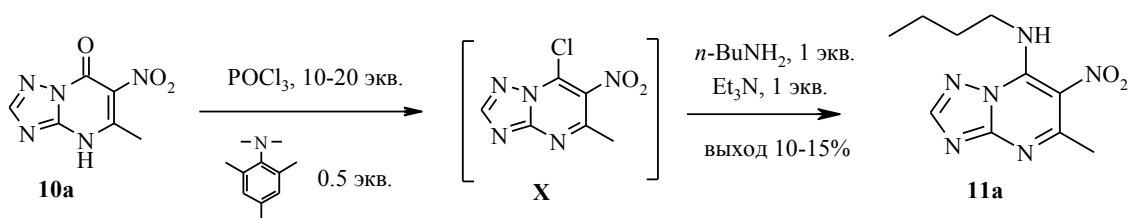
Для разработки универсального метода хлордезоксигенирования нитропроизводных ряда триазолопиримидонов **10** нами был выбран 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он **10a** в качестве базового соединения. Как следует из литературного обзора, одним из наиболее распространенных реагентов для проведения хлордезоксигенирования в ряду азолопиримидонов является смесь хлористого фосфорила с *N,N*-диметиланилином. Однако при кипячении триазолопиримидона **10a** в такой смеси образуется нежелательный продукт **XI**, что обусловлено взаимодействием образующегося 7-хлоргетероцикла **X** с *N,N*-диметиламинилином, который выступает в качестве *S*-нуклеофила (Схема 6).

Схема 6.



Для того чтобы избежать взаимодействия образующегося хлоргетероцикла **X** с С-нуклеофильным центром ароматического амина, который необходим для проведения процесса и играет роль активатора, был использован 2,4,6,N,N-пентаметиланилин с защищенным С4-атомом. Так, добавление 0.5 эквивалентов пентаметиланилина в реакционную массу приводило к образованию раствора, что является эмпирическим показателем протекания процесса. Однако при соответствующей обработке реакционной смеси не удалось выделить интермедиат **X**, при этом перевести его *in situ* в соответствующее алкиламинопроизводное оказалось возможным, хотя и с невысоким выходом 10-15% (Схема 7).

Схема 7.



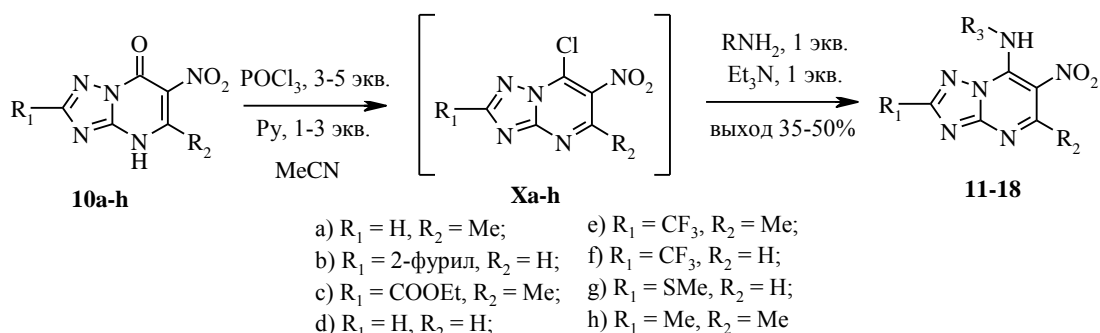
Другим подходом для решения указанной проблемы стало использование третичных алкиламинов: триэтиламина, трипропиламина, трибутиламина и диизопропилэтиламина. В случае последних двух оснований удалось добиться образования устойчивого раствора при проведении реакции хлордезоксигенирования и перевести образующееся галогенпроизводное **X** в гетероциклический алкиламин **11a** *in situ*. Однако, в силу высокой температуры кипения третичных аминов, выделение продукта реакции оказалось достаточно трудоемкой задачей, кроме того, отмечался и невысокий выход продукта **11a** (10-15%). Использование значительно более низкокипящего триэтиламина однако не привело к образованию гомогенной смеси при нуклеофильном замещении кислорода на атом хлора и, после соответствующей обработки, был выделен лишь исходный пиримидон **10a**. Оказалось, что оптимальными физико-химическими свойствами обладает трипропиламин, который достаточно липофилен для активации процесса, в то же время температура кипения данного активатора позволяет эффективно удалять его остатки из реакционной массы при выделении продукта, благодаря чему удалось достичь выхода производного **11a** в 20-25%. Однако процесс выделения продукта по-прежнему оставался достаточно трудоемким, что, вкпе с невысокими выходами, и явилось причинами для дальнейшей оптимизации методики.

Повысить выход и снизить трудоемкость выделения продукта **11a** удалось при использовании пиридина: оказалось, что добавление одного эквивалента сухого пиридина к суспензии исходного триазолопиримидона **10a** с хлористым фосфорилем в абсолютном ацетонитриле приводит к практически мгновенному образованию раствора, что свидетельствует о протекании реакции хлордезоксигенирования. Стоит отметить, что выделение продукта **11a** в данном случае оказалось значительно проще, чем при использовании триалкиламинов или высококипящих анилинов, что позволило повысить выход до 35-40% (Схема 8).

Другим перспективным активатором, на основании хороших результатов при использовании пиридина, мог бы стать N,N-диметиламинопиридин (ДМАП), который комбинирует основные свойства пиридинового атома азота и диметиламиногруппы, связанной

с ароматическим фрагментом, при этом данный гетероцикл не проявляет нуклеофильных свойств, а, следовательно, не может взаимодействовать с образующимся хлортриазолопиримидином **X** в процессе реакции. Однако применение ДМАП в количестве от одного до трех эквивалентов на один эквивалент триазолопиримидона **10a** в смеси сухого ацетонитрила и хлористого фосфорил не позволило добиться образования устойчивой гомогенной реакционной массы и, после соответствующей обработки, был выделен лишь исходный триазолопиримидон **10a**.

Схема 8.



Таким образом, в результате были выбраны следующие оптимальные условия проведения процесса: использование сухого ацетонитрила в качестве растворителя позволило уменьшить количество хлористого фосфорил до трех-пяти эквивалентов, что, в свою очередь, позволяет избежать осмоления реакционной массы, которое происходит при использовании хлорокиси фосфора в качестве реакционной среды, кроме того, меньший избыток хлористого фосфорил проще удалить по окончании реакции, что упрощает выделение продукта.

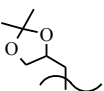
Пиридин в количестве от одного до трех эквивалентов, в зависимости от функциональной группы в C2-положении триазолопиримидиновой системы, обладает достаточной активностью для инициирования реакции хлордезоксигенирования, в то же время, не взаимодействует с образующимся галогенгетероциклом и достаточно легко удаляется при выделении продукта реакции. Тем не менее, выделить 6-нитро-7-хлортриазолопиримидины **Xa-h** не удалось ни в одном из случаев, последние были переведены в алкиламинопроизводные **11-18** *in situ* действием соответствующих первичных аминов и третичного азотистого основания для нейтрализации выделяющейся хлороводородной кислоты (Схема 8).

Указанным способом удалось синтезировать ряд структур **11-18** с различными заместителями при аминогруппе, в том числе с кислородсодержащими остатками, а также фрагментами, моделирующими группу-линкер в антагонисте АР **ZM-241385** (Таблица 1).

Для подтверждения структуры синтезированных соединений были использованы методы ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии и элементный анализ очищенных образцов. Кроме того, удалось выполнить рентгено-структурный анализ (все исследования в рамках РСА были выполнены в ИОС УрО РАН под руководством к.х.н. Слепухина П.А.) нескольких кристаллических образцов (Рисунок 1).

Таблица 1 – синтезированные структуры ряда 6-нитро-7-алкиламино-1,2,4-триазоло[1,5-a]пиримидинов 11-18

Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	Выход %	Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	Выход %
11a	H	Me	<i>n</i> -Bu	36	13f	SMe	H	(CH ₂) ₂ OAc	46
11b	H	Me	<i>i</i> -Bu	36	14a	Me	Me	<i>n</i> -Bu	39
11c	H	Me	<i>t</i> -Bu	35	14b	Me	Me	<i>i</i> -Bu	38
11d	H	Me	<i>n</i> -Pr	36	14c	Me	Me	<i>t</i> -Bu	40
11e	H	Me	<i>i</i> -Pr	37	14d	Me	Me	<i>n</i> -Pr	40
11f	H	Me	(CH ₂) ₂ OAc	43	14e	Me	Me	<i>i</i> -Pr	42

11g	H	Me		50	14f	Me	Me	(CH ₂) ₂ OAc	45
12a	H	H	<i>n</i> -Bu	50	15a	COOEt	Me	<i>n</i> -Bu	35
12h	H	H	(CH ₂) ₂ Ph-4-Cl	53	16a	CF ₃	Me	<i>n</i> -Bu	30
13a	SMe	H	<i>n</i> -Bu	40	16e	CF ₃	Me	<i>i</i> -Pr	32
13b	SMe	H	<i>i</i> -Bu	39	17a	CF ₃	H	<i>n</i> -Bu	35
13d	SMe	H	<i>n</i> -Pr	40	18a	Фур-2-ил	H	<i>n</i> -Bu	32
13e	SMe	H	<i>i</i> -Pr	40					

Синтезированные 6-нитро-7-алкиламинотриазоло[1,5-*a*]пиримидины **11-18** являются прямыми предшественниками вицинальных диаминопроизводных **IIIa**, которые, в свою очередь, дают возможность стереоспецифичного синтеза 8-алкилтриазоло[5,1-*b*]пуринов **IVa** в соответствии со схемой 1. Стоит отметить, что набор синтетических приемов для восстановления нитрогруппы ограничен для указанных 6-нитро-7-алкиламинотриазолопиримидинов **11-18** в силу высокой скорости гидролиза алкиламиногруппы в кислой или щелочной среде, что обусловлено соседством указанного фрагмента с электронакцепторной нитрогруппой. Вследствие этого, такие методы как восстановление железом или оловом в минеральных кислотах оказались неприменимы для получения диаминопроизводных **19-22**.

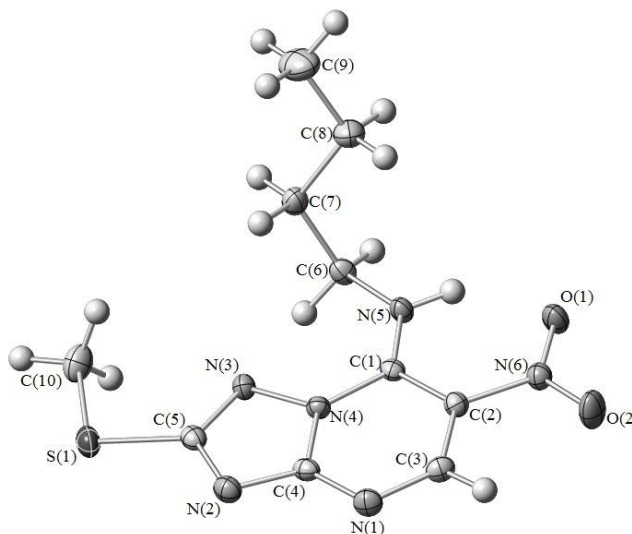


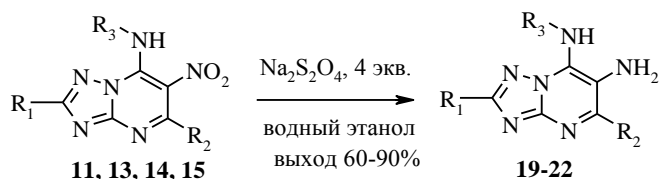
Рисунок 1 – Молекулярная структура соединения 17a в тепловых эллипсоидах 50%-ной вероятности

Наиболее распространенным методом конверсии нитрогруппы в аминофрагмент в гетероцических соединениях является восстановление водородом на катализаторе. Однако другим перспективным подходом представляется использование цинка в муравьиной кислоте: во-первых, это препаративно удобная комбинация реагентов, во-вторых, использование муравьиной кислоты позволяет рассчитывать на последовательное восстановление нитрогруппы с образованием вицинальных диаминов **19-22** и последующее аннелирование имидазольного цикла, в которой муравьиная кислота участвует в качестве донора C-атома.

Оказалось, что при кипячении 6-нитро-7-*n*-бутиламинотриазолопиримидина **11a** в 97% муравьиной кислоте с добавкой четырех эквивалентов цинковой пыли в течение нескольких

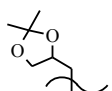
часов приводит к продукту с низким выходом в 6%, которому на основании данных ^1H ЯМР и элементного анализа была приписана структура 5-метил-8-*n*-бутилтриазоло[5,1-*b*]пурина **19a**. Однако, в виду сложности выделения и низкого выхода продукта, данный метод представился нам бесперспективным.

Схема 9.



Вследствие этого, для восстановления нитрогруппы в указанных структурах, вместо цинковой пыли, нами был использован дитионит натрия, который позволяет восстановить нитрогруппу в водно-спиртовой среде в нейтральных условиях (Схема 9). Так, с помощью четырех эквивалентов дитионита натрия на один эквивалент 6-нитро-7-алкиламинотриазолопиримидинов **11, 13, 14, 15** удалось конвертировать нитрофрагмент в аминогруппу с выходами продуктов **19-22** в 60-90%.

Таблица 2 – синтезированные структуры ряда 6-амино-7-алкиламино-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов 19-22

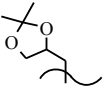
Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	Выход %	Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	Выход %
19a	H	Me	<i>n</i> -Bu	60	20c	Me	Me	<i>t</i> -Bu	74
19b	H	Me	<i>i</i> -Bu	64	20d	Me	Me	<i>n</i> -Pr	70
19c	H	Me	<i>t</i> -Bu	65	20e	Me	Me	<i>i</i> -Pr	67
19d	H	Me	<i>n</i> -Pr	60	20f	Me	Me	(CH ₂) ₂ OAc	63
19e	H	Me	<i>i</i> -Pr	63	21a	SMe	H	<i>n</i> -Bu	75
19f	H	Me	(CH ₂) ₂ OAc	60	21b	SMe	H	<i>i</i> -Bu	76
19g	H	Me		75	21d	SMe	H	<i>n</i> -Pr	72
20a	Me	Me	<i>n</i> -Bu	65	22a	COOEt	Me	<i>n</i> -Bu	90
20b	Me	Me	<i>i</i> -Bu	68					

Для получения триазоло[5,1-*b*]пуринов **23-26**, исходя из синтезированных гетероциклов **19-22**, необходимо аннелирование имидазольного цикла на основе двух вицинальных аминогрупп. С этой целью нами были испытаны два конденсирующих реагента – концентрированная муравьиная кислота и триэтилортоформиат. Стоит отметить, что нагревание исходных диаминов **19-22** в нейтральной среде триэтилортоформиата зачастую приводило к осмолению осадка и невозможности выделения целевых триазолопуринов. При этом, несмотря на кислые условия, именно с помощью муравьиной кислоты удалось осуществить аннелирование имидазольного фрагмента в исходных триазолопиримидинах **19-22**. Таким способом был синтезирован ряд 2-*R*₁-5-*R*₂-8-алкил-1,2,4-триазоло[5,1-*b*]пуринов **23-26** с выходами 88-95% (Схема 10).

Схема 10.



Таблица 3 – синтезированные структуры ряда 8-алкил-1,2,4-триазоло[5,1-*b*]пуринов 23-26

Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	Выход %	Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	Выход %
23a	H	Me	<i>n</i> -Bu	92	24d	Me	Me	<i>n</i> -Pr	93
23b	H	Me	<i>i</i> -Bu	92	24e	Me	Me	<i>i</i> -Pr	93
23d	H	Me	<i>n</i> -Pr	93	24f	Me	Me	(CH ₂) ₂ OAc	92
23e	H	Me	<i>i</i> -Pr	93	25a	SMe	H	<i>n</i> -Bu	95
23f	H	Me	(CH ₂) ₂ OAc	90	25b	SMe	H	<i>i</i> -Bu	90
23g	H	Me		88	25d	SMe	H	<i>n</i> -Pr	95
24a	Me	Me	<i>n</i> -Bu	92	26a	COOEt	Me	<i>n</i> -Bu	90
24b	Me	Me	<i>i</i> -Bu	95					

Примечательно, что при попытке выполнить аннелирование имидазольного фрагмента к *трет*-бутиламинопроизводным **19c**, **20c** при действии муравьиной кислоты или триэтилортоформиата, оказалось, что выделить соответствующий 8-*трет*-бутилтриазоло[5,1-*b*]пурин не удастся. Вероятно, реакция циклоконденсации не протекает ввиду пространственных затруднений, обусловленных присутствием объемного *трет*-бутильного заместителя.

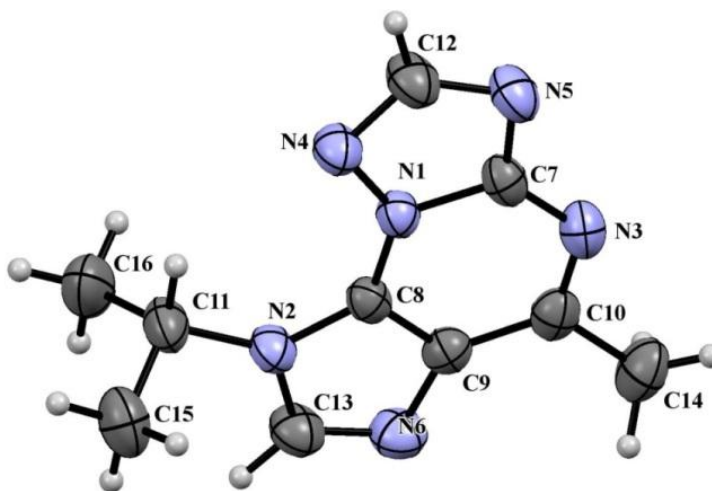


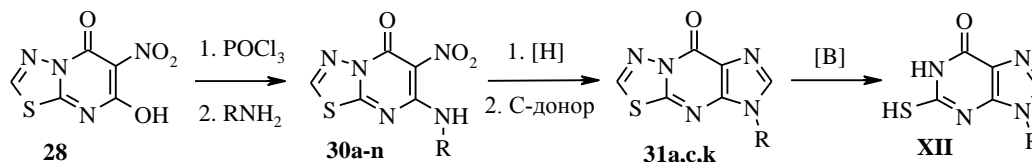
Рисунок 2 – Молекулярная структура соединения 23е в тепловых эллипсоидах 50%-ной вероятности

Строение полученных 2-R₁-5-R₂-8-алкил-1,2,4-триазоло[5,1-*b*]пуринов **23-26** было установлено на основании ¹H, ¹³C ЯМР спектроскопии, элементного анализа, а также подтверждено с помощью РСА одного из кристаллических образцов (Рисунок 2).

3. Тиadiaзоло[3,2-*a*]пиримидины

Использование описанной выше синтетической методологии в ряду тиadiaзоло[3,2-*a*]пиримидинов (Схема 11) и тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов может приводить к региоспецифичному синтезу аналогов нуклеозидов пуринового ряда, зарекомендовавших себя в качестве противовирусных средств, за счет использования приема деструкции азольного цикла.

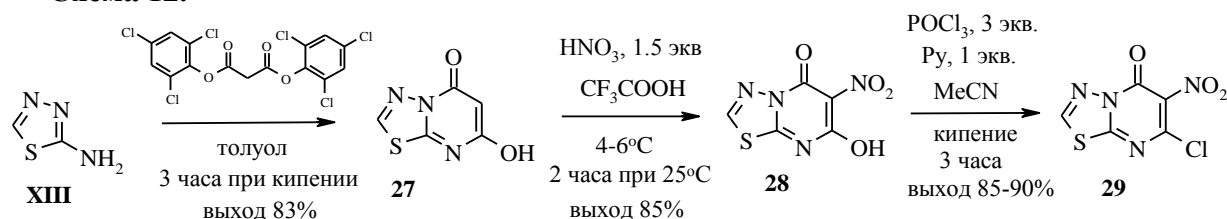
Схема 11.



Для разработки подхода к синтезу 5-алкилтиадиазоло[3,2-*a*]пурин-8-онов на первом этапе нами был оптимизирован метод получения 5-гидрокситиадиазоло[3,2-*a*]пиримидин-7-она **27**, используя т.н. «магический малонат» для циклоконденсации с аминотиадиазолом **XIII**, вместо описанных в литературе диоксида триуглерода и диэтилмалонового эфира. В дальнейшем из гетероцикла **27** было получено соответствующее нитропроизводное **28** с помощью реакции нитрования, которая была проведена в среде трифторуксусной кислоты: последняя обеспечивает гомогенные условия для протекания процесса, вместе с тем обладает достаточной кислотностью для генерации катионов нитрония в необходимой для нитрования концентрации.

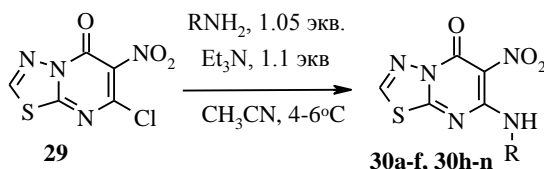
Несмотря на низкую растворимость соединения **28** в органических растворителях, прибавление одного эквивалента сухого пиридина к суспензии гетероцикла **28** и трех эквивалентов хлористого фосфора в среде ацетонитрила приводит, после нескольких минут кипячения, к образованию устойчивого раствора, что является эмпирическим показателем протекания реакции хлордезоксигенирования.

Схема 12.



После нагревания данной реакционной массы при температуре кипения в течение трех часов, упаривания летучих компонентов в вакууме и затирания маслянистого остатка со льдом, удалось выделить осадок кремового цвета с температурой плавления 189-191°C, который, в том числе по результатам элементного анализа, соответствовал структуре 5-хлор-6-нитротиадиазоло[3,2-*a*]пиримидина **29**. Кроме того, полученный продукт растворяется в органических растворителях, например, ацетонитриле, в отличие от исходного гидроксилпроизводного **28**. Исключительная, по сравнению с 6-нитро-7-хлортриазолопиримидином **X**, стабильность галогенпроизводного **29** может быть объяснена меньшими напряжениями в гетероциклической системе за счет замены атома азота на серу в азольном фрагменте.

Схема 13.



30a) R = n-Bu, выход 70%

30b) R = i-Bu, выход 71%

30c) R = n-Pr, выход 75%

30d) R = i-Pr, выход 73%

30e) R = CH₂CH₂OAc, выход 90%

30f) R = CH₂CH₂CH₂OAc, выход 85%

30h) R = CH₂CH₂OH, выход 90%

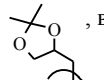
30i) R = CH₂CH₂CH₂OH, выход 85%

30j) R = CH₂CH₂CH₂CH₂OH, выход 85%

30k) R = CH₂CH₂Ph-4-Cl, выход 89%

30l) R = CH₂CH₂Ph-4-OH, выход 75%

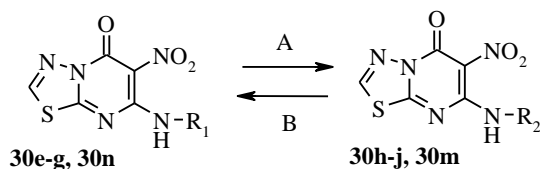
30m) R = CH₂CH(OH)CH₂OH, выход 78%

30n) R = , выход 75%

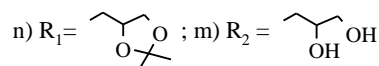
Полученное галогенпроизводное **29** послужило исходным реагентом для синтеза ряда 5-алкиламино-6-нитротиадиазоло[3,2-*a*]пиримидин-7-онов **30a-f**, **30h-n** при проведении

реакции в среде сухого ацетонитрила с соответствующими первичными аминами и эквимолярным количеством триэтиламина для нейтрализации выделяющегося хлористого водорода (Схема 13). Кроме того, для синтезированных структур **30e-j**, **30n**, **30m** были подобраны синтетические приемы для снятия/введения ацетильной и ацетонидной защиты для кислородсодержащих остатков при аминокгруппе (Схема 14). Именно таким способом удалось синтезировать гетероцикл **30g** с выходом 89%.

Схема 14.



e-g) $R_1 = (CH_2)_{2-4}OAc$; h-j) $R_2 = (CH_2)_{2-4}OH$

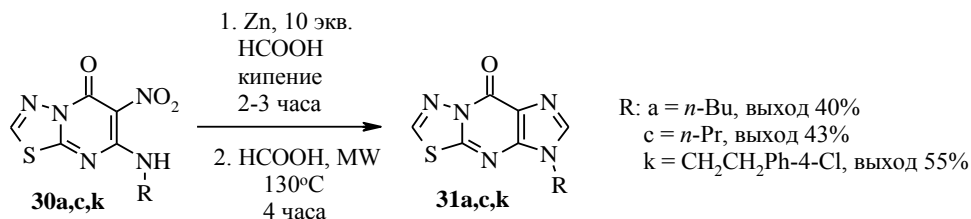


e-g, h-j) A = $HClO_4$ несколько капель, MeOH, кипение, 6-12 часов, 95-99%; B = Ac_2O 2 экв., Py, 85°C, 3 часа, 85-90%

n, m) A = $AcOH + H_2O$ (4:1), кипение, 40 мин, 95%; B = 2,2-диметоксипропан, DMF, p-TosOH 0.04 экв., 81°C, 6 часов, 95%

Дальнейшее восстановление нитрогруппы реализовать по аналогии с 6-нитротриазолопиримидинами с помощью дитионита натрия не представилось возможным в силу малой растворимости гетероциклов **30** в водно-спиртовых средах. Другим препаративно-удобным реагентом для восстановления нитрогруппы, как было отмечено выше, является цинковая пыль, которая обладает достаточной восстанавливающей способностью в среде муравьиной кислоты, последняя, помимо обеспечения прототропных условий реакции восстановления, играет роль подходящего растворителя для проведения процесса (Схема 15).

Схема 15.

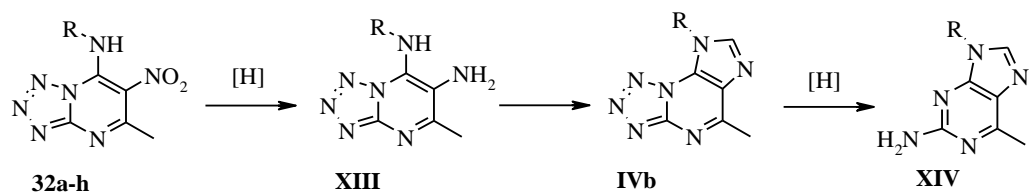


Другим преимуществом проведения процесса в среде муравьиной кислоты является возможность последовательного восстановления нитрогруппы и аннелирования имидазольного цикла на основе вицинальных аминокфрагментов, в которой муравьиная кислота играет роль реагента. Однако при кипячении соответствующего тиадiazоло[3,2-a]пиримидина **30a** в концентрированной муравьиной кислоте с добавкой четырех эквивалентов цинковой пыли в течение двух часов не наблюдалось образование продукта со структурой тиадiazоло[3,2-a]пурина **31a**. При увеличении времени реакции до четырех-восьми часов в выделенном осадке удалось обнаружить 10-20% трициклического продукта **31a**, однако дальнейшее увеличение продолжительности нагревания не приводило к повышению выхода. Увеличить выход трициклических производных **31a,c,k** удалось путем последовательного кипячения исходных гетероциклов **30a,c,k** в муравьиной кислоте с десятью эквивалентами цинковой пыли и последующим нагреванием продукта реакции в концентрированной муравьиной кислоте при 130°C и микроволновом облучении. Таким способом удалось получить несколько соединений ряда 5-алкилтиадiazоло[3,2-a]пурин-8-онов **31a,c,k** с удовлетворительным выходом.

4. Тетразоло[1,5-a]пиримидины

Другим перспективным подходом к региоспецифичному синтезу аномальных нуклеозидов может быть применение предложенной нами синтетической методологии в ряду тетразоло[1,5-a]пиримидинов, поскольку, по аналогии с тиадiazольным фрагментом, тетразольный цикл в восстановительных условиях разрушается до свободной аминокгруппы, что и позволяет получить N9-алкилированные пурины в соответствии со схемой 16.

Схема 16.

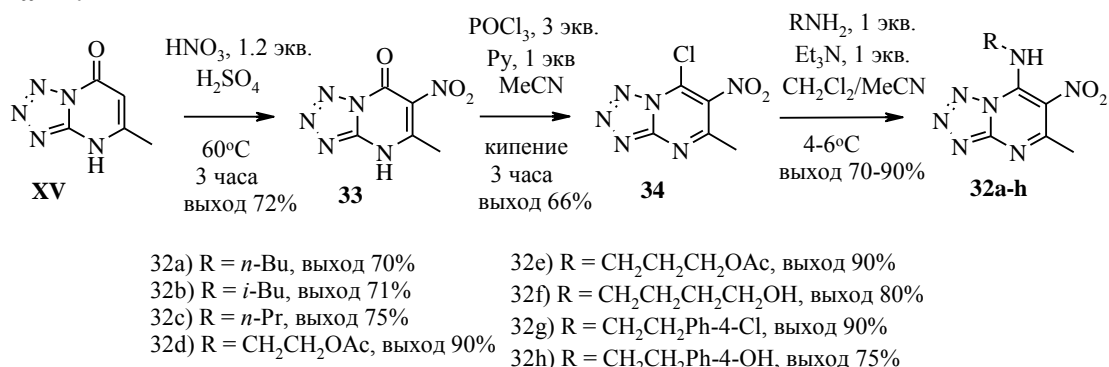


С целью реализации данного подхода нами была предложена схема синтеза 5-метил-6-нитро-7-алкиламинотетразоло[1,5-*a*]пиримидинов **32a-h** на основе доступного 5-метилтетразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **XV**. Стоит отметить, что в литературе нет упоминаний ни одного из производных ряда тетразолопиримидинов **32-34**, представленных на схеме 17.

Нитрование гетероцикла **XV** было выполнено с помощью смеси серной и азотной кислот при умеренном нагревании до 60°C, поскольку при проведении процесса при температурах ниже указанной наблюдалась лишь частичная конверсия исходного соединения **XV** в нитропроизводное **33**.

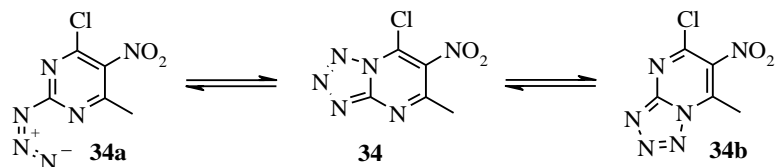
Дальнейшее хлордезоксигенирование пиримидона **33** было реализовано по разработанной ранее для триазоло- и тиadiaзоло-пиримидонов методике с использованием абсолютного ацетонитрила в качестве реакционной среды, хлористого фосфорил в качестве хлордезоксигенирующего агента и сухого пиридина в качестве активатора. После соответствующей обработки удалось выделить низкоплавкое твердое вещество, которое соответствует структуре 5-метил-6-нитро-7-хлортетразоло[1,5-*a*]пиримидина **34** по данным элементного анализа, спектров ^1H и ^{13}C ЯМР.

Схема 17.



Кроме того, одним из показателей конвертации гетероцикла **33** в галогенпроизводное **34** служит значительный сдвиг показателя R_f (с 0.0 до 0.7) при тонкослойном хроматографировании в этилацетате, что объясняется значительными гидрофильными свойствами исходного пиримидона **33** и липофильностью структуры **34**. Стоит отметить, что хлорпроизводное **34**, несмотря на значительное структурное сходство с соответствующим нестабильным галогентриазолопиримидином **X**, удалось выделить из реакционной массы и охарактеризовать. Данный факт, вероятно, можно объяснить вкладом азидной формы **34a**, доказательство наличия которой можно наблюдать в ИК спектре продукта **34**: антисимметричным валентным колебаниям азидного фрагмента соответствует интенсивная полоса в области $\sim 2130\text{ см}^{-1}$, а полоса поглощения в области $\sim 1389\text{ см}^{-1}$ проявляется вследствие симметричных колебаний этой группы. Однако эти данные относятся к твердой форме гетероцикла **34**, в то время как наличие и соотношение различных таутомерных форм тетразолопиримидинов может варьироваться в зависимости от растворителя, температуры и других факторов. Подобные исследования азидо-тетразольной таутомерии в ранее неописанных гетероциклах представляют поле для отдельного исследования и нами, в рамках данной диссертации, такие работы не проводились, поэтому все изображения синтезированных структур ряда тетразолопиримидинов приводятся в одной из таутомерных форм для удобства записи.

Схема 18.



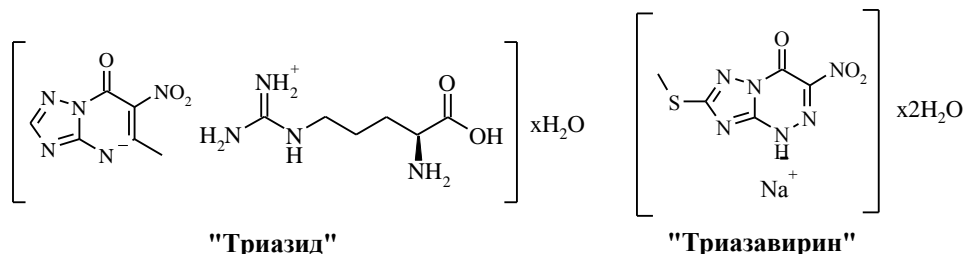
Дальнейшее взаимодействие хлорпроизводного **34** с первичными аминами было осуществлено в среде сухого ацетонитрила или хлористого метилена в присутствии эквимольного количества триэтиламина для нейтрализации выделяющейся кислоты (Схема 17). Полученные алкиламиногетероциклы **32a-h** представляют собой медленно кристаллизующиеся твердые вещества с низкими температурами плавления. Низкая точка плавления в данном случае может быть также объяснена азидо-тетразольной таутомерией, что приводит к эвтектической смеси таутомеров по аналогии со схемой 18.

5. Работы по внедрению нового противовирусного препарата «Триазид»

Одной из поставленных задач стало осуществление комплекса работ по разработке и выведению на клинические испытания нового противовирусного препарата, обладающего высокой активностью в отношении вируса гриппа и низкой токсичностью. При этом ранее уже были отмечены случаи значительной противовирусной активности в ряду азолазинов: так, «Триазавирин» со структурой триазолотриазина является зарегистрированным лекарственным препаратом, прошедшим все стадии клинических испытаний. Среди ряда структурных аналогов «Триазавирина» - солей 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов, был отобран «Триазид» в качестве молекулы сочетающей высокую противовирусную активность вкупе с низкой токсичностью, синтез которой предусматривает использование доступных реагентов и технологичных приемов.

При этом наиболее удобным методом синтеза «Тризида» оказалась реакция солеобразования свободного L-аргинина с 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-оном в водной среде. Первоначально эквимольные количества исходных веществ смешивались в воде с образованием раствора, который упаривался досуха и полученный осадок представлял собой необходимую соль. Такой метод имеет несколько недостатков: во-первых, упаривание водного раствора досуха являлось нетехнологичной операцией с высокими энергетическими и материальными затратами, во-вторых, аргининиевая соль 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидина получалась в виде дигидрата, состав которого подтверждался данными элементного анализа. При этом дериватограмма этого образца показала его термическую нестабильность – вода удалялась уже при температурах выше 50°C.

Схема 19.



Чтобы стабилизировать состав субстанции, полученную соль, в виде дигидрата, перекристаллизовывали из смеси вода – этанол с получением стабильного моногидрата аргининиевой соли 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидина. Однако по данным ¹H ЯМР и дериватографии данный образец не имел постоянного состава, содержа примесь в виде этилового спирта. Сушка при 100°C и остаточном давлении 20 мм. рт. ст. не позволяла полностью удалить эту примесь, что давало основание сделать вывод: этанол встроен в кристаллическую решетку вещества. На основании такого заключения была произведена замена этанола на *изо*-пропанол, который имеет более существенные пространственные

затруднения по сравнению с этиловым спиртом, что не позволяет ему встраиваться в кристаллическую решетку препарата. При перекристаллизации образца, полученного упариванием водного раствора, из смеси вода – *изо*-пропанол (1:3) получено вещество соответствующее 5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинату 8H⁺ L-аргининия моногидрату, с содержанием основного вещества по данным ВЭЖХ не менее 99.5%. Данные дериватографии для этого образца подтверждают, что масса вещества, уходящая из образца при 150-180°C, соответствует молекуле воды. Наконец, данный усовершенствованный метод синтеза субстанции исключает энергоемкое упаривание водного раствора продукта – вместо этого, к нему добавляют трехкратное, по отношению к воде, количество *изо*-пропанола и оставляют для кристаллизации. Выход продукта при таком подходе падает незначительно и составляет 90%.

Для уточнения противовирусной активности «Триазид» был выполнен биологический скрининг *in vitro* и *in vivo* в НИИ Гриппа (г. Санкт-Петербург) под руководством академика О.И. Киселева. Так, в испытаниях *in vitro* в отношении штамма вируса гриппа А/Сидней/5/97 (H3N2) были получены результаты, которые свидетельствуют о более мощном противовирусном эффекте «Триазид» по сравнению с препаратом сравнения «Триазавирином» (Таблица 4): на основании микротетразолиевого теста (МТТ) было показано, что даже в концентрации 5 мкг/мл «Триазид» ингибирует вирусную активность на 79.4%, в то время как «Триазавирин» в концентрации 50 мкг/мл проявляет ингибирующую активность величиной 62.0%

Также «Триазид» показал высокий уровень противовирусной активности на модели летальной гриппозной инфекции у мышей, вызванной вирусом А/Aichi/2/68 (H3N2) (Таблица 4): при пероральном введении «Триазид» обладает высокой противовирусной активностью (коэффициент защиты >80%), несколько опережая по этому показателю препарат сравнения, «Триазавирин», в дозировке 100 мг/кг. При этом «Триазид» продемонстрировал меньшую токсичность, чем «Триазавирин», поскольку максимальная доза при пероральном введении собакам составила 20000 мг/кг в случае триазолопиримидинового гетероцикла и 400 мг/кг в случае соответствующего триазолотриазина.

Таблица 4 – Противовирусная активность и токсичность «Триазид»

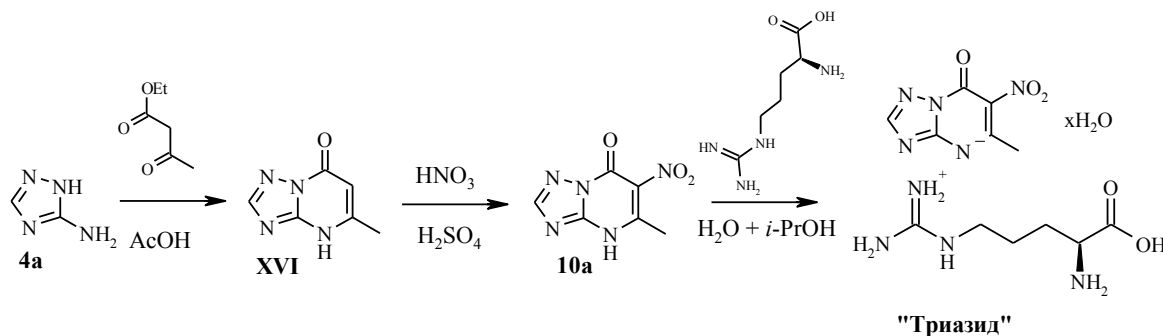
Показатель (* = 50 мкг/мл, ** = 100 мг/кг)	Активность <i>in vitro</i> в отношении вируса гриппа А/Сидней/5/97 (H3N2), МТТ _{max} , % ингибирования	Активность <i>in vivo</i> в отношении вируса гриппа А/Aichi/2/68, % выживших мышей на 14 сут после заражения	Максимальная доза при пероральном введении собакам, мг/кг
«Триазид»	79.4*	85**	20 000
«Триазавирин»	62.0*	78**	400

Таким образом, разработанный 5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинат 8H⁺ L-аргининия моногидрата «Триазид» проявляет высокую и умеренную противовирусную активность *in vitro* и *in vivo*. В сравнении с прототипом - «Триазавирином» - заявляемое соединение показывает либо более высокую, либо соизмеримую активность. В то же время острая токсичность «Триазид» оказалась в несколько раз ниже по сравнению с «Триазавирином». Таким образом, при совместной оценке противовирусного действия и токсичности «Триазид» является более эффективным в сравнении с соединением-прототипом.

На следующем этапе, для наработки субстанции «Триазид» в количестве необходимом для проведения клинических испытаний, были оптимизированы три химические стадии процесса получения конечного продукта, исходя из коммерчески доступного 3-амино-1,2,4-триазола **4a**, для работы на пилотных установках с реакционным объемом 10 литров (Схема 20). Данные работы были проведены совместно с технологической группой Института

Органического Синтеза УрО РАН им. И.Я. Постовского под руководством Г.А. Артемьева. При этом было отмечено, что при масштабировании лабораторной методики необходимо внести несколько изменений в синтез «Триазида». В частности, на первой стадии для сохранения приемлемых выходов (80-85%) продукта **XVI** необходима выдержка реакционной массы, состоящей из 3-амино-1,2,4-триазола, ацетоуксусного эфира и ледяной уксусной кислоты, при температуре кипения с отгонкой летучих компонентов в течение трех часов.

Схема 20.



При нитровании гетероцикла **XVI** до соответствующего продукта **10a** было обнаружено, что снижение количества серной кислоты на 10% не приводит к изменению выхода нитропроизводного **10a**, однако с экономической точки зрения такое действие оправдано. Во-вторых, важным отличием от лабораторного метода получения нитропроизводного **10a** стало изменение последовательности смешения компонентов в реакции нитрования вследствие пирофорности порошка 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **XVI**. Вместо постепенного добавления порошка в нитрующую смесь – смесь серной и азотной кислоты, обладающую повышенной окисляющей способностью, – триазолопиримидон **XVI** добавляли в купоросное масло и, после его растворения, добавляли эту массу в смесь серной и азотной кислот.

Наконец последняя химическая стадия, реакция солеобразования между нитропроизводным **10a** и L-аргинином в водной среде, приводящая к получению 5-Метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинид L-аргининия моногидрата «Триазида», также была модифицирована с точки зрения последовательности смешения реагентов: лабораторный вариант прибавления сухого компонента **10a** к водному раствору L-аргинина при масштабировании оказался нетехнологичным приемом и конечный опытно-промышленный регламент включал в себя проведение этой стадии путем помещения сухих компонентов, гетероцикла **10a** и L-аргинина, в реактор и последующее добавление воды и изопропанола в соответствии с методикой.

Благодаря указанным выше модификациям лабораторной методики, удалось выполнить наработку стабильной по необходимым показателям субстанции «Триазида» для проведения клинических испытаний данного кандидата в лекарственные препараты и, можно отметить, что на сегодняшний день «Триазид» успешно прошел первую стадию клинических испытаний.

6. Биологическая активность синтезированных гетероциклов

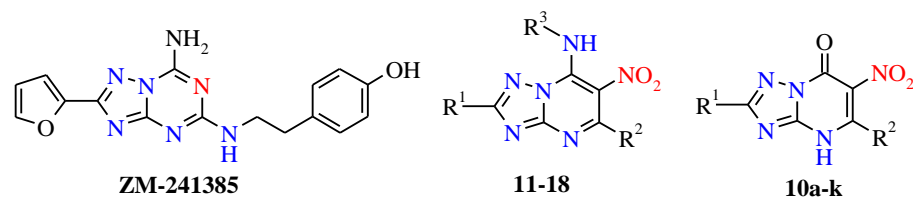
6.1 Активность в отношении сепсиса

Как было показано в литературном обзоре, на сегодняшний день наиболее эффективными ингибиторами аденозиновых рецепторов являются азотсодержащие гетероциклические структуры с мостиковым атомом азота, в качестве важного элемента ответственного за биологическое действие. Другой значимой особенностью является наличие мощной π -электронной гетероциклической системы, а также присутствие фрагментов способных к образованию водородных связей с аденозиновым рецептором.

Синтезированные нитропроизводные ряда триазоло[1,5-а]пиримидинов **10-18** моделируют указанные структурные элементы известных антагонистов A_{2a} рецепторов (Схема 21), что позволяет предполагать схожую биологическую активность, в том числе и в отношении сепсиса, который связан с работой AP. С целью исследования противосептического эффекта

указанных гетероциклов были проведены квантово-химические расчеты сродства к A_{2a} рецептору и исследована биологическая активность в отношении сепсиса *in vivo* в Институте Гриппа (г. Санкт-Петербург) под руководством академика Киселева Олега Ивановича.

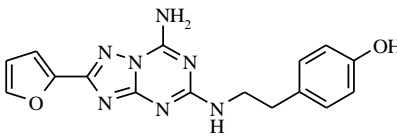
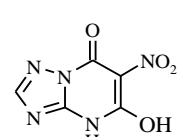
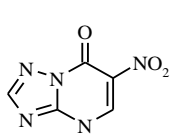
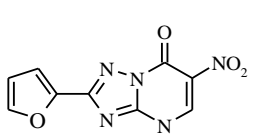
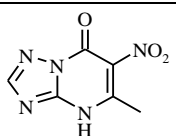
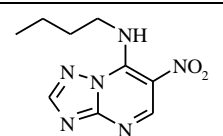
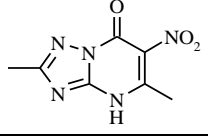
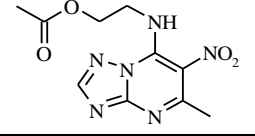
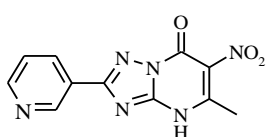
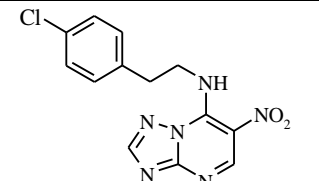
Схема 21.



По результатам изучения связывания нитротриазолопиримидинов **10a**, **10b**, **10d**, **10h**, **10i**, **10j**, **12a**, **11f**, **12h** с AP A_{2A} *in silico* было установлено, что указанные гетероциклы уступали в аффинности известному антагонисту **ZM-241385**. Как известно, для оптимального связывания важны и полярные (водородные связи и т.д.), и гидрофобные взаимодействия. Визуальный анализ как двумерных формул лигандов, так и трехмерных комплексов рецептор-лиганд показывает, что молекула уже известного антагониста по форме лучше подходит к «карману» активного центра, а также имеются объемные гидрофобные группы, обеспечивающие эффективные неполярные взаимодействия и вносящие значительный энергетический вклад в комплексообразование.

Оказалось, что 6-нитро-7-(*para*-хлорфенилэтиламино)-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин **12h** имеющий объемный гидрофобный заместитель, обладает также и наибольшим сродством в ряду тестируемых соединений по отношению к A_{2A} рецептору. Большая часть рассматриваемых триазолопиримидинов, очевидно, образует комплекс с рецептором за счет водородных связей, демонстрируя умеренный аффинитет (Таблица 5).

Таблица 5 – Расчетные константы ингибирования для нитротриазолопиримидинов

№	Структура	pK _i	№	Структура	pK _i
ZM-241385		10.00	10j		5.34
10d		5.23	10b		7.14
10a		5.27	12a		6.53
10h		5.11	11f		6.48
10i		5.99	12h		7.54

Результаты, полученные при тестировании указанных соединений *in vivo*, в целом, согласуются с расчетными данными. Скрининг биологической активности соединений

проводился на модели септического шока, вызванного у мышей введением липополисахарида *Salmonella typhosa* (ЛПС (Sigma-Aldrich)). По результатам испытаний наибольшую активность (80% выживаемость мышей с вызванным искусственно септическим шоком) продемонстрировало соединение **10b**, которое по результатам квантово-химических расчетов уступило только **ZM-241385** и **12h**. Последнее соединение, показавшее наибольший аффинитет по результатам расчетов, исключая триазолотриазиную структуру, также продемонстрировало значительную активность в испытаниях на животных, купировав септическое состояние у трех мышей из пяти.

Таблица 6 – Влияние производных нитротриазолопиримидинов на выживаемость мышей с септическим шоком (2 серии эксперимента)

Группа/Вещество	Эффект, погубло/ всего	Выживаемость, %	Вещество	Эффект, погубло/ всего	Выживаемость, %
Интактные	0/5	100 %	10b	1/5	80 %
Плацебо	5/5	0 %	10j	2/5	60 %
Гидрокортизон, 15 мг/кг	2/5	60 %	10i	5/5	0
10d	4/5	20 %	12a	4/5	20 %
10a	5/5	0 %	10h	5/5	0 %
11f	2/5	60 %	12h	2/5	60 %

Однако гетероциклы **10i** и **12a** с удовлетворительным расчетным сродством $pK_i = 5.99$ и 6.53 , соответственно, не проявили значимой активности в отношении сепсиса *in vivo*. Так, при введении мышам с септическим шоком раствора 2-(β-пиридил)-5-метил-6-нитротриазоло[1,5-*a*]пиримид-7-она **10i** не наблюдалось увеличения выживаемости по сравнению с результатами в группе плацебо. Вероятно, такие результаты могут быть обусловлены цвиттер-ионной структурой гетероцикла, которая препятствует образованию устойчивых водородных связей с рецептором (Таблица 6).

6.2 Противодиабетическая активность

Другим направлением в поиске биологической активности полученных гетероциклов стало исследование активности в отношении различных мишеней, воздействие на которое может иметь терапевтический потенциал при сахарном диабете. Все эти испытания были проведены в Волгоградском государственном медицинском университете под руководством академика Спасова А.А.

Процесс гликирования, то есть взаимодействие свободных аминок групп белков с карбонильными группами сахаров, усиливающийся при гипергликемии, лежит в основе патогенеза микро- и макрососудистых осложнений сахарного диабета. Кроме того, продукты гликозилирования промотируют внутриклеточный окислительный стресс, сопровождающийся накоплением активных метаболитов кислорода, которые также вовлечены в повреждение клеточных структур. Следовательно, на сегодняшний день является актуальным поиск веществ, предотвращающих образование продуктов гликозилирования, с целью создания лекарственных препаратов для патогенетической профилактики осложнений сахарного диабета.

Несколько синтезированных структур ряда нитроазолопиримидинов были испытаны на антигликирующую активность *in vitro* вместе с препаратом сравнения **аминогуанидином** (Таблица 7). Стоит отметить, что среди пиримидинов **10**, **28**, **33** наибольшую активность продемонстрировали гетероциклы **10b** и **10k**, содержащие фурильный фрагмент в своей структуре. Интересно, что наибольшую активность из всех алкиламинопроизводных, продемонстрировал гетероцикл **11e**, который представляет собой достаточно простой по структуре 5-метил-6-нитро-7-изо-пропиламинотриазоло[1,5-*a*]пиримидин.

Таблица 7 – Антигликирующая активность некоторых синтезированных гетероциклов

№	Шифр соединения	Антигликирующая активность (ингибирование флуоресценции гликированного БСА), Δ% (M±m)		IC ₅₀ , μM
		Концентрация, 10 ⁻³ M	Концентрация, 10 ⁻⁴ M	
10h		87,59±1,39	33,82±4,42	202,38
10b		90,71±0,46	50,05±2,46	50,35
10i		86,13±1,99	30,32±4,51	225,28
10k		97,20±0,14	65,72±1,76	95,95
11e		82,05±2,73	30,88±2,26	580,66
28		60,77±2,32	11,54±1,43	462,87
33		70,11±0,82	10,98±3,96	419,03
Аминог уанидин		57,83±0,58	6,01±2,12	765,00

Кроме того, наиболее перспективные структуры **10h**, **10g**, **10i**, **10k** с точки зрения антигликирующей активности были испытаны на ингибирующую активность *in vitro* в отношении различных ферментов, воздействие на которые может иметь потенциал при борьбе с сахарным диабетом (таблица 8). Так, ингибирование дипептидилпептидазы типа 4 (DPP 4), которая является мембранным ферментом, гидролизующим пептидную связь с N-конца пролина, приводит к продлению эффекта инкретина, что, в свою очередь, стимулирует дополнительную секрецию инсулина. Фермент α-глюкозидаза (AG) отвечает за гидролиз α-1,4-гликозидных связей на нередуцирующем конце α-1,4-глюканов, отщепляя глюкозу в α-форме, иначе говоря, данный фермент расщепляет олигосахариды на усвояемые организмом сахара – следовательно, ингибирование данного фермента приводит к замедлению расщепления олигосахаридов и снижению уровня сахара в крови. Наконец, гликогенфосфорилаза (GP) выполняет подобную α-глюкозидазе функцию, расщепляя гликоген до глюкозы, поддерживая постоянный уровень последней в крови между приемами пищи.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что протестированные нитротриазолопиримидоны ингибируют фермент DPP4 значительно хуже, чем препарат сравнения – вилдаглиптин. Однако метилсульфанильное производное **10g** продемонстрировало сравнимую с препаратом сравнения CP-316819 активность в отношении фермента GP. Кроме того, гетероцикл **10k**, содержащий нитрофурильный фрагмент, продемонстрировал ингибирование фермента α -глюкозидазы превышающее ту же активность для препарата сравнения, акарбозы.

Таблица 8 – Ингибирующая активность 6-нитротриазоло[1,5-*a*]пиримидонов в отношении ферментов, участвующих в метаболизме различных сахаридов

№	Структура	Ингибирование, $m \pm SEM$, %		
		DPP4 (100 мкМ)	GP (100 мкМ)	AG (1 мМ)
10h		24.23 \pm 2.65	-2.66 \pm 46.72	64.51 \pm 7.10
10g		6.26 \pm 0.21	98.32 \pm 9.59	15.9 \pm 8.55
10i		-56.51 \pm 2.29	-61.25 \pm 47.29	48.9 \pm 3.70
10k		-24.78 \pm 1.05	-6.91 \pm 25.44	99.94 \pm 4.46
Вилдаглиптин		98.58 \pm 1.53	-	-
CP-316819		-	107.88 \pm 1.48	-
Акарбоза		-	-	68.16 \pm 1.76

В целом по результатам испытаний можно сделать вывод, что синтезированные гетероциклы нитротриазолопиримидинового ряда являются перспективными для дальнейшего изучения и оптимизации с целью поиска структур, обладающих противодиабетической активностью.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В результате проделанной работы были получены следующие наиболее значимые результаты:

1. Выявлены наиболее перспективные третичные амины в качестве активаторов в реакции хлордезоксигенирования 6-нитротриазолопиримидинов;
2. Разработан метод хлордезоксигенирования 6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов, 6-азо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов, 5-метил-6-нитро-1,2,3,4-тетразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она, а так же 2*H*-5-гидрокси-6-нитро-1,3,4-тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидин-7-она и подходы к синтезу алкиламинопроизводных упомянутых структур;
3. Разработан удобный препаративно метод восстановления нитрогруппы в полученных 6-нитро-7-алкиламино-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинах;

4. Разработан метод аннелирования имидазольного фрагмента в диаминопроизводных ряда 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов с образованием 8-алкил-1,2,4-триазоло[5,1-*b*]пуринов;
5. Предложен метод синтеза 5-алкил-1,3,4-тиадиазоло[3,2-*a*]пурин-8-онов на основе синтезированных ранее 5-алкиламино-6-нитро-1,3,4-тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидин-7-онов;
6. Выполнен комплекс работ по внедрению нового противовирусного препарата «Триазид», включая выведение данного кандидата в лекарственные средства на клинические испытания;
7. Проанализирована биологическая активность синтезированных гетероциклов относительно сепсиса *in vivo* и антигликирующая активность *in vitro*, выявлены соединения-лидеры, в том числе, кандидаты на предклинические испытания;

Перспективы дальнейшей разработки темы. Результаты данной работы позволяют определить дальнейшие исследования в области химии различных производных азолопиримидинов и азолопуринов, в частности получение различнозамещенных нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов с целью поиска гетероциклов с высоким сродством и селективностью по отношению к A_{2a} аденозиновому рецептору. Кроме того, другим направлением развития данного исследования может стать поиск региоспецифичных методов синтеза аномальных нуклеозидов пуринового ряда с помощью применения методологии деструкции циклов в синтезированных 1,2,3,4-тетразоло- и 1,3,4-тиадиазоло-производных.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Savateev K.V.** Structural analogs of adenosine receptor inhibitors in the series of 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidines / **Savateev K.V.**, Ulomsky E.N., Rusinov V.L., Isenov M.L., Chupakhin O.N. // *Russian Chemical Bulletin* – 2015 – V. 64 – P. 1378–1384. (0.5 п.л./0.35 п.л.)
2. **Savateev K.V.** 8-Alkyl[1,2,4]triazolo[5,1-*b*]purines / **Savateev K.V.**, Ulomsky E.N., Borisov S.S., Voinkov E.K., Fedotov V.V., Rusinov V.L. // *Chem. Heterocycl. Compd.* – 2014 – V. 50 – P. 880–887. (0.5 п.л./0.35 п.л.)

2. Патенты

3. Чупахин О.Н. 5-Метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-альфа]пиримидинид L-аргининия моногидрат / Чупахин О.Н., Чарушин В.Н., Русинов В.Л., Уломский Е.Н., Котовская С.К., Киселев О.И., Деева Э.Г., **Саватеев К.В.**, Борисов С.С. // Патент РФ 2529487 рег. В Госреестре 27.09.2014 по заявке N 2013116765/04 от 15.04.2013. (0.55 п.л./0.1 п.л.)

3. Другие публикации

4. **K. Savateev** 6-Nitrotetrazolo[1,5-*a*]pyrimidines: structures with its own value and synthetic perspectives / K.Savateev, E. Ulomsky, V. Rusinov, V. Fedotov // *XXIV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISM 2016)*: сборник материалов международной научно-практической конференции, Манчестер, Великобритания, 2016,. С. 222 (0.1 п.л./0.06 п.л.)
5. **K. Savateev** 6-Nitro-7-alkylaminotriazolo[1,5-*a*]pyrimidines as perspective structures for treatment sepsis / K. Savateev, E. Ulomsky, V. Rusinov // *1st European Young Chemists Meeting (1st EYCheM)*: сборник материалов международной научно-практической конференции, Гимарайнш, Португалия, 2016, с. 127 (0.1 п.л./0.06 п.л.)
6. **K. Savateev** 6-Nitrotetrazolo[1,5-*a*]pyrimidines as persective precursors of biologically active heterocycles / K. Savateev, E. Ulomsky, V. Rusinov // *Frontiers in Medicinal Chemistry (FMC 2015)*: сборник материалов международной научно-практической конференции, Антверпен, Бельгия, 2015, с. 247 (0.1 п.л./0.06 п.л.)
7. **K. Savateev** Thiadiazolo[1,5-*a*]pyrimidines as Perspective Precursors of Heterocycles with Potentially High Biological Activity / K. Savateev, E. Ulomsky, V. Rusinov // *2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry*: сборник материалов международной научно-практической конференции, Новосибирск, 2015, с. 260 (0.1 п.л./0.06 п.л.)

8. **K. Savateev** Structural analogues of adenosine receptor inhibitors in the series of triazolo[1,5-a]pyrimidines / K. Savateev, E. Voinkov, S. Borisov, E. Ulomsky, V. Rusinov // *XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMС 2014)*: сборник материалов международной научно-практической конференции, Лиссабон, Португалия, 2014, с. 148-149 (0.1 п.л./0.06 п.л.)
9. **K. Savateev** Triazolo[1,5-a]pyrimidines as relevant precursors of triazolopurines/ K. Savateev, E. Voinkov, S. Borisov, E. Ulomsky, V. Rusinov, Chupakhin O // *18th European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2013)*: сборник материалов международной научно-практической конференции, Марсель, Франция, 2013, с. 241 (0.05 п.л./0.03 п.л.)