

На правах рукописи



МУСИЯК Вера Васильевна

**СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
КОНЪЮГАТОВ ПУРИНА С АМИНОКИСЛОТАМИ
И ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМИ АМИНАМИ**

02.00.03 – Органическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения
Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Краснов Виктор Павлович

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
инженерно-технологического факультета;

Обыденнов Дмитрий Львович,
кандидат химических наук, ФГАОУ ВО
«Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н.
Ельцина», доцент кафедры органической
химии и высокомолекулярных соединений
Института естественных наук и
математики

Ведущая организация:

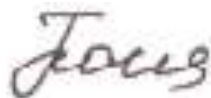
ФГБОУ ВО «Московский государствен-
ный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «17» декабря 2018 г. 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:
Екатеринбург, ул. 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?id=51&rid=285806>.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,



Поспелова Татьяна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Важной задачей органического синтеза является разработка методов получения новых биологически активных соединений – основы для создания оригинальных лекарственных препаратов. Одним из путей решения этой задачи является синтез структурных аналогов природных соединений, в частности, пурина. В связи с этим, перспективным направлением представляется получение новых C^6 -замещенных производных пурина и поиск в их ряду потенциальных терапевтических агентов.

Модификация пуринового цикла фрагментами гетероциклических аминов (в том числе хиральных), в особенности, их фторированных аналогов, представляет интерес, поскольку такие амины как хинолин, бензоксазин являются структурными фрагментами ряда биологически активных соединений. Распространенным приемом является модификация родоначальной структуры фрагментами аминокислот. Поэтому синтез конъюгатов пурина, включающих фрагменты гетероциклических аминов и/или остатки аминокислот и дипептидов, представляет интерес с точки зрения создания новых биологически активных соединений. Исключительно важной задачей является получение хиральных конъюгатов в энантимерно чистом виде, поскольку биологическая активность соединений существенно зависит от их стереоконфигурации.

Цель работы. Разработка эффективных методов синтеза новых конъюгатов пурина с гетероциклическими аминами (в том числе хиральными), аминокислотами и короткими пептидами; методов анализа их энантимерной чистоты; изучение антигерпетической и антимикобактериальной активности полученных соединений.

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

1. Разработка синтетических подходов к получению новых конъюгатов, в которых фрагмент пурина связан с остатком гетероциклического амина напрямую или посредством линкера.
2. Разработка новых эффективных методов синтеза ранее не описанных конъюгатов пурина с аминокислотами (в том числе с диаминокислотами) и короткими пептидами.
3. Разработка методов анализа энантимерного и диастереомерного состава полученных соединений.
4. Изучение антигерпетической и антимикобактериальной активности полученных конъюгатов, выявление высокоактивных соединений-лидеров.
5. Синтез структурных аналогов соединений-лидеров, тестирование их биологической активности, изучение связи «структура–активность».

Научная новизна и теоретическая значимость работы:

1. Разработаны методы синтеза новых конъюгатов пурина с различными гетероциклическими аминами (в том числе хиральными), содержащих в качестве линкера фрагмент 6-аминогексановой кислоты. На основе других ω -аминокислот синтезированы структурные аналоги 3,4-дигидро-3-метил-4-[6-(пурин-6-иламино)гексаноил]-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазина, отличающиеся длиной полиметиленового мостика. Впервые обнаружена способность 4-(3-аминопропаноил)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазина к взаимодействию с другими аминами через стадию превращения в соответствующий акрилат.
2. Синтезированы новые конъюгаты пурина и 2-аминопурина, в которых пуриновый фрагмент непосредственно связан с остатком гетероциклического амина; найдены оптимальные условия синтеза конъюгатов пурина и 2-аминопурина.
3. Разработаны методы синтеза новых *N*-(пурин-6-ил)дипептидов. Показано, что соединения со сложноэфирной группой существуют в растворе в виде двух

таутомерных форм, а соединения со свободной карбоксильной группой представляют собой единственный таутомер. Синтезированы структурные аналоги *N*-(пурин-6-ил)глицил-(*S*)-глутаминовой кислоты, в которых фрагмент глицина заменен остатками различных α - и ω -аминокислот.

4. Впервые установлено, что активация *N*-(пурин-6-ил)- α -аминокислот *N,N'*-дициклогексилкарбодиимидом приводит к рацемизации хирального центра. На примере производного *N*-(пурин-6-ил)-(*S*)-аланина показана возможность синтеза целевых *N*-(пурин-6-ил)дипептидов в диастереомерно чистом виде.

5. С применением стратегии введения–удаления защитных групп синтезированы новые конъюгаты пурина с диаминокислотами.

6. Впервые определены условия анализа энантиомерного и диастереомерного состава полученных соединений методом ВЭЖХ на хиральной неподвижной фазе.

7. Исследована антигерпетическая и антимикобактериальная активность полученных соединений, выявлена связь «структура–активность». Впервые установлена зависимость биологической активности конъюгатов пурина с 3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазином и с (*S*)-глутаминовой кислотой от строения линкерного фрагмента.

Практическая значимость работы. Разработаны оригинальные методы синтеза конъюгатов пурина с аминокислотами, пептидами и гетероциклическими аминами. Среди полученных соединений выявлены конъюгаты пурина с 3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазином, проявляющие высокую активность в отношении штаммов вируса простого герпеса, в том числе в отношении ацикловир-резистентного штамма. Выявлены *N*-(пурин-6-ил)дипептиды, содержащие фрагменты (*S*)-фенилаланина и (*S*)-глутаминовой кислоты и обладающие высокой активностью в отношении штаммов микобактерий, в том числе в отношении штамма с множественной лекарственной устойчивостью. Высокая активность изученных соединений наряду с низкой токсичностью позволяет рассматривать их в качестве основы для создания эффективных лекарственных средств.

Методология и методы исследования. В работе был использован комплекс современных методов тонкого органического синтеза и анализа энантиомерного и диастереомерного состава хиральных соединений. Строение и чистота полученных соединений доказаны с применением современных физико-химических методов исследования (^1H , ^{19}F , ^{13}C ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, элементный анализ, рентгеноструктурный анализ, поляриметрия, ВЭЖХ). Изучение биологической активности проводилось в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (г. Москва) и в Уральском научно-исследовательском институте фтизиопульмонологии (г. Екатеринбург) в соответствии с общепринятыми методами.

Степень достоверности результатов. В работе были применены современные методы синтеза и анализа органических соединений. Подтверждение строения, анализ чистоты и энантиомерного состава полученных соединений осуществлялись на сертифицированных и поверенных приборах Центра коллективного пользования «Структура и анализ органических соединений» (ЦКП САОС).

Положения, выносимые на защиту:

1. Метод синтеза ахиральных, рацемических или энантиомерно чистых пурин-6-ил-конъюгатов с различными гетероциклическими аминами, содержащих в качестве линкера остатки различных ω -аминокислот.
2. Результаты исследования реакционной способности 4-(3-аминопропаноил)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазина.
3. Подход к получению ахиральных, рацемических или энантиомерно чистых

конъюгатов, в которых фрагмент пурина замещен по положению C^6 остатком гетероциклического амина.

4. Метод синтеза энантимерно чистых *N*-(пурин-6-ил)глицил-дипептидов и конъюгатов *N*-(пурин-6-ил)- ω -аминокислот с (*S*)-глутаминовой кислотой; результаты исследования процесса таутомерии в пуриновом ядре.

5. Подход к получению конъюгатов *N*-(пурин-6-ил)- α -аминокислот с (*S*)-глутаминовой кислотой, результаты исследования процесса рацемизации, протекающего в ходе синтеза.

6. Применение стратегии введения–удаления защитных групп для синтеза энантимерно чистых конъюгатов пурина и *N*-(пурин-6-ил)глицина с диаминокислотами.

7. Методы анализа энантимерного состава полученных соединений.

8. Результаты изучения антигерпетической и антимикобактериальной активности полученных соединений.

Личный вклад соискателя состоит в сборе, систематизации и анализе литературных данных, постановке практических задач, планировании и проведении синтетических работ, обобщении результатов биологических исследований. Автор принимал участие в обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций, представлении результатов на научных конференциях.

Апробация результатов. Материалы работы представлены на шести всероссийских и международных конференциях: «MedChem 2015» (Новосибирск, 5–10 июля 2015), «OrgХим-2016» (Санкт-Петербург, 27 июня – 1 июля 2016), «Фундаментальные химические исследования XXI века» (Москва, 20–24 ноября 2016), «MedChem Russia 2017» (Казань, 28 сентября – 3 октября 2017), «Енамины в органическом синтезе» (Пермь, 23–26 октября 2017), «V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии» (Владикавказ, 10–14 сентября 2018).

Публикации. Содержание работы изложено в 15 публикациях, в том числе в 5 научных статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ; 3 патентах РФ на изобретения; а также 7 тезисах международных и всероссийских конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 145 страницах, состоит из введения, трех глав: литературный обзор (глава 1), обсуждение результатов (глава 2), экспериментальная часть (глава 3), и заключения. Диссертация содержит 73 схемы, 11 таблиц, 27 рисунков. Библиографический список цитируемой литературы состоит из 196 наименований.

Благодарность. Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность коллективу ИОС УрО РАН, в частности, сотрудникам лаборатории асимметрического синтеза: научному руководителю, заб. лаб., д.х.н., проф. В.П. Краснову и в.н.с. д.х.н. Г.Л. Левит за неоценимую помощь в проведении исследований и подготовке работы, н.с. к.х.н. А.А. Тумашову, н.с. Л.Ш. Садретдиновой и н.с. к.х.н. Е.Н. Чулакову за проведение ВЭЖХ, н.с. к.х.н. Д.А. Груздеву, н.с. Т.В. Матвеевой, м.н.с. О.А. Воздвиженской за помощь в проведении синтетических работ, н.с. к.х.н. М.А. Королевой за выполнение квантово-химических расчетов; сотрудникам лаборатории спектральных методов исследования (зав. лаб. к.х.н. М.И. Кодесс), группе элементного анализа (рук. к.х.н. Л.Н. Баженова), к.х.н. И.Н. Ганебных за проведение масс-спектрометрии, к.х.н. П.А. Слепухину за проведение рентгеноструктурного анализа. Автор также благодарит д.б.н., проф. Г.А. Галегова, к.б.н. В.Л. Андронову (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского) и к.б.н. М.А. Кравченко (Уральский НИИ фтизиопульмонологии) за проведение биологических исследований *in vitro*. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-13-01077).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

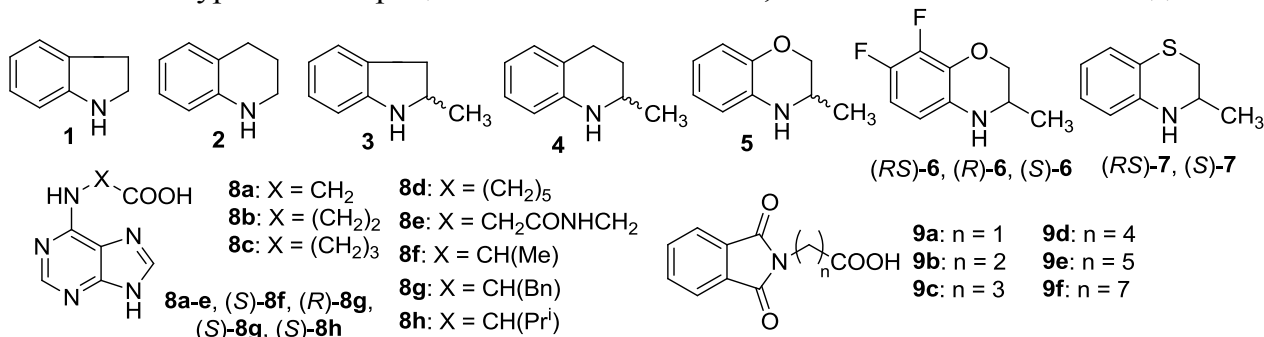
Во **введении** обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы цель и задачи исследования. В **обзоре литературы** (глава 1) описываются методы синтеза и биологические свойства конъюгатов пурина с аминокислотами. **Основные результаты** работы приводятся в главе 2, где обсуждаются методы синтеза новых конъюгатов пурина с аминокислотами и гетероциклическими аминами, методы анализа их энантиомерного состава и биологическая активность полученных соединений. В **экспериментальной части** (глава 3) описаны использованное оборудование, методы синтеза, характеристики полученных соединений, методы проведения биологических исследований.

Глава 2 Обсуждение результатов

2.1 Синтез исходных соединений

Для получения целевых соединений были использованы ахиральные (**1-2**) и хиральные (**3-7**) гетероциклические амины. Индолин **1** и (*RS*)-2-метилиндолин **3** коммерчески доступны; 1,2,3,4-тетрагидрохиолин **2**, рацемические (*RS*)-2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохиолин **4**, (*RS*)-3,4-дигидро-3-метил-2*H*-[1,4]бензоксазин **5**, (*RS*)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазин (*RS*)-**6** и (*RS*)-3,4-дигидро-3-метил-2*H*-[1,4]бензотиазин (*RS*)-**7** синтезированы в соответствии с известными методами. Энантиомерно чистые амины (*R*)-**6**, (*S*)-**6**, (*S*)-**7** получены в результате кинетического разделения рацематов хиральными ацилирующими агентами.

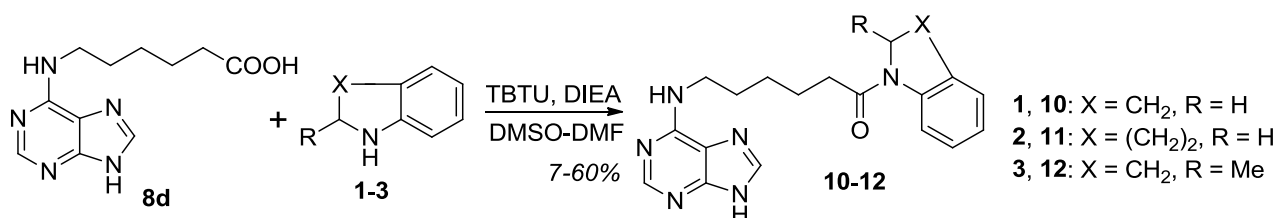
Известными методами получены исходные *N*-(пурин-6-ил)- ω -аминокислоты **8a-d**, *N*-(пурин-6-ил)глицилглицин **8e**, *N*-(пурин-6-ил)- α -аминокислоты **8f-h** и *N*-фталоил- ω -аминокислоты **9a-f**, которые были использованы для синтеза целевых конъюгатов пурина с гетероциклическими аминами, аминокислотами и пептидами.



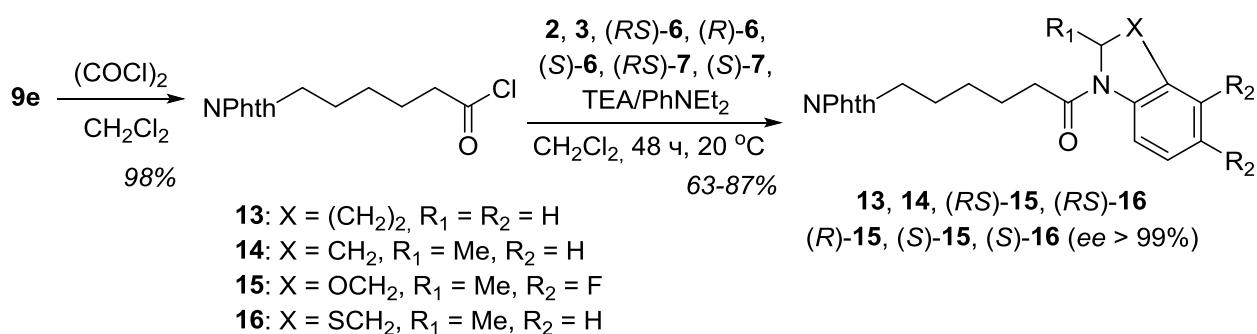
2.2 Синтез конъюгатов пурина с гетероциклическими аминами

2.2.1 Синтез конъюгатов пурина с гетероциклическими аминами, содержащих в качестве линкера остаток 6-аминогексановой кислоты

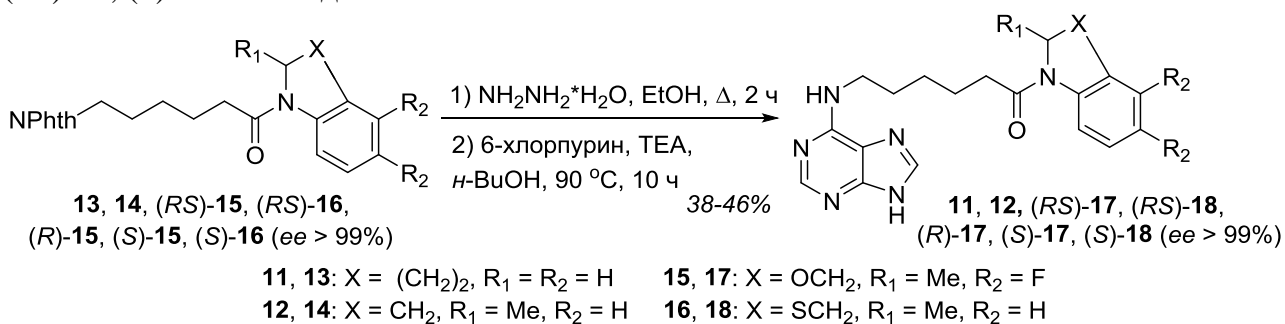
Синтез конъюгатов пурина с гетероциклическими аминами **10-12**, содержащих в качестве линкера остаток 6-аминогексановой кислоты, проводили путем конденсации *N*-(пурин-6-ил)-6-аминогексановой кислоты **8d** с гетероциклическими аминами **1-3** в присутствии *N,N,N',N'*-тетраметил-*O*-(бензотриазол-1-ил)уроний тетрафторбората (TBTU) и *N,N*-диизопропилэтиламина (DIEA). Соединения **10** и **12**, производные индолина (**1**) и 2-метилиндолина (**3**), были получены с удовлетворительными выходами (60% и 28% соответственно), а соединение **11**, производное 1,2,3,4-тетрагидрохиолина (**2**), было получено с низким выходом (7%). При взаимодействии соединения **8d** с (*RS*)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазином ((*RS*)-**6**) из реакционной смеси были выделены только исходные соединения. По-видимому, инертность амина (*RS*)-**6** в условиях конденсации связана с его низкой нуклеофильностью.



Конденсация с *N*-(пурин-6-ил)-6-аминогексановой кислотой **8d** протекает эффективно только для ограниченного числа гетероциклических аминов, поэтому был разработан альтернативный подход, предусматривающий получение целевых конъюгатов исходя из 6-фталимидогексаноил производных **13-16**. Обработка *N*-фталоил-6-аминогексановой кислоты **9e** оксалилхлоридом в дихлорметане приводила к соответствующему хлорангидриду, который вводили в реакцию ацилирования гетероциклических аминов **2, 3**, (*RS*)-**6**, (*R*)-**6**, (*S*)-**6**, (*RS*)-**7**, (*S*)-**7** в присутствии триэтиламина или *N,N*-диэтиланилина в качестве основания. В результате были получены *N*-фталоил-производные **13-16** с выходом 63-87%.



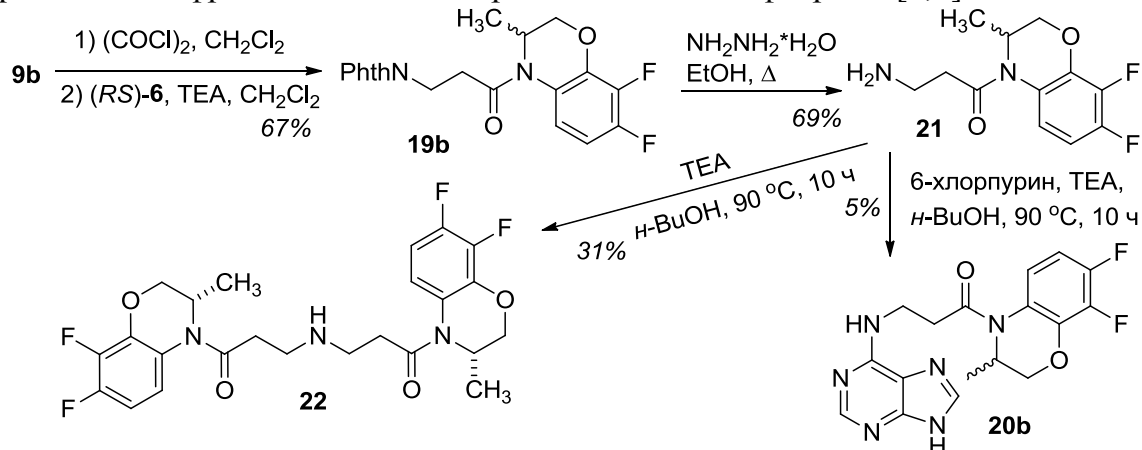
Обработка соединений **13-16** гидразингидратом в кипящем этаноле приводила к удалению *N*-фталоильной группы и образованию соответствующих аминов, последующее взаимодействие которых с 6-хлорпурином в *n*-бутаноле в присутствии триэтиламина приводило к целевым конъюгатам **11, 12**, (*RS*)-**17**, (*R*)-**17**, (*S*)-**17**, (*RS*)-**18**, (*S*)-**18** с выходом 38-46%.



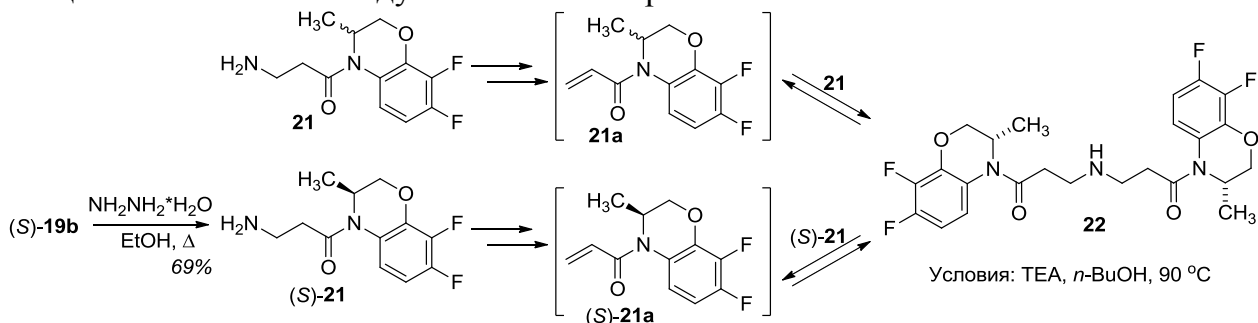
Синтез целевых конъюгатов осуществлялся исходя из энантимерно чистых аминов (*R*)-**6**, (*S*)-**6**, (*S*)-**7**, поэтому особое внимание было уделено анализу энантимерного состава промежуточных *N*-фталоил-производных (*R*)-**15**, (*S*)-**15**, (*S*)-**16** и конъюгатов пурина (*R*)-**17**, (*S*)-**17**, (*S*)-**18**. Были найдены условия разделения энантимеров *N*-фталоил-производных (*RS*)-**15** и (*RS*)-**16** методом нормально-фазовой ВЭЖХ на хиральной неподвижной фазе (колонка Chiralcel ODH, элюент гексан-изопропанол 5 : 1). Анализ соединений (*R*)-**15**, (*S*)-**15**, (*S*)-**16** в этих условиях показал их энантимерную чистоту. Это подтверждает, что ацилирование аминов (*R*)-**6**, (*S*)-**6**, (*S*)-**7** хлорангидридом 6-фталимидогексановой кислоты в присутствии *N,N*-диэтиланилина не сопровождается рацемизацией.

Для разделения смесей энантимеров рацемических производных пурина (*RS*)-**17** и (*RS*)-**18** применяли обращенно-фазовую ВЭЖХ на хиральной неподвижной фазе (колонка (*S,S*)-Whelk-O1, элюент метанол-вода 8 : 2). В этих условиях была показана энантимерная чистота соединений (*R*)-**17**, (*S*)-**17** (рисунок 1), (*S*)-**18**. Это указывает

нуклеофильного замещения хлора в 6-хлорпурине происходило образование большого количества побочных продуктов, поэтому соединение **20b** было получено с выходом около 5%. По-видимому, (*RS*)-4-(3-аминопропаноил)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазин **21**, образующийся при удалении фталоильной группы соединения **19b**, в условиях реакции (триэтиламин, *n*-бутанол, 90 °С) претерпевает дополнительные превращения, конкурирующие с процессом нуклеофильного замещения. Проведение модельной реакции показало, что в этих условиях в отсутствие 6-хлорпурина соединение **21** образует конъюгат **22**, содержащий два фрагмента 3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазина.



Известно, что соединения, содержащие, как и конъюгат **22**, дипропаноиламино [-C(O)CH₂CH₂-HN-CH₂CH₂C(O)-] фрагмент, можно рассматривать как продукты реакции аза-Михаэля, где в качестве донора электронной пары выступает соединение с 3-аминопропаноильным фрагментом, а в качестве акцептора – соответствующий акрилат. По-видимому, в *n*-бутаноле в присутствии триэтиламина соединение **21** претерпевает превращения, приводящие к образованию акрилата **21a**. Продуктом реакции аза-Михаэля между амином **21** и акрилатом **21a** является конъюгат **22**.



В ¹H ЯМР спектре, записанном через 20 ч после нагревания раствора соединения **22** в ДМСО-*d*₆ до 100 °С, наблюдаются сигналы, характерные для протонов винильной группы (рисунок 2), что свидетельствует об образовании соединения **21a** и, следовательно, об обратимости реакции аза-Михаэля.

Следует подчеркнуть, что превращение соединения **21** протекает стереоселективно с образованием (*S*^{*},*S*^{*})-диастереомера **22**. Такой вывод был сделан на основании того, что ¹H и ¹⁹F ЯМР спектры соединения **22**, полученного как из рацемата **21**, так и из энантиомерно чистого амина (*S*)-**21**, идентичны друг другу и содержат единственный набор сигналов. По-видимому, стереоселективность превращения соединения **21** обеспечивается обратимостью процесса: (*S*^{*},*S*^{*})-диастереомер, образование которого термодинамически более выгодно, накапливается в реакционной смеси, в то время как (*R*^{*},*S*^{*})-диастереомер претерпевает обратную реакцию аза-Михаэля с образованием исходных соединений.

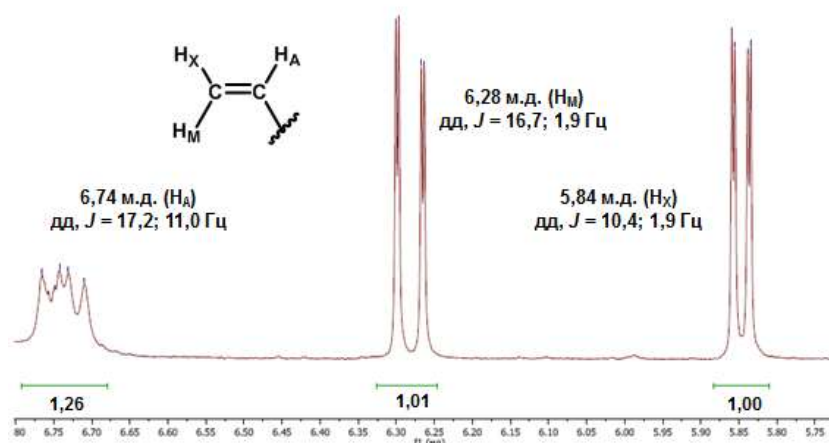
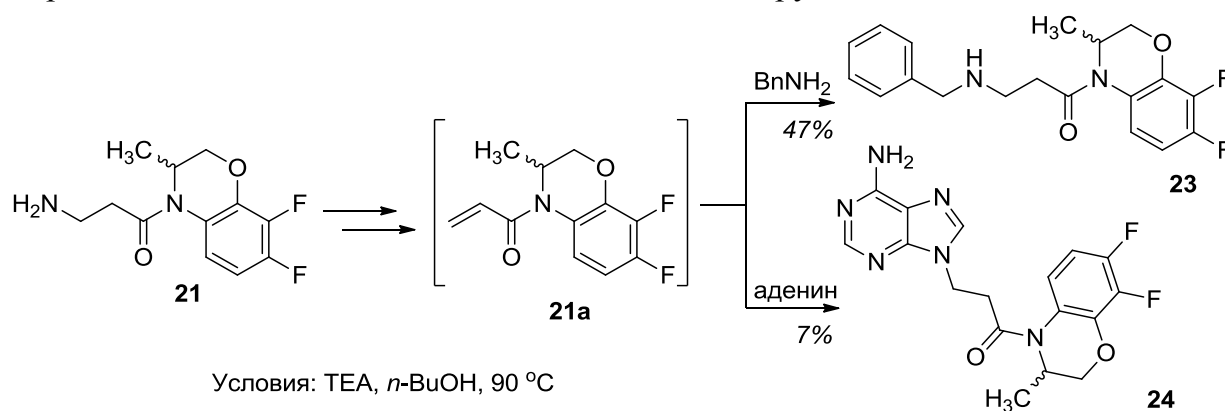
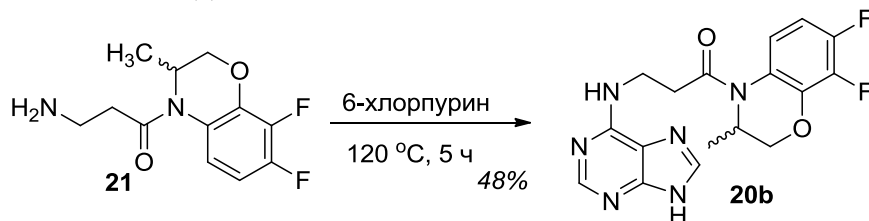


Рисунок 2 – Фрагмент ^1H ЯМР спектра соединения **22** через 20 ч после нагрева до $100\text{ }^\circ\text{C}$ (500 МГц, ДМСО- d_6)

Предложенный механизм подтверждается тем, что взаимодействие соединения **21** с другими нуклеофилами приводит к соответствующим продуктам реакции аза-Михаэля. Так, взаимодействие соединения **21** с бензиламином приводит к продукту **23**, при этом образования конъюгата **22** не происходит. По-видимому, отсутствие в реакционной смеси соединения **22** связано с тем, что аминогруппа бензиламина обладает большей нуклеофильностью, чем аминогруппа соединения **21**. Попытка получения целевого конъюгата **20b** путем взаимодействия амина **21** с аденином привела к образованию N^9 -замещенного продукта **24** с выходом 7%. Полученный результат согласуется с литературными данными, согласно которым акцепторы Михаэля взаимодействуют с центром аденина $N^9\text{H}$, а не с экзоциклической аминогруппой.

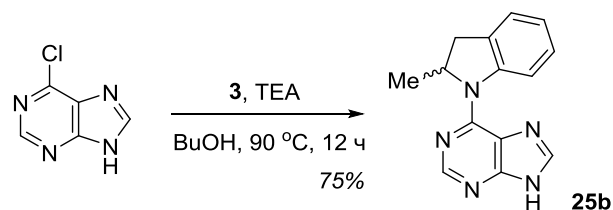


В результате варьирования условий синтеза целевого конъюгата **20b** был найден альтернативный подход, основанный на проведении нуклеофильного замещения при $120\text{ }^\circ\text{C}$ в отсутствие основания и растворителя. Соединение **20b** было выделено с удовлетворительным выходом 48%.



2.2.4 Синтез конъюгатов пурина с гетероциклическими аминами, не содержащих линкерного фрагмента

Конъюгаты **25a-e**, в которых фрагмент пурина непосредственно связан с остатком гетероциклического амина, были получены в результате нуклеофильного замещения хлора в 6-хлорпурине соответствующими аминами. В *n*-бутаноле в присутствии триэтиламина было получено соединение **25b** – производное 2-метилиндолина (**3**), при этом менее нуклеофильные гетероциклические амины **4** и (*RS*)-**6** оказались нереакционноспособными в этих условиях.



Известно, что взаимодействие 6-галогензамещенных нуклеозидов со слабыми нуклеофилами эффективно протекает в условиях кислотного катализа. В присутствии серной кислоты были получены соединения **25a-e**, также для сравнительного изучения реакционной способности 6-хлорпурина и 2-амино-6-хлорпурина были синтезированы производные 2-аминопурина **26a-e**. Синтез соединений **25a-e** и **26a-e** проводили в присутствии 0,9 экв. серной кислоты, в соответствии с литературной методикой, предложенной для синтеза 2-замещенных пиримидинов. Учитывая, что гетероциклические амины **2-6** обладают меньшей основностью (pK_a 3,75–5,26) по сравнению с 6-хлорпурином (pK_a 7,68), а также что введение 2-аминогруппы в пуриновый цикл способствует увеличению основности (pK_a пурина 8,93; pK_a 2-аминопурина 9,93), мы предположили, что в этих условиях замещенных пуринов будет находиться в протонированной форме, а гетероциклический амин будет находиться в свободной форме.

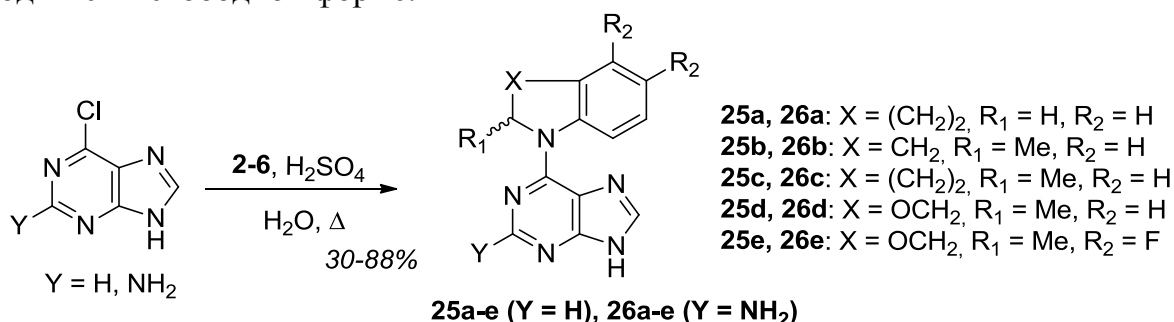


Таблица 1 – Выходы соединений **25a-e** и **26a-e** в условиях кислотного катализа

Исходный амин	Производные пурина			Производные 2-аминопурина		
	Продукт	H ₂ SO ₄ , экв.	Выход, %	Продукт	H ₂ SO ₄ , экв.	Выход, %
2	25a	0,5	48	26a	0,9	62
3	25b	0,9	91	26b	0,9	88
4	25c	0,5	12	26c	0,9	34
5	25d	0,5	17	26d	0,9	38
(<i>RS</i>)- 6	(<i>RS</i>)- 25e	0,5	10	26e	0,9	30

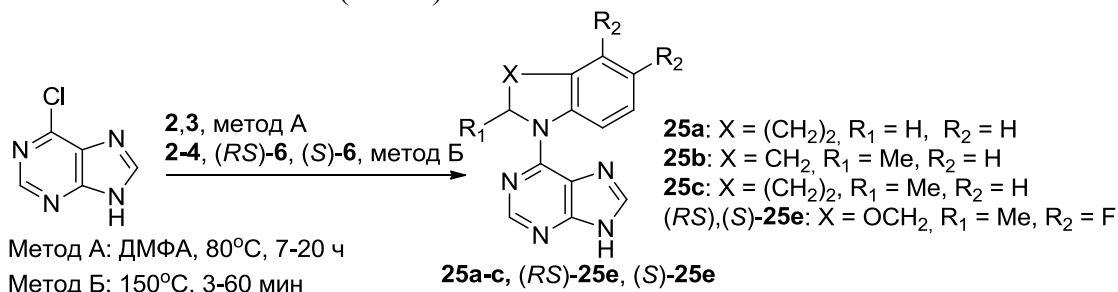
Соединения **25b** и **26b**, производные 2-метилиндолина (**3**), обладающего высокой нуклеофильностью, получены в присутствии 0,9 экв серной кислоты с высоким выходом (88-91%) (таблица 1). Выходы конъюгатов 2-аминопурина с другими гетероциклическими аминами **26a,c-e** в этих условиях составляли 30-62%, в то время как производные пурина **25a,c-e** были получены с низкими выходами (< 10%). По-видимому, это связано с ацидофобностью исходного 6-хлорпурина: известно, что производные пурина, не содержащие заместителей в положении C², в кислой среде подвергаются разложению с раскрытием пиримидинового или

имидазольного циклов. Синтез соединений **25a,c,e** проводили в присутствии 0,5 экв. серной кислоты, выходы составили 10-48% (таблица 1).

По-видимому, более высокие выходы соединений **26a,c,e** по сравнению с соединениями **25a,c,e** связаны с тем, что 2-амино-6-хлорпурин легче, чем 6-хлорпурин, подвергается протонированию в условиях кислотного катализа, соответственно, является более электрон-дефицитным и более склонным к взаимодействию с нуклеофилами. Это предположение подтверждается

расчетными данными, полученными в лаборатории асимметрического синтеза ИОС УрО РАН. С применением методов DFT (DFT-D3-gCP, B3LYP/def2-TZVP) были определены величины эффективных зарядов атомов азота в молекулах 6-хлор-9H-пурина, 6-хлор-7H-пурина, 2-амино-6-хлор-9H-пурина, 2-амино-6-хлор-7H-пурина в газовой фазе (рисунок 3). Показано, что наименьшим значением эффективного заряда (-0,24 – -0,26) в молекулах $N^9 \leftrightarrow N^7$ таутомеров 6-хлорпурина характеризуются атомы N^7 и N^9 имидазольного цикла, в случае 2-амино-6-хлорпурина наименьшим эффективным зарядом (-0,41) обладает атом азота экзоциклической аминогруппы C^2-NH_2 . Анализ этих данных позволяет предположить, что 2-амино-6-хлорпурин в условиях кислотного катализа подвергается протонированию по аминогруппе C^2-NH_2 , характеризующейся большей электронной плотностью по сравнению с пуриновыми атомами азота. Наличие экзоциклической аминогруппы C^2-NH_2 способствует тому, что 2-амино-6-хлорпурин более склонен к протонированию, чем 6-хлорпурин.

Для синтеза производных пурина **25a,c,e** были применены альтернативные подходы, поскольку в условиях кислотного катализа эти соединения были получены с низким выходом. Известно, что нуклеофильное замещение по механизму присоединения–отщепления (S_NAE) с наибольшей скоростью протекает в полярных апротонных растворителях, стабилизирующих переходный σ -аддукт. Синтез целевых соединений проводили в ДМФА при 80 °С (метод А), а также без растворителя при 150 °С (метод Б), в последнем случае роль полярного апротонного растворителя выполнял взятый в избытке (3 экв.) амин.



Выходы соединений **25a,c,e**, полученных по методам А и Б, приведены в таблице 2. Для соединения **(RS)-25e** были найдены условия разделения энантиомеров на хиральной неподвижной фазе, что позволило подтвердить энантиомерную чистоту конъюгата **(S)-25e**. На данном примере показано, что нуклеофильное замещение хлора в 6-хлорпурине гетероциклическими аминами в отсутствие растворителя при 150 °С не сопровождается рацемизацией.

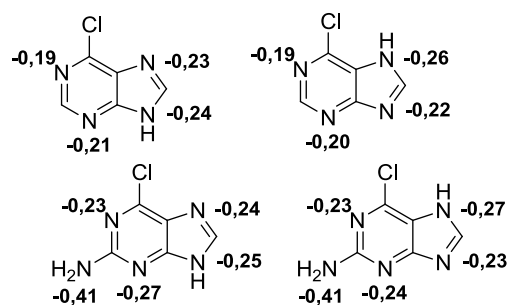


Рисунок 3 – Значения эффективных зарядов атомов азота в молекулах $N^9 \leftrightarrow N^7$ таутомеров 6-хлорпурина и 2-амино-6-хлорпурина

Таблица 2 – Выходы соединений **25a-c**, (*RS*)-**25e**, (*S*)-**25e**, полученных методами А и Б

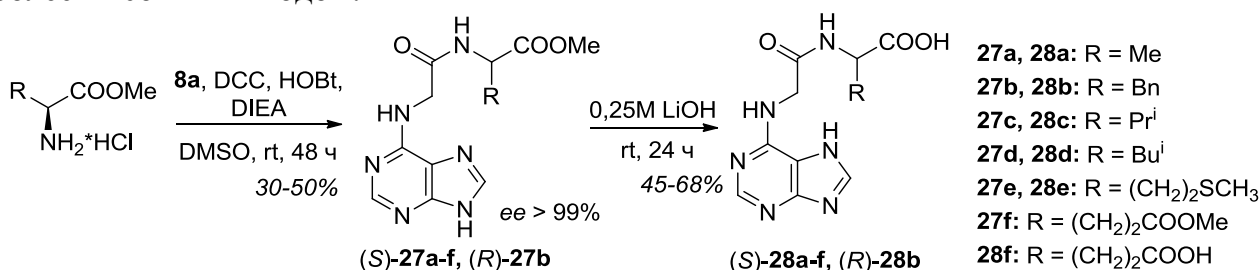
Исходный амин	Продукт	Метод А		Метод Б	
		Время синтеза, ч	Выход, %	Время синтеза, мин	Выход, %
2	25a	20	34	30	48
3	25b	7	91	3	48
4	25c	20	0	60	22
(<i>RS</i>)- 6	(<i>RS</i>)- 25e	–	–	30	20
(<i>S</i>)- 6	(<i>S</i>)- 25e	–	–	30	23

Следует отметить, что попытки синтезировать производные 2-аминопурина по методу Б оказались неудачными. Вероятно, это связано с тем, что наличие непротонированной донорной аминогруппы в пуриновом цикле отрицательно влияет на его способность к взаимодействию с нуклеофилами.

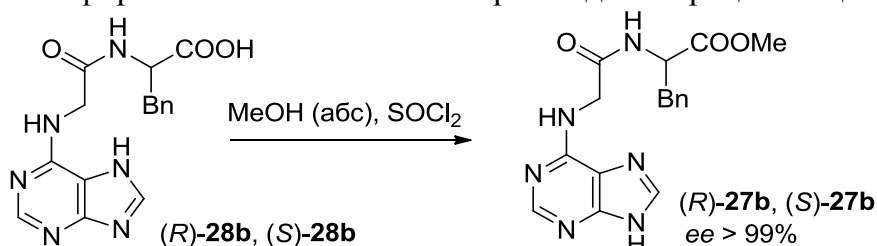
2.3 Синтез конъюгатов пурина с аминокислотами и дипептидами

2.3.1 Синтез *N*-(пурин-6-ил)глицил дипептидов

В результате исследования антимикобактериальной активности *N*-(пурин-6-ил)- ω -аминокислот **8a-d**, проведенного впервые нами, установлено, что производное глицина **8a** проявляет умеренную активность, в то время как соединения **8b-d** не активны в отношении штамма *M. tuberculosis* H37Rv (см. п. 2.4.2). В развитие этих исследований, с целью получения соединений с высокой антимикобактериальной активностью, были синтезированы конъюгаты *N*-(пурин-6-ил)глицина **8a** с остатками природных аминокислот. Конденсация соединения **8a** с метиловыми эфирами различных (*S*)-аминокислот (аланин, фенилаланин, валин, лейцин, метионин, глутаминовая кислота) в присутствии DCC, HOBT и DIEA приводила к конъюгатам (*S*)-**27a-f**, в результате щелочного гидролиза сложноэфирных групп получали *N*-(пурин-6-ил)глицил дипептиды (*S*)-**28a-f**. Следует отметить, что синтез производного аланина (*S*)-**27a** ранее был описан в литературе, однако предложенный нами подход является более эффективным и позволяет получать это соединение с более высоким выходом.



Для анализа энантиомерного состава полученных соединений были синтезированы производные (*R*)-фенилаланина (*R*)-**27b** и (*R*)-**28b**, найдены условия разделения соединений (*R*)-**27b** и (*S*)-**27b** на хиральной неподвижной фазе, доказана их энантиомерная чистота. Это свидетельствует о том, что конденсация соединения **8a** с метиловыми эфирами аминокислот не сопровождается рацемизацией.



Найти условия разделения продуктов гидролиза (*R*)-**28b** и (*S*)-**28b** не удалось, поэтому их анализ был проведен после предколонной дериватизации с

образованием эфиров (*R*)-**27b** и (*S*)-**27b**. Энантиомерная чистота этих соединений указывает на то, что щелочной гидролиз сложноэфирных групп также не сопровождается рацемизацией.

Для однозначного подтверждения строения *N*-(пурин-6-ил)дипептидов на примере производного валина (*S*)-**27c** были проведены дополнительные ЯМР-эксперименты. Данные 2D ^1H - ^{13}C HSQC/HMBC ЯМР спектроскопии позволили однозначно отнести сигналы ядер ^1H и ^{13}C .

Поскольку в ^1H ЯМР спектрах соединений (*S*)-**27a-f** наблюдали двойной набор сигналов (соотношение 9 : 1), соответствующих C^2H , C^8H и NH протонам пуринового цикла, а также протонам пептидных NH групп, были зарегистрированы ^1H ЯМР спектры соединения (*S*)-**27c** при 27, 57, 77, 97 и 127 °C (DNMR-эксперимент, рисунок 4).

При повышении температуры наблюдали постепенное слияние двойных сигналов, что, вероятно, связано с увеличением скорости протонного обмена между таутомерами N^9H и N^7H имидазольного цикла. Соединения (*S*)-**27a-f** можно рассматривать как производные аденина, $\text{N}^9\text{H} \leftrightarrow \text{N}^7\text{H}$ таутомерия которого подробно изучена и описана в ряде публикаций. Известно, что в полярных растворителях (вода, ДМСО) аденин существует в виде двух таутомеров, причем существенно преобладает N^9H форма (78-85%). По-видимому, в растворах *N*-(пурин-6-ил)дипептидов (*S*)-**27a-f** в ДМСО также в большей степени присутствует N^9H таутомер (~90%).

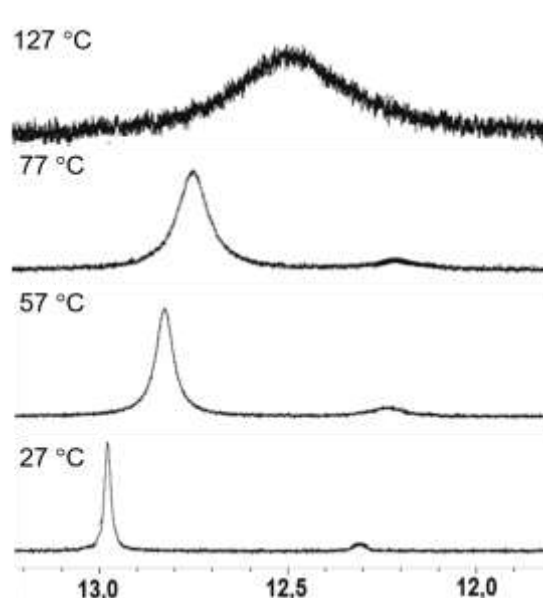


Рисунок 4 – Фрагменты ^1H ЯМР спектров ($\text{N}^7\text{H} \leftrightarrow \text{N}^9\text{H}$) соединения (*S*)-**27c** при 27, 57, 77, 127 °C (DNMR, 500 МГц, ДМСО- d_6)

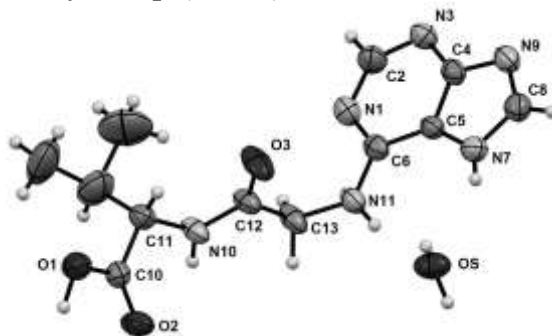


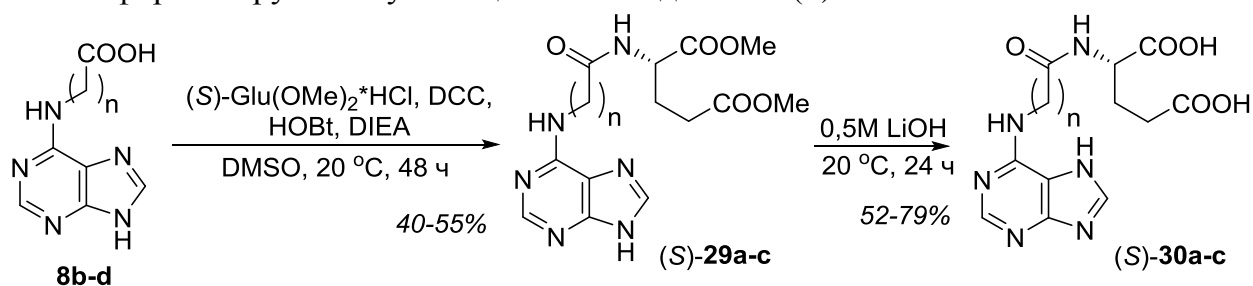
Рисунок 5 – Структура соединения (*S*)-**28c** по данным РСА

В ^1H ЯМР спектрах соединений (*S*)-**28a-f**, содержащих свободную карбоксильную группу, наблюдали единственный набор сигналов, что указывает на существование этих соединений в виде одного таутомера. Согласно данным РСА производного валина (*S*)-**28c**, в кристаллической форме это соединение представляет собой N^7H таутомер (рисунок 5). Наличие кристаллизационной воды, участвующей в образовании системы водородных связей, подтверждено данными элементного анализа. Полученные с применением РСА данные о структуре водородных связей в кристаллической решетке соединения (*S*)-**28c** согласуются с представленными в литературе сведениями о строении кристалла *N*-(пурин-6-ил)глицилглицина **8e**.

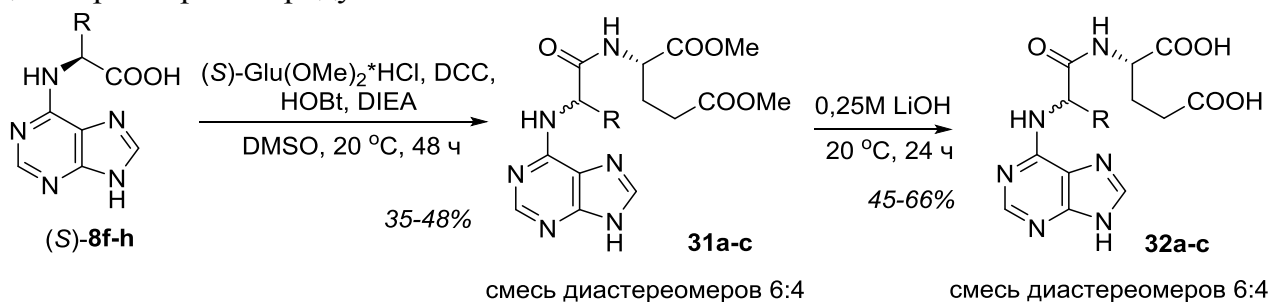
2.3.2 Синтез конъюгатов пурина с (*S*)-глутаминовой кислотой – структурных аналогов *N*-(пурин-6-ил)глицил-(*S*)-глутаминовой кислоты

Исследование биологической активности полученных *N*-(пурин-6-ил)дипептидов показало, что производное глутаминовой кислоты (*S*)-**28f** проявляет высокую антимикобактериальную активность, в том числе в отношении штамма с множественной лекарственной устойчивостью (см. п. 2.4.2). В связи с этим, представлял интерес синтез и исследование его структурных аналогов, содержащих вместо глицинового фрагмента остатки различных α - и ω -аминокислот.

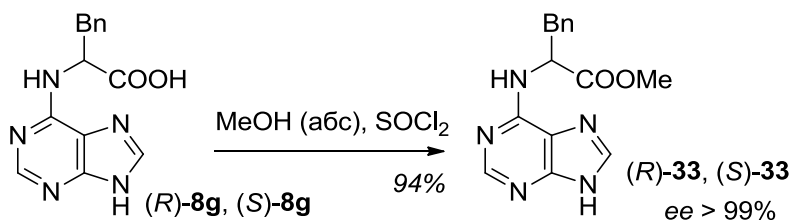
Производные ω -аминокислот (*S*)-**30a-c** были синтезированы по аналогии с производным глицина (*S*)-**28f**. В качестве исходных соединений были использованы *N*-(пурин-6-ил)- ω -аминокислоты **8b-d**, конденсация которых с диметилowym эфиром (*S*)-глутаминовой кислоты в ДМСО в присутствии DCC, HOBT и DIEA приводила к продуктам (*S*)-**29a-c**. В результате последующего щелочного гидролиза сложноэфирных групп получали целевые соединения (*S*)-**30a-c**.



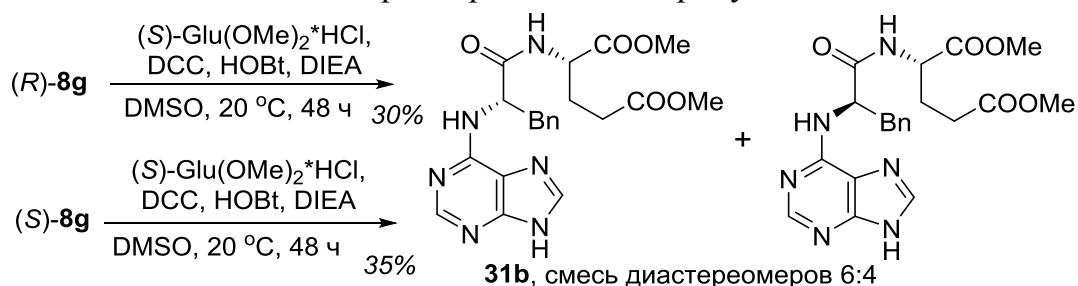
Конъюгаты **32a-c**, в которых фрагмент (*S*)-глутаминовой кислоты присоединен к пуриновому ядру через остаток α -аминокислоты, были получены исходя из *N*-(пурин-6-ил)- α -аминокислот (*S*)-**8f-h**, по аналогии с производным глицина (*S*)-**28f**. Конденсация соединений (*S*)-**8f-h** с диметилowym эфиром (*S*)-глутаминовой кислоты в присутствии DCC, HOBT и DIEA приводила к продуктам **31a-c**, в результате щелочного гидролиза сложноэфирных групп происходило образование конъюгатов **32a-c**. В ^1H ЯМР спектрах соединений **31a-c** и **32a-c** наблюдали двойной набор сигналов в соотношении 6:4, что, по нашим предположениям, было связано с рацемизацией одного из хиральных центров в ходе синтеза и образованием диастереомерных продуктов.



В литературе описан синтез соединений (*R*)-**8f** и (*S*)-**8f**, однако, не приведено доказательств их энантиомерной чистоты. Чтобы установить, происходит ли в условиях получения *N*-(пурин-6-ил)- α -аминокислот рацемизация хирального центра, исходя из производных фенилаланина (*R*)-**8g** и (*S*)-**8g** были получены метиловые эфиры (*R*)-**33** и (*S*)-**33** и методом ВЭЖХ была установлена их энантиомерная чистота.

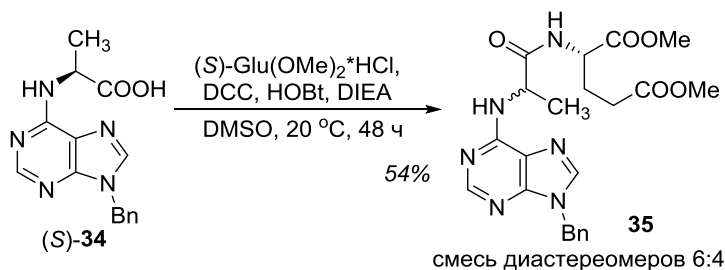


Для подтверждения того, что рацемизация происходит на стадии конденсации в присутствии DCC, методом ВЭЖХ были найдены условия разделения диастереомерной смеси **31b**, продукта взаимодействия производного (*S*)-фенилаланина (*S*-**8g**) и диметилового эфира (*S*)-глутаминовой кислоты. С использованием ВЭЖХ в аналогичных условиях разделения было установлено, что конденсация производного (*R*)-фенилаланина (*R*-**8g**) с диметиловым эфиром (*S*)-глутаминовой кислоты приводит к образованию точно такой же смеси диастереомеров в соотношении 6 : 4 (**31b**). Это доказывает, что конденсация *N*-(пурин-6-ил)- α -аминокислот с диметиловым эфиром (*S*)-глутаминовой кислоты в присутствии DCC сопровождается рацемизацией, причем стереоконфигурация карбоксильной компоненты не влияет на диастереомерный состав продукта.

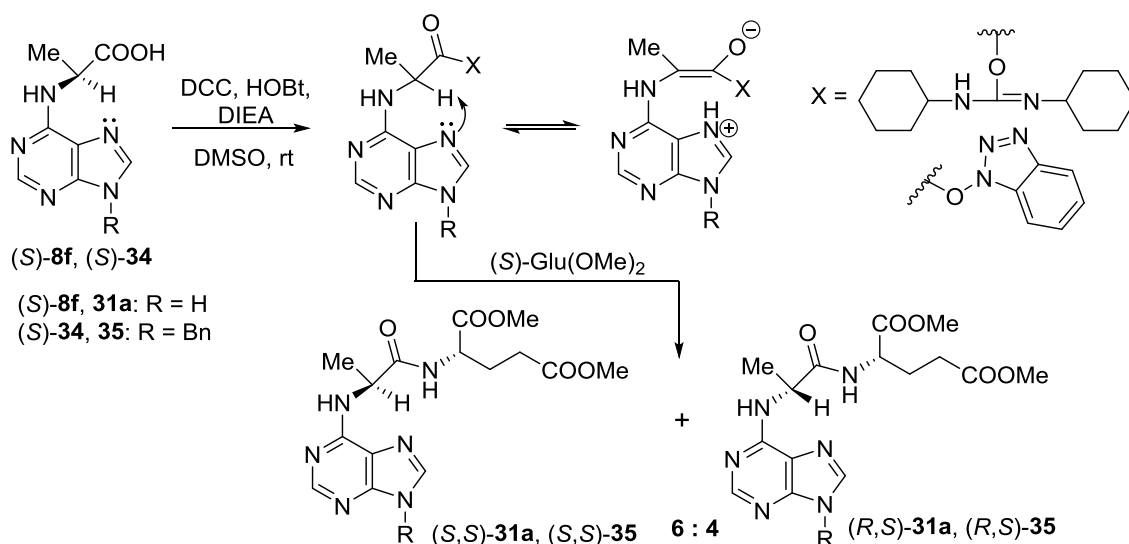


На примере соединений (*R*)-**27b** и (*S*)-**27b** показано, что конденсация ахирального соединения **8a** с метиловым эфиром (*R*)- или (*S*)-фенилаланина не приводит к рацемизации хирального центра аминокомпоненты. Следовательно, при конденсации соединений (*S*)-**8f-h** и (*R*)-**8g** с диметиловым эфиром (*S*)-глутаминовой кислоты в аналогичных условиях происходит рацемизация хирального центра не amino-, а карбоксильной компоненты.

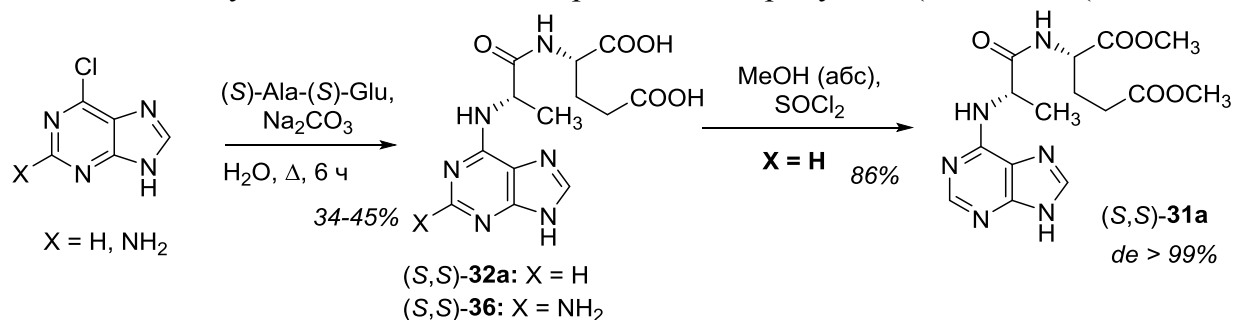
В качестве структурного аналога *N*-(пурин-6-ил)- α -аминокислот (*S*)-**8f-h** можно рассматривать (*S*)-гистидин, имидазолзамещенную аминокислоту. Известно, что активация карбоксильной группы гистидина (как незащищенного, так и *N*^c-защищенного) карбодиимидами сопровождается рацемизацией.



Вероятно, рацемизация хирального центра соединений (*S*)-**8f-h** происходит при активации карбоксильной группы DCC по аналогии с гистидином. Для подтверждения того, что наличие заместителя в положении *N*⁹ не препятствует рацемизации, нами было показано, что конденсация *N*-(9-бензилпурин-6-ил)-(*S*)-аланина (*S*)-**34** с диметиловым эфиром (*S*)-глутаминовой кислоты приводит к смеси диастереомеров в соотношении 6 : 4. На примере производных (*S*)-аланина (*S*)-**8f** и (*S*)-**34** показан возможный механизм рацемизации, протекающей с участием атома *N*⁷ пуринового цикла через образование промежуточного неопределённого соединения.



На примере производного (*S*)-аланина нами показана возможность получения целевых конъюгатов пурина с (*S*)-глутаминовой кислотой в диастеремерно чистом виде. Нуклеофильное замещение хлора в 6-хлорпурине или в 2-амино-6-хлорпурине (*S*)-аланил-(*S*)-глутаминовой кислотой приводило к продуктам (*S,S*)-32a и (*S,S*)-36.



Для анализа диастереомерного состава продукта (*S,S*)-32a была проведена его предколоночная дериватизация с образованием диметилового эфира (*S,S*)-31a и показана его диастереомерная чистота. Доказано, что на стадии нуклеофильного замещения не происходит рацемизации хиральных центров (*S*)-аланил-(*S*)-глутаминовой кислоты.

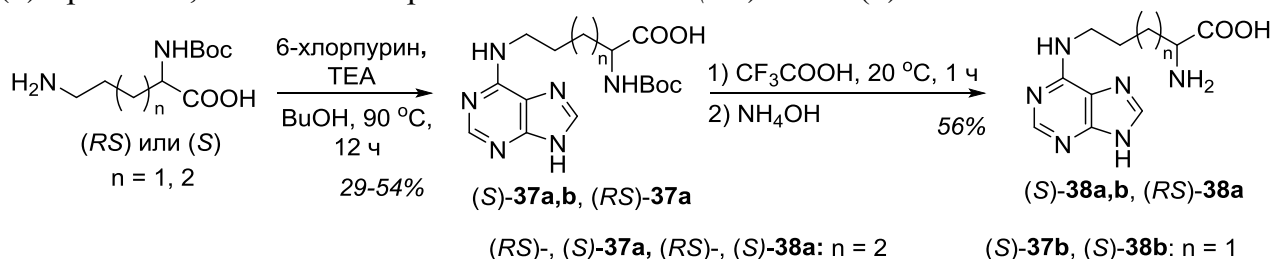
На основе разработанного метода анализа установлено, что в смеси диастереомеров 31a преобладает соединение (*S,S*)-31a. Следовательно, при рацемизации хирального центра соединения (*S*)-8f преимущественно образуется (*S,S*)-диастереомер.

2.3.3 Синтез конъюгатов пурина с диаминокислотами

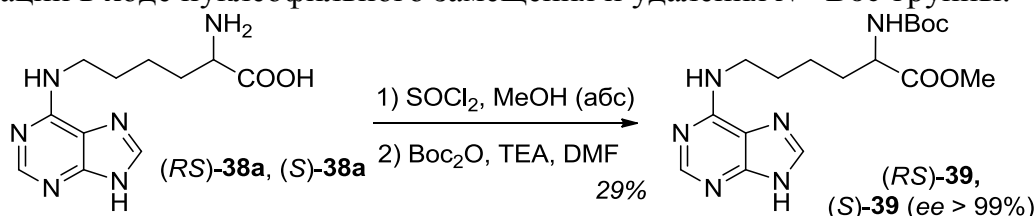
Известно, что производные диаминокислот, содержащие в своей структуре незамещенные α-амино- и карбоксильную группы, способны преодолевать клеточные мембраны посредством специфических белков-переносчиков, что обуславливает активный транспорт и, в некоторых случаях, селективность действия таких соединений. В связи с этим, модификация пурина и его производных остатками (*S*)-лизина и (*S*)-орнитина, содержащих незамещенный α-аминокислотный фрагмент, представляет особый интерес.

В литературе описан подход к получению *N*^ε-(пурин-6-ил)-(*S*)-лизина (*S*)-38a, основанный на взаимодействии 6-хлорпурина с незащищенным (*S*)-лизином. Попытка воспроизвести этот метод привела к сложной смеси соединений, выделить целевой продукт не удалось. Поэтому для синтеза целевого соединения (*S*)-38a был применен подход, основанный на использовании *N*^α-защищенного лизина. Нуклеофильное замещение хлора в 6-хлорпурине *N*^α-Вос-(*S*)-лизином в *n*-бутаноле в присутствии триэтиламина приводило к конъюгату (*S*)-37a с выходом 54%. В ходе последующего

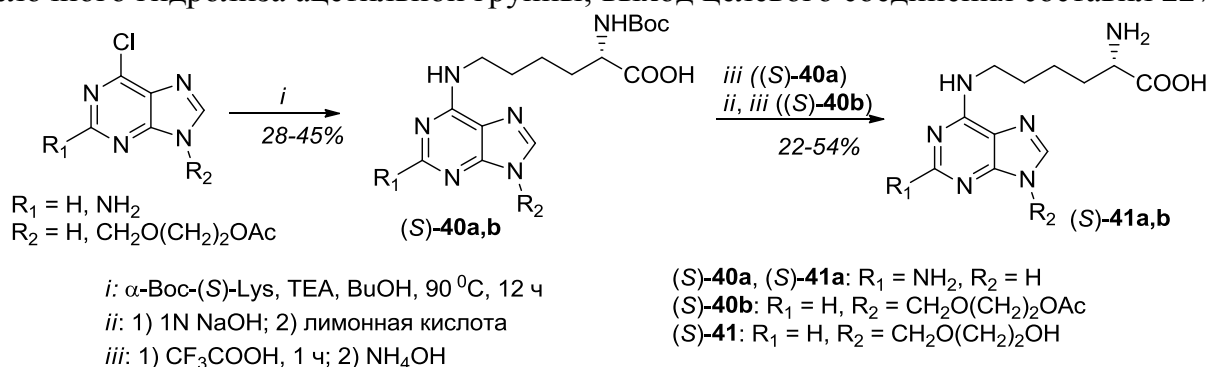
удаления N^α -Вос группы в трифторуксусной кислоте происходило образование целевого продукта (*S*)-**38a**. Аналогично, исходя из N^α -Вос-(*RS*)-лизина или N^α -Вос-(*S*)-орнитина, были синтезированы конъюгаты (*RS*)-**38a** и (*S*)-**38b**.



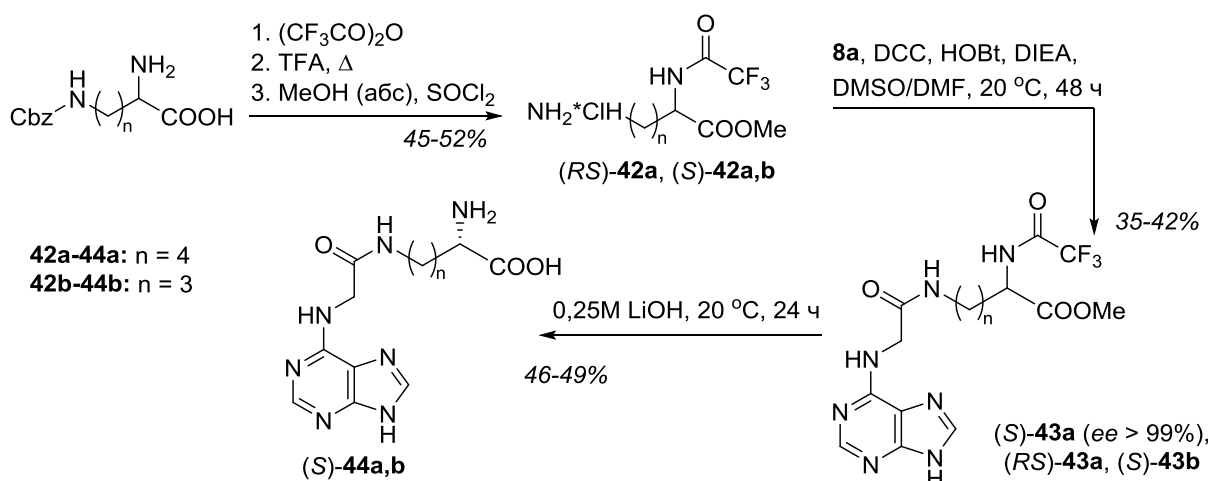
Для определения энантиомерного состава N^6 -(пурин-6-ил)-(*S*)-лизина (*S*)-**38a**, была проведена предколоночная дериватизация этого соединения и рацемата (*RS*)-**38a** с образованием конъюгатов (*S*)-**39** и (*RS*)-**39** и проведено разделение (*R*)- и (*S*)-энантиомеров методом ВЭЖХ на хиральной неподвижной фазе. Установлена энантиомерная чистота соединения (*S*)-**39**, что свидетельствует об отсутствии рацемизации в ходе нуклеофильного замещения и удаления N^α -Вос-группы.



Подход, основанный на использовании N^α -Вос защитной группы, был применен для синтеза производных замещенного пурина, содержащих фрагмент (*S*)-лизина (*S*)-**41a,b**. В качестве исходных соединений были использованы 2-амино-6-хлорпурин и 9-(2-ацетоксиэтоксиметил)-6-хлорпурин. Нуклеофильное замещение хлора N^α -Вос-(*S*)-лизином приводило к промежуточным соединениям (*S*)-**40a,b** с выходом 28-45%. В результате удаления N^α -Вос группы соединения (*S*)-**40a** получали целевой продукт (*S*)-**41a** с выходом 54%. Синтез конъюгата (*S*)-**41b**, содержащего в положении N^9 (2-гидроксиэтокс)метильный фрагмент, включал дополнительную стадию щелочного гидролиза ацетильной группы; выход целевого соединения составил 22%.



N-(Пурин-6-ил)глицил-производные (*S*)-**44a,b** были синтезированы по аналогии с дипептидами (*S*)-**28a-f**. В качестве исходных соединений применяли метиловые эфиры α -трифторацетил лизина и орнитина (*RS*)-**42a**, (*S*)-**42a,b**, полученные по оригинальной методике исходя из соответствующих N^ω -Cbz производных путем последовательной обработки трифторуксусным ангидридом, кипящей трифторуксусной кислотой, тионилхлоридом в абсолютном метаноле и хроматографической очистки. Конденсация *N*-(пурин-6-ил)глицина **8a** с производными (*RS*)-**42a**, (*S*)-**42a,b** в присутствии DCC, HOBT, DIEA приводила к продуктам (*RS*)-**43a**, (*S*)-**43a,b**.



На хиральной неподвижной фазе были подобраны условия разделения энантиомеров $(RS)\text{-43a}$ и показана энантиомерная чистота соединения $(S)\text{-43a}$. Следовательно, синтез производных $(S)\text{-42a,b}$ и их последующая конденсация с соединением **8a** не сопровождаются рацемизацией. Щелочной гидролиз сложноэфирной и трифторацетильной групп соединений $(S)\text{-43a,b}$ приводил к продуктам $(S)\text{-44a,b}$. Отсутствие рацемизации в этих условиях показано на примере производных фенилаланина $(R)\text{-28b}$ и $(S)\text{-28b}$.

2.4 Исследование биологической активности полученных соединений

2.4.1 Исследование противовирусной активности полученных соединений

Изучение противовирусной активности полученных соединений проводилось в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (г. Москва)¹. Была исследована активность 16 соединений в отношении вируса простого герпеса: эталонного штамма ВПГ-1/ L_2 и ацикловир-резистентного штамма ВПГ-1/ L_2/R , в клетках Vero E6. В качестве препаратов сравнения использовали ацикловир и рибавирин.

Среди конъюгатов пурина с гетероциклическими аминами, содержащих в качестве линкера фрагмент 6-аминогексановой кислоты, значительную активность проявили производные 3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2H-[1,4]бензоксазина $(RS)\text{-17}$, $(R)\text{-17}$, $(S)\text{-17}$. Значения химико-терапевтического индекса (ХТИ) этих соединений составляли соответственно 32, 17, 63, что указывает на высокую ингибирующую активность в отношении вируса герпеса в сочетании с низкой цитотоксичностью (таблица 3). Следует отметить, что величина ХТИ наиболее активного соединения $(S)\text{-17}$ в четыре раза выше, чем ХТИ энантиомерного ему соединения $(R)\text{-17}$, что свидетельствует о весьма существенном влиянии стереоконфигурации на биологическую активность.

Установлено, что соединения $(RS)\text{-6}$ и **8d**, которые можно рассматривать в качестве структурных компонентов активного соединения $(RS)\text{-17}$, не проявляют ингибирующей активности в отношении штаммов ВПГ-1. Это означает, что биологические свойства конъюгата $(RS)\text{-17}$ обусловлены не наличием какой-либо одной фармакофорной группы, а сочетанием трех структурных фрагментов: пурина, 6-аминогексановой кислоты и 3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2H-[1,4]бензоксазина.

Уменьшение длины линкерного фрагмента в структуре синтезированных соединений также приводило к потере противовирусной активности по сравнению с соединением $(RS)\text{-17}$. Гомологи **20a-d**, содержащие в своей структуре остатки различных ω -аминокислот (глицина, β -аланина, γ -аминоасляной и 5-амино-

¹ Исследования проводились под руководством д.б.н., проф. Г.А. Галегова и к.б.н. В.Л. Андроновой

пентановой кислот соответственно) характеризуются низкими значениями ХТИ (1,0–4,0). В то же время производное 8-аминооктановой кислоты **20f** с линкерным фрагментом большей длины, проявляет значительную противогерпетическую активность (ХТИ 39). Производное триглицина **20g** неактивно в отношении штаммов ВПГ-1 (ХТИ 1,9), то есть на биологическую активность данных соединений влияет не только длина, но и природа линкерного фрагмента (таблица 3).

Показано, что конъюгаты пурина с лизином и орнитином (*S*)-**37a,b**, (*S*)-**38a,b** не активны в отношении штаммов ВПГ-1 (таблица 3).

Таблица 3 – Цитотоксичность и противовирусная активность полученных соединений

Соединение	ЦД ₅₀ ¹ , мкг/мл	ВПГ-1/L ₂		ВПГ-1/L ₂ /R	
		ИД ₅₀ ² , мкг/мл	ХТИ ³	ИД ₅₀ , мкг/мл	ХТИ
(<i>RS</i>)- 6	268	110	2,4	165	1,6
8d	445	592	<1	592	<1
(<i>RS</i>)- 17	122	3,86	32	3,86	32
(<i>R</i>)- 17	132	7,73	17	7,73	17
(<i>S</i>)- 17	122	1,93	63	1,93	63
(<i>S</i>)- 18	96,6	14,7	6,6	14,7	6,6
20a	214	214	1,0	214	1,0
20b	160	111	1,4	111	1,4
20c	426	231	1,8	231	1,8
20d	474	120	4,0	120	4,0
20f	40,0	1,03	39	1,03	39
20g	1062	563	1,9	563	1,9
(<i>S</i>)- 37a	828	480	1,7	480	1,7
(<i>S</i>)- 37b	580	480	1,2	480	1,2
(<i>S</i>)- 38a	656	656	1,0	656	1,0
(<i>S</i>)- 38b	961	480	2	480	2
ацикловир	>100	0,39	>256	>100	>1
рибавирин	>1000	125	>8	125	>8

Таким образом, среди синтезированных конъюгатов пурина с гетероциклическими аминами были найдены соединения (*RS*)-**17**, (*S*)-**17**, **20f**, проявляющие высокую противогерпетическую активность, в том числе в отношении ацикловир-резистентного штамма, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных терапевтических агентов.

2.4.2 Исследование антимикобактериальной активности полученных соединений

В Уральском научно-исследовательском институте фтизиопульмологии (г. Екатеринбург)⁴ была исследована ингибирующая активность 42 полученных соединений в отношении штамма *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro* методом вертикальной диффузии. В качестве препаратов сравнения применяли изониазид и офлоксацин. Значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) активных соединений приведены в таблице 4.

Среди *N*-(пурин-6-ил)- ω -аминокислот антимикобактериальную активность проявляют производное глицина **8a** и диглицина **8e**, значения минимальной

¹ ЦД₅₀ – концентрация, при которой происходит гибель 50% клеток

² ИД₅₀ – концентрация, при которой ингибируется развитие вирус-индуцированного цитопатического эффекта на 50%

³ ХТИ – химико-терапевтический индекс, вычисляемый как отношение ЦД₅₀/ИД₅₀

⁴ Исследования проводились под руководством к.б.н. М.А. Кравченко

ингибирующей концентрации (МИК) составляют соответственно 6,2 и 3,1 мкг/мл (таблица 4). Соединения **8b-d** не активны в отношении *M. tuberculosis* (МИК 12,5 мкг/мл).

В ряду *N*-(пурин-6-ил)глицил дипептидов значительную активность проявляют производные фенилаланина (*S*)-**27b** и (*S*)-**28b** и глутаминовой кислоты (*S*)-**28f** (МИК 1,5; 3,1; 0,7 мкг/мл соответственно, таблица 4). Показано, что соединения (*S*)-**27b** и (*S*)-**28f** активны также в отношении штаммов *M. avium*, *M. terrae* и в отношении штамма с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), а также проявляют низкую цитотоксичность (МТТ-тест, ЦД₅₀ >50 μМ), что позволяет рассматривать их в качестве перспективных противотуберкулезных агентов. Соединения (*S*)-**27a,c-f**, (*S*)-**28a,c-e** не проявляют антимикобактериальную активность (МИК 12,5 мкг/мл).

Таблица 4 – Антимикобактериальная активность некоторых полученных соединений.

Соединение	МИК ¹ , мкг/мл			
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. avium</i>	<i>M. terrae</i>	Штамм с МЛУ ²
8a	6,2	-	-	-
8e	3,1	-	-	-
(<i>S</i>)- 27b	1,5	1,5	1,5	1,5
(<i>S</i>)- 28b	3,1	-	-	-
(<i>S</i>)- 28f	0,7	0,7	0,7	0,7
32a	3,1	-	-	-
(<i>S,S</i>)- 32a	3,1	-	-	-
32b	6,2	-	-	-
(<i>S</i>)- 38a	6,2	-	-	-
(<i>S</i>)- 41a	6,2	-	-	-
(<i>S</i>)- 42b	6,2	-	-	-
(<i>S</i>)- 43a	6,2	-	-	-
(<i>S</i>)- 44a	6,2	-	-	-
изониазид	0,1	0,1	0,1	-
офлоксацин	0,1	0,1	0,1	0,1

Модификация структуры активного соединения (*S*)-**28f** не привела к увеличению антимикобактериальной активности. Показано, что конъюгаты (*S*)-**29a-c** и (*S*)-**30a-c**, в которых остаток глицина заменен фрагментами различных ω-аминокислот (β-аланина, γ-аминомасляной кислоты, 6-аминогексановой кислоты), не активны в отношении штамма *M. tuberculosis* H37Rv (МИК 12,5 мкг/мл). Таким образом, увеличение длины линкера между фрагментом пурина и остатком (*S*)-глутаминовой кислоты приводит к потере антимикобактериальной активности.

Среди структурных аналогов соединения (*S*)-**28f**, содержащих вместо фрагмента глицина остатки различных α-аминокислот и представляющих собой смеси диастереомеров в соотношении 6:4, значительную активность проявляет производное аланина **32a** (МИК 3,1 мкг/мл), производное фенилаланина **32b** проявляет умеренную активность (МИК 6,2 мкг/мл, таблица 4), а производное валина **32c** неактивно в отношении *M. tuberculosis* H37Rv (МИК 12,5 мкг/мл). Значение МИК диастереомерно чистого производного (*S,S*)-**32a** идентично значению МИК соединения **32a** (таблица 4). На примере конъюгата (*S,S*)-**36** (МИК 12,5 мкг/мл)

¹Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) – минимальная концентрация соединения, необходимая для полного ингибирования роста микобактерий

²Штамм с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) – штамм микобактерий, резистентных по отношению изониазиду и рифампицину

показано, что введение в положение N² пуринового фрагмента соединения (*S,S*)-**32a** аминогруппы приводит к потере активности.

В ряду конъюгатов пурина с диаминокислотами умеренную антимикобактериальную активность проявляют производные лизина (*S*)-**38a**, (*S*)-**41a,b**, (*S*)-**43a**, (*S*)-**44a** (МИК 6,2 мкг/мл, таблица 4), в то время как производные орнитина (*S*)-**38b**, (*S*)-**44b** не активны в отношении *M. tuberculosis* H37Rv (МИК 12,5 мкг/мл).

Показано, что конъюгаты пурина с гетероциклическими аминами (*RS*)-**17**, **20a-d,f,g** не проявляют антимикобактериальную активность (МИК 12,5 мкг/мл).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан подход к синтезу конъюгатов пурина с различными гетероциклическими аминами (в том числе хиральными), содержащих в качестве линкера остаток 6-аминогексановой кислоты. Целевые соединения получены в энантиомерно чистом виде. Синтезированы структурные аналоги 3,4-дигидро-3-метил-4-[6-(пурин-6-иламино)гексаноил]-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазина, содержащие в качестве линкера остатки других ω-аминокислот.
2. Установлено, что 4-(3-аминопропаноил)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазин, претерпевая превращения в соответствующий акрилат, способен вступать в реакцию аза-Михаэля, что было подтверждено реакциями с другими аминами.
3. Получены конъюгаты, в которых фрагмент пурина или 2-аминопурина непосредственно связан с остатком гетероциклического амина. Найдены оптимальные условия нуклеофильного замещения хлора в 6-хлорпурине и 2-амино-6-хлорпурине различными гетероциклическими аминами.
4. Разработан подход к получению энантиомерно чистых *N*-(пурин-6-ил)дипептидов. Получены структурные аналоги *N*-(пурин-6-ил)глицил-(*S*)-глутаминовой кислоты, в которых фрагмент глицина был заменен остатками различных α- и ω-аминокислот.
5. Показано, что конденсация *N*-(пурин-6-ил)-α-аминокислот с диметилловым эфиром (*S*)-глутаминовой кислоты в присутствии *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида сопровождается рацемизацией карбоксильной компоненты с образованием смеси (*S,S*)- и (*R,S*)-диастереомеров. Предложен альтернативный путь синтеза целевых конъюгатов пурина с (*S*)-глутаминовой кислотой в диастереомерно чистом виде.
6. С применением стратегии введения–удаления защитных групп синтезированы новые конъюгаты пурина и *N*-(пурин-6-ил)глицина с диаминокислотами. Целевые соединения получены в энантиомерно чистом виде.
7. Установлено, что конъюгаты пурина с 3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазином, содержащие в качестве линкера остатки 6-аминогексановой и 8-аминооктановой кислот, высокоактивны в отношении вируса простого герпеса, в том числе в отношении ацикловир-резистентного штамма. Показано, что уменьшение длины линкерного фрагмента приводит к потере активности.
8. Выявлено, что *N*-(пурин-6-ил)дипептиды, содержащие фрагменты (*S*)-фенилаланина и (*S*)-глутаминовой кислоты, обладают высокой антимикобактериальной активностью, в том числе в отношении штамма с множественной лекарственной устойчивостью. На примере производного (*S*)-глутаминовой кислоты показано, что замена фрагмента глицина на остатки различных α- и ω-аминокислот приводит к снижению активности.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Описанные в работе подходы к синтезу конъюгатов пурина с аминокислотами и гетероциклическими аминами в

дальнейшем могут быть использованы для получения новых соединений с потенциальной биологической активностью. Найденные закономерности «структура–активность» являются перспективной основой для молекулярного дизайна новых соединений. Представляют интерес впервые изученные химические свойства 4-(3-аминопропаноил)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазина, на основе которого могут быть получены новые продукты реакции аза-Михаэля.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК

1. **Мусияк В.В.** Производные пурина, обладающие противотуберкулезной активностью / Д.А. Груздев, В.В. Мусияк, Г.Л. Левит, В.П. Краснов, В.Н. Чарушин // Успехи химии. 2018. Т. 87. С. 604-618. (1,73 п.л. / 0,35 п.л.) (WOS, Scopus).
2. **Мусияк В.В.** Анализ рацемических конъюгатов пурина с гетероциклическими аминами методом хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии / А.А. Тумашов, Д.А. Груздев, А.Ю. Вигоров, В.В. Мусияк, Е.Н. Чулаков, Г.Л. Левит, В.П. Краснов, В.Н. Чарушин // Известия АН, сер. хим. 2018. С. 1704-1709. (0,69 п.л. / 0,09 п.л.) (РИНЦ).
3. **Musiyak V.V.** Synthesis and antimicrobial activity of N-(2-aminopurin-6-yl) and N-(purin-6-yl) amino acids and dipeptides / V.P. Krasnov, A.Yu. Vigorov, V.V. Musiyak, I.A. Nizova, D.A. Gruzdev, T.V. Matveeva, G.L. Levit, M.A. Kravchenko, S.N. Skornyakov, O.B. Bekker, V.N. Danilenko, V.N. Charushin // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016. V. 26. P. 2645-2648. (0,46 п.л. / 0,04 п.л.) (WOS, Scopus).
4. **Мусияк В.В.** Синтез конъюгатов пурина и 2-аминопурина, содержащих в положении 6 фрагменты гетероциклических аминов / Д.А. Груздев, В.В. Мусияк, Е.Н. Чулаков, Г.Л. Левит, В.П. Краснов // Хим. гетероцикл. соед. 2015. Т. 51. С. 738-744. (0,81 п.л. / 0,16 п.л.) (WOS, Scopus).
5. **Musiyak V.V.** Synthesis of novel purin-6-yl conjugates with heterocyclic amines linked via 6-aminohexanoyl fragment / V.P. Krasnov, D.A. Gruzdev, E.N. Chulakov, A.Yu. Vigorov, V.V. Musiyak, T.V. Matveeva, A.A. Tumashov, G.L. Levit, V.N. Charushin // Mendeleev Commun. 2015. V. 25. P. 412-414. (0,34 п.л. / 0,04 п.л.) (WOS, Scopus).

Патенты

6. **Мусияк В.В.** (3*S*)-4-[6-(Пурин-6-иламино)гексаноил]-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазин и (3*R*)-4-[6-(пурин-6-иламино)гексаноил]-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазин, обладающие противовирусной активностью / В.В. Мусияк, Г.А. Галегов, В.Л. Андропова, В.П. Краснов, Г.Л. Левит, Д.А. Груздев, Е.Н. Чулаков, В.Н. Чарушин // пат. 2644351 Рос. Федерация N 2016144712; заявл. 15.11.2016; опубл. 9.02.2018, Бюл. № 4. 13 с. (1,50 п.л. / 0,3 п.л.)
7. **Мусияк В.В.** N-(2-Аминопурин-6-ил)глицил-(*S*)-глутаминовая кислота, обладающая противотуберкулезной активностью / А.Ю. Вигоров, В.П. Краснов, М.А. Кравченко, С.Н. Скорняков, Г.Л. Левит, В.В. Мусияк, В.Н. Даниленко, О.Б. Беккер, В.Н. Чарушин // пат. 2604068 Рос. Федерация N 2015153145; заявл. 10.12.2015; опубл. 10.12.2016, Бюл. № 34. 6 с. (0,69 п.л. / 0,08 п.л.)
8. **Мусияк В.В.** Амиды N-(2-аминопурин-6-ил)-6-аминокапроновой кислоты, обладающие противоопухолевой активностью, и способ их получения / В.П. Краснов, Д.А. Груздев, Г.Л. Левит, Е.Н. Чулаков, А.Ю. Вигоров, В.Н. Даниленко, В.В. Мусияк, С.А. Вакаров, М.Г. Алексеева // пат. 2599577 Рос. Федерация N 2015101582; заявл. 21.01.2015; опубл. 10.10.2016, Бюл. № 28. 10 с. (1,16 п.л. / 0,13 п.л.)

Тезисы докладов на конференциях

9. **Мусияк В.В.** Синтез и антимикобактериальная активность новых конъюгатов пурина с аминокислотами / В.В. Мусияк, Т.В. Матвеева, Д.А. Груздев, Г.Л. Левит,

В.П. Краснов // V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии. Сборник тезисов (Владикавказ, 10–14 сентября 2018). С. 206. (0,12 п.л. / 0,06 п.л.)

10. **Мусияк В.В.** Синтез новых конъюгатов пурина с 3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазином / О.А. Воздвиженская, В.В. Мусияк, Г.Л. Левит, В.П. Краснов // V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии. Сборник тезисов (Владикавказ, 10–14 сентября 2018). С. 408. (0,12 п.л. / 0,06 п.л.)

11. **Мусияк В.В.** Синтез и биологическая активность конъюгатов пурина / В.П. Краснов, Г.Л. Левит, Д.А. Груздев, А.Ю. Вигоров, И.А. Низова, В.В. Мусияк, Е.Н. Чулаков, В.Н. Чарушин // V Всероссийская конференция с международным участием «Енамины в органическом синтезе». Сборник тезисов докладов. (Пермь, 23-26 октября 2017). С. 14. (0,12 п.л. / 0,06 п.л.)

12. **Musiyak V.V.** Synthesis and antiviral activity of novel purine and 2-aminopurine conjugates with chiral heterocyclic amines / V. Musiyak, D. Gruzdev, E. Chulakov, A. Vigorov, O. Vozdvizhenskaya, G. Galegov, V. Andronova, G. Levit, V. Krasnov // MedChem Russia 2017. Abstract book. (Kazan, Russia, September 28 - October 03, 2017). P. 28. (0,12 п.л. / 0,06 п.л.)

13. **Мусияк В.В.** Синтез новых биологически активных соединений путем модификации пуриновых оснований аминокислотами, пептидами и хиральными аминами / В.П. Краснов, Г.Л. Левит, Д.А. Груздев, А.Ю. Вигоров, И.А. Низова, В.В. Мусияк, Е.Н. Чулаков, В.О. Устинова, А.А. Тумашов, Л.Ш. Садретдинова // Научная конференция грантодержателей РНФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века». Сборник тезисов. (Москва, 20-24 ноября 2016). С. 101-102. (0,12 п.л. / 0,06 п.л.)

14. **Мусияк В.В.** Новые пурин-6-ил- и 2-аминопурин-6-ил-дипептиды: синтез и биологическая активность / В.В. Мусияк, И.А. Низова, А.Ю. Вигоров, Д.А. Груздев, Т.В. Матвеева, Г.Л. Левит, В.П. Краснов // XIX Молодёжная конференция-школа по органической химии, кластер конференций «ОргХим-2016». Материалы конференции (Репино, Санкт-Петербург, 27 июня – 1 июля 2016). С. 157-158. (0,12 п.л. / 0,06 п.л.)

15. **Musiyak V.V.** Synthesis of novel purine and 2-aminopurine conjugates with heterocyclic amines / V.V. Musiyak, D.A. Gruzdev, E.N. Chulakov, A.Yu. Vigorov, G.L. Levit, V.P. Krasnov // MedChem 2015. Book of abstracts (Novosibirsk, Russia, July 5-10, 2015). P. 231. (0,12 п.л. / 0,06 п.л.)