



На правах рукописи

Гордеева Елена Александровна

**СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
6-(АРИЛМЕТИЛ)ИЗОЦИТОЗИНА**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

18 ИЮН 2009

Волгоград - 2009

Работа выполнена на кафедре «Аналитическая, физическая химия и физико-химии полимеров» Волгоградского государственного технического университета.

Научный руководитель

доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент РАН,
Новаков Иван Александрович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор
Брель Анатолий Кузьмич

доктор химических наук, профессор
Краюшкин Михаил Михайлович

Ведущая организация

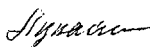
Институт физиологически активных
веществ РАН, г.Черноголовка

Защита состоится «30» июня 2009 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.028.01 при Волгоградском государственном техническом университете по адресу: 400131, г. Волгоград, пр. Ленина 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Волгоградского государственного технического университета.

Автореферат разослан «27» мая 2009 года

Ученый секретарь
диссертационного совета



В.А. Лукасик

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.*

Актуальность темы. Изоцитозин является структурным изомером цитозина – природного пукленинового основания. Сходство химической структуры этих двух соединений во многом объясняет изначальный теоретический и практический интерес к изоцитозину и его производным. Последние находят широкое применение в различных отраслях народного хозяйства, в особенности – в медицине. В последнее время, среди производных изоцитозина найден целый ряд высокоактивных противоретровирусных агентов. Несмотря на то, что об изоцитозине и его производных известно довольно много: начиная от таутомерии и заканчивая методами получения, потребности современного рынка и нужды медицины, определяют необходимость в получении новых производных изоцитозина с улучшенными практическими свойствами. В связи с этим важной задачей органической химии, в этой связи, становится поиск новых, эффективных путей синтеза производных изоцитозина и их функционализации. В этой связи и была сформулирована цель настоящей работы и поставлены задачи, которые необходимо решить для ее достижения.

Цель работы – установление закономерностей синтеза новых производных изоцитозина, а также выявление взаимосвязи «химическая структура - противовирусная активность» в этом ряду соединений, для создания методов направленного конструирования новых пенициллиновых ингибиторов ретровирусной репликации.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Исследование получения 3-оксоэфиров с использованием циклогангического синтеза Блэйза и изучение синтеза производных 2-тиоурацила на их основе.

* В постановке задач исследования и обсуждении результатов принимали активное участие д. х. н., проф. Орлинсон Борис Семенович и к. фарм. н. Павронский Максим Борисович

2. Исследование синтеза и аминоллиза 5-алкил-6-(арилметил)-2-(метилсульфанил)пиримидин-4(3*H*)-онов.
3. Исследование синтеза и аминоллиза 5-алкил-6-(арилметил)-2-(метилсульфанил)пиримидин-4(3*H*)-онов.
4. Оценка эффективности твердофазного синтеза для получения производных изоцитозина.
5. Разработка подходов к направленному стереоселективному синтезу производных 6-(1-арилэтил)пиримидин-4(3*H*)-она.
6. Сравнительная оценка противовирусных и цитотоксических свойств полученных производных 2-амино-4(3*H*)-пиримидинона в остром эксперименте.

Научная новизна. В диссертационной работе впервые предложен твердофазный синтез новых производных изоцитозина, позволяющий в мягких условиях и с высоким выходом получать целевые продукты.

На основании систематических исследований установлено влияние растворителя на состав и выход продуктов аминоллиза производных 2-(алкилсульфанил)пиримидин-4(3*H*)-она: показано каталитическое влияние моноэтилового эфира диэтиленгликоля на эту реакцию и предложено объяснение наблюдаемым явлениям.

Проведен анализ процессов конденсации 3-оксоэфиров с солями *S*-алкилизотиурония и тиомочевинной в основной среде.

Впервые предложен подход к направленному стереоселективному синтезу функциональных производных 6-(1-арилэтил)пиримидин-4(3*H*)-она, основанный на получении хиральных 3-оксоэфиров из соответствующих нитрилов по реакции Блэйза, с последующей конденсацией полученных производных с солями *S*-алкилизотиурония, в условиях исключаяющих рацемизацию продукта.

На основании биологических исследований показана высокая анти-ВИЧ-1 активность и низкая цитотоксичность новых производных изоцитозина, проявляющаяся в микромолярном и наномолярном диапазоне

концентраций действующих веществ. Впервые установлено, что антиревертазная активность не является единственным механизмом противоретровирусного действия производных изоцитозина.

Практическая ценность. Предложен удобный и эффективный *one pot* метод синтеза новых функционализированных производных изоцитозина, исходя из соответствующих производных 2-тиоурацила, позволяющий синтезировать целевые соединения с высоким выходом (до 93%) и чистотой ($\geq 98\%$). Разработан эффективный способ синтеза *R*-изомера 2-(2,6-дифторфенил)пропановой кислоты и 3-оксоэфиров на ее основе, являющихся ключевыми полупродуктами в синтезе противовирусных средств. Разработаны эффективные методы синтеза новых производных 6-(арилметил)изоцитозина, позволяющие получать целевые соединения с высоким выходом и чистотой. По результатам проведенных биологических исследований выявлены основные закономерности химической структуры и биологической активности в ряду производных изоцитозина, являющиеся основой создания системы направленного конструирования новых высокоэффективных противовирусных агентов на основе этих веществ.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались на ежегодных научных сессиях ВолгГТУ в 2005-2008 гг., XI Международной научно-технической конференции «Перспективы развития химии и практического применения алициклических соединений» (Волгоград, 2008 г.), XIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2008 г.).

Публикация результатов. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК, 7 тезисов научных докладов, 1 патент РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав обсуждения результатов, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц, 320 литературных ссылок. В первой главе

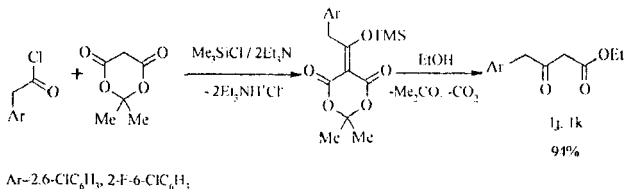
проанализированы литературные данные по методам синтеза и функционализации, а также – практическому применению производных изоцитозина, в последующих главах обсуждаются собственные экспериментальные данные автора, касающиеся методов получения новых соединений и полупродуктов их синтеза, их физико-химических свойств, спектральных характеристик и фармакологической активности. Последняя глава содержит описание методик синтеза полученных веществ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

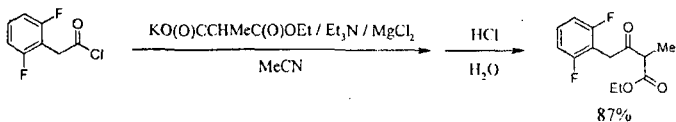
В ходе проведенной работы были разработаны новые подходы к синтезу производных изоцитозина. В качестве ключевых интермедиатов, для построения гетероциклической системы пиримидина были использованы алкиловые эфиры 4-арил-3-оксобутановых кислот, полученные на основании соответствующих 2-арилуксусных кислот и их нитрилов. Последующая функционализация пиримидинового фрагмента проводилась путем региоселективного алкилирования по экзониклическому атому серы с последующим сольволитическим расщеплением полученных производных алифатическими и жирно-ароматическими аминами.

1. Исследование особенностей синтеза алкил-2-алкил-4-арил-3-оксобутаноатов

Для синтеза 2-незамещенных и 2-метилзамещенных 3-оксоэфиров были использованы методы, основанные на применении 2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона (кислоты Мельдрума):

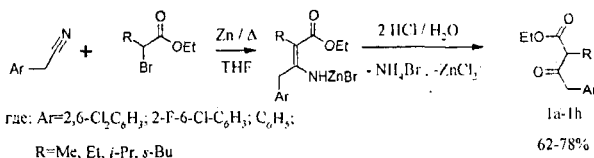


и калия 2-метил-3-оксо-3-этоксипропаноата:



в качестве исходных веществ. Целевые продукты были получены с высоким выходом (87-94%) и чистотой (>97%).

При получении алкиловых эфиров 2-алкил-4-арил-3-оксобутановых кислот был применен цинкорганический синтез Блэйза:



При изучении реакции было установлено, что оптимальным является 5-кратный мольный избыток реактива Реформатского, обеспечивающий полную конверсию нитрила. Также было исследовано влияние растворителей: толуола и тетрагидрофурана (THF) на ход реакции и состав ее продуктов. Было установлено, что проведение синтеза в толуоле, приводит к неполной конверсии исходного нитрила и образованию значительного количества побочного бромсодержащего 3-оксоэфира. Применение THF в качестве растворителя, увеличивает конверсию исходного нитрила. Первой стадией синтеза Блэйза является образование реактива Реформатского на поверхности цинка, который образует в растворителе сольватный комплекс. Этот комплекс окружен плотной сольватной оболочкой, в отличие от комплекса, образованного в толуоле, что уменьшает образование побочных продуктов. Поэтому растворителем выбора для проведения синтеза Блэйза явился тетрагидрофуран.

Увеличение алкильного фрагмента во 2-ом положении эфира замещенной 2-бромуксусной кислоты, приводит к снижению выхода целевого продукта, что связано со стерическим эффектом соответствующего заместителя. Также было показано, что в ходе синтеза происходит

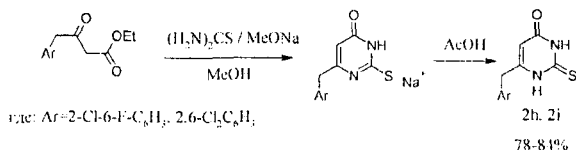
образование побочного соединения (2-5%), идентифицированного как производное пиридина.

В ходе работы были получены новых метиловые и этиловые эфиры 4-арил-3-оксобутановых кислот. Чистота полученных соединений была подтверждена методом хромато-масс-спектрометрии, а структура – методом ИК- и ЯМР ^1H -спектроскопии и через получение производных 2-тиоксо-2,3-дигидропиримидин-4(1*H*)-она.

2. Исследование синтеза 5-алкил-6-(арилметил)-2-тиоксо-2,3-дигидропиримидин-4(1*H*)-онов

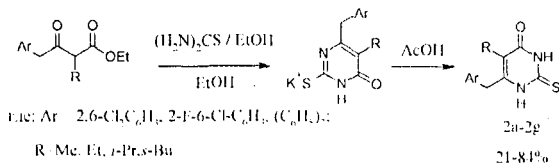
Синтез 5-алкил-6-(арилметил)-2-тиоксо-2,3-дигидропиримидин-4(1*H*)-онов был выполнен путем конденсации соответствующих 3-оксоэфиров с $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CS}$ в основной среде.

Исследование реакции конденсации 2-позамещенных 3-оксоэфиров в среде $\text{MeOH} - \text{MeONa}$ показало, что оптимальным является соотношение исходных реагентов: 3-оксоэфир : $\text{MeONa} : (\text{H}_2\text{N})_2\text{CS} = 1 : 3 : 2$, что позволяет получать производные 2-тиоурацила с хорошим выходом (78-84%):



Для 3-оксоэфиров, содержащих метильную группу в положении 2, выход целевых продуктов был ниже (например, 78% для этил 4-(2-хлор-6-фторфенил)-3-оксобуаноата, против 47% для этил 4-(2-хлор-6-фторфенил)-2-метил-3-оксобуаноата). 3-Оксоэфиры, содержащие Et- или *i*-Pr-группу в положении 2, практически не вступали в реакцию конденсации.

Исследование реакции конденсации в среде EtOH - EtOK показало, что оптимальным является соотношение исходных реагентов: 3-оксоэфир : EtOK : $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CS} = 1 : 6 : 2-3$, что позволяет получать целевые производные 2-тиоурацила и в случае соединений, содержащих Et-, *i*-Pr и *s*-Bu- группы во 2-ом положении:



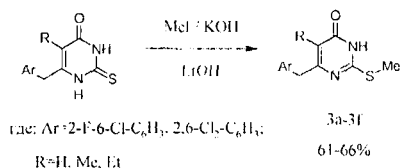
При этом, выход 5-Et- (например, 31% для 6-(2-фтор-6-хлорбензил)замещенного 2-тиоурацила), 5-*i*-Pr- (32%) и 5-*s*-Bu-замещенных (21%) 2-тиоурацилов оказался значительно ниже, чем выход соответствующих производных 2-тиотимина (84%).

Для успешного протекания реакции необходимо, чтобы карбонильная группа 3-оксоэфира была максимально открыта для нуклеофильной атаки. Введение алкильных групп в α -положение к карбонилу приводит к снижению *C*^{III}-кислотности 3-оксоэфира и его способности к енолизации. Также объемные алкильные группы экранируют карбонильную группу. Совокупность этих факторов снижает выход целевых продуктов.

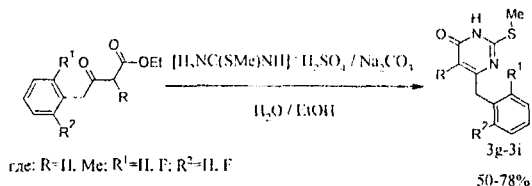
В ходе работы были получены новые производные 6-арил-2-тиоксо-2,3-дигидропиримидин-4(1*H*)-она с выходом 21-84%. Индивидуальность полученных веществ подтверждена методом ТСХ, а структура – данными ИК- и ЯМР ¹H-спектроскопии.

3. Изучение закономерностей получения 6-(арилметил)-2-(метилсульфанил)-пиримидин-4(3*H*)-онов

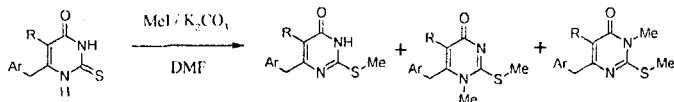
S-Метилированные производные 2-тиоурацила были получены двумя путями - посредством региоселективного *S*-мометилирования соответствующих 2-тиоурацилов (метод А):



и путем конденсации 3-оксоэфиров с H₂NC(NH)SMc·H₂SO₄ в среде Na₂CO₃-EtOH (метод В):



В ходе исследования реакции *S*-метилирования 2-тиоурацилов была установлена зависимость состава и выхода продуктов от химической природы применяемого растворителя и основания. Алкилирование MeI в системе KOH-EtOH (MeONa-MeOH), в отличие от системы K₂CO₃ - DMF, протекает региоселективно, давая продукты *S*-мометилирования. Алкилирование в системе K₂CO₃-DMF дало сложные смеси полиалкилирования:



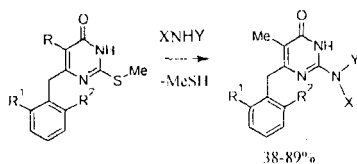
При исследовании метода Б было показано, что введение алкильного фрагмента во α -положение 3-оксоэфира приводит к снижению выхода целевых продуктов (например, с 78% для этил 3-оксо-4-фенилбутаноата до 50% для этил 2-метил-3-оксо-4-фенилбутаноата). В случае проведения этой реакции с 3-оксоэфирами, содержащими Et- и *i*-Pr- группы во α -положении, целевые продукты получены не были. Это, очевидно, связано со стерическим фактором соответствующего заместителя.

Таким образом, метод Б отличается большей пренаративной простотой, в то время, как метод А дает возможность получать более широкий спектр указанных производных.

В ходе работы были синтезированы новые 6-(арилметил)-2-(метилсульфанил)-пиримидин-4(3*II*)-онов с выходом 50-78%. Индивидуальность полученных веществ была подтверждена методом ТСХ, а структура – данными ИК- и ЯМР ¹H-спектроскопии.

4. Исследование особенностей синтеза 5-алкил-6-(арилметил)-2-(метилсульфанил)пиримидин-4(3*H*)-она с алифатическими и жирно-ароматическими аминами

В ходе проведенной работы был изучен аминолиз *S*-алкилированных производных 2-тиоурацила, как основной метод синтеза новых производных изоцитозина. Аминолиз 5-алкил-6-(арилметил)-2-(метилсульфанил)пиримидин-4(3*H*)-онов проводился при избытке амина от 2 до 20 кратного как без растворителя, так и в растворителе (этиленгликоле, 2-этоксиганоле, моноэтиловом эфире диэтиленгликоля). Температурный режим реакции варьировался от 135 до 200°C.



где: X+Y = Et., (CH₃)₂, (CH₃)₂, O(CH₂CH₂)₂, MeN(CH₂CH₂)₂;

Y=H, X = PhCH₂CH₂, 1-MeOC₂H₄CH₂CH₂, 4-FC₆H₄CH₂CH₂;

PhCH₂CH₂CH₂CH₂, 1-AdCH₂CH₂, 1-AdCH₂CH₂(Me), 1-AdCH₂;

2-(*trans*-2-нафт-1-илбис(2-пропил-3-иламино-

R = H, Me, R¹ = H, F, Cl, R² = H, F, Cl

Выбор аминов для проведения этой реакции обусловлен тем, что образующиеся производные изоцитозина являются структурными аналогами 2-[[2-(4-метоксифенил)этил]сульфанил]-5-метил-6-(2,6-дихлорбензил)пиримидин-4(3*H*)-она, являющегося, на сегодняшний день, одним из наиболее активных анти-ВИЧ-1 агентов.

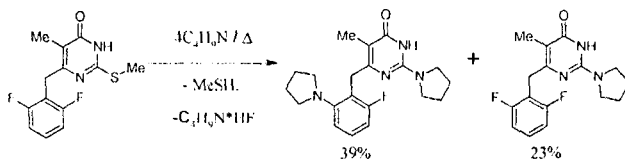
Было установлено, что рассмотренная реакция протекает с заметной скоростью при 150-160°C. При повышении температуры свыше 160°C образовывалось значительное количество побочных продуктов. При температуре ниже 150°C скорость аминолиза существенно уменьшалась (ТСХ-контроль).

Также было установлено, что повышение избытка амина от 5 до 20-ти кратного увеличивает образование побочных продуктов (ТСХ-контроль),

предположительно являющихся продуктами аминоплиза пириимидинового фрагмента. Также было установлено, что стерически затрудненные амины вступают в эту реакцию с большим трудом.

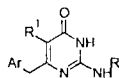
Региоселективность реакции возростала с применением соразтворителя. Так, в этиленгликоле снижалась степень осмоления, по все же, образовывались сложные смеси продуктов реакции. Исследования реакции в среде 2-этоксэтанола дали аналогичную картину реакционной массы, но продолжительность реакции значительно увеличилась. В то же время - несколько повысилась селективность протекания процесса. При использовании в качестве растворителя моноэтилового эфира диэтиленгликоля реакция протекала региоселективно. Это, вероятно, связано с тем, что данный растворитель, являющийся укороченным аналогом подандов, способен координировать с небольшими катионными центрами переходного состояния реакции, стабилизируя его. Следует отметить, что присутствие воды в растворителе приводит к образованию побочных продуктов, идентифицированных, как соответствующие производные урацила. Это очевидно связано с конкурентной реакцией основного гидролиза исходных *S*-метилированных производных 2-тиоурацила.

Специфической особенностью аминоплиза производных, содержащих 2,6-дифторбензильный фрагмент, явилась реакция *inco*-замещения фтора:



В результате было получено 20 производных изопитозина с выходом 38-89%. Индивидуальность полученных соединений подтверждена методом ТСХ, а структура – данными спектральных анализов. Данные о выходе и свойствах полученных соединений суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Физико-химические свойства 5-алкил-6-(арилметил)-2-(алкиламино)пиримидил-4(3*II*)-онов



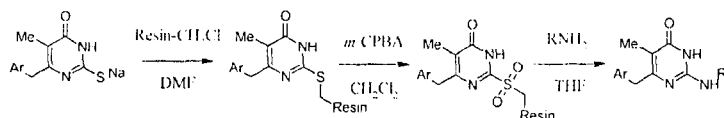
Соединение	R	R ¹	Ar	Выход, %	T _{пл.} , °C
1	2	3	4	5	6
4a	PhCH ₂ CH ₂	Me	C ₆ H ₅	89	146-148
4b	4-MeOC ₆ H ₄ CH ₂ CH ₂	Me	C ₆ H ₅	63	156-157
4c	1-AdCH ₂ CH ₂	Me	C ₆ H ₅	69	182-184
4d	1-AdCH ₂ CH(Me)	Me	C ₆ H ₅	38	167-168
4e	1-AdCH ₃	Me	C ₆ H ₅	78	228-229
4f	2-нафт-1-илбизцикло[2.2.1]гепт-3-ил	Me	2-F-6-Cl C ₆ H ₃	48	232,5-233,5
4g	PhCH ₂ CH ₂	Me	2-F-6-Cl C ₆ H ₃	72	160,5-161,5
4h	PhCH ₂ CH ₂ CH ₂	Me	C ₆ H ₅	57	124-125
4i	PhCH ₂ CH ₂	Me	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	81	175-176
4j	4-F-C ₆ H ₄ CH ₂ CH ₂	Me	C ₆ H ₅	46	190-191
4k	Et	H	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	87	159-160
4l	Et	Me	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	82	168-169
4m	(CH ₂ CH ₂) ₃	H	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	51	209-210
4n	(CH ₂ CH ₂) ₃	Me	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	53	210-211
4o	(CH ₂ CH ₂) ₆	H	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	48	174-175
4p	(CH ₂ CH ₂) ₆	Me	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	56	224-225
4q	O(CH ₂ CH ₂) ₃	H	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	63	215-216
4r	O(CH ₂ CH ₂) ₃	Me	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	49	244-245
4s	MeN(CH ₂ CH ₂) ₂	H	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	58	195-196
4t	MeN(CH ₂ CH ₂) ₂	Me	2,6-F ₂ C ₆ H ₃	52	235-236

5. Исследование особенностей твердофазного синтеза 5-алкил-6-(арилметил)изоцитозинов

Косвенные методы синтеза изоцитозинов, основанные на аминолитическом синтезе соответствующих *S*-алкилированных производных 2-тиоурацилов, как правило, требуют жестких условий проведения и использования соразтворителя. В связи с этим, нами было исследовано применение твердофазного синтеза, известного из химии пептидов.

Проведение твердофазного синтеза 5-алкил-6-

(арилметил)изоцитозинов было основано на иммобилизации исходного соединения на полистирольной матрице. В качестве твердого носителя нами была применена смола Меррифида (хлорметилованный полистирол), содержащая 1-1.3 мэкв хлорметильных групп на 1 г и 1% дивинилбензольных сшивок. 2-Тиотимины были иммобилизованы на полимерной подложке, путем взаимодействия смолы Меррифида с их натриевыми солями в среде безводного DMF. Полученные сульфиды были окислены *m*-хлорпербензойной кислотой в соответствующие сульфоны. При взаимодействии этих соединений с избытком амина в среде безводного THF были получены целевые производные изоцитозина с хорошим выходом.



где: Ar = C₆H₅, 2-F-6-Cl-C₆H₃, 2,6-F₂C₆H₃,

Resin-остаток полистирольной матрицы, *m*-CPBA=*m*-хлорпербензойная кислота

R = PhCH₂CH₂, 4-F-C₆H₄CH₂CH₂, 4-MeOC₆H₄CH₂CH₂, PhCH₂CH₂CH₂, 1-AdCH₂, 4-AdCH₂CH₂,

1-Ad(CH₂CH₂Me), 2-нафталин-1-илбис[ω(2,2,1)гетил-3-ил]

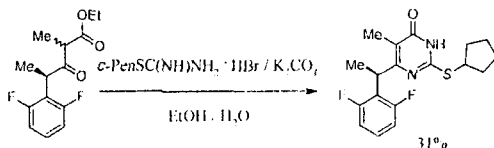
Таким образом, был предложен новый подход к получению производных изоцитозина, основанный на твердофазном синтезе. В результате, целевые продукты были синтезированы с выходом 70-97%, при комнатной температуре в среде THF. Разработанная схема синтеза характеризуется следующими преимуществами: для ее реализации не требуется жестких условий, не используются *S*-метилированные производные 2-тиоурацила, что позволяет избежать работы с токсичным и летучим MeI. Основная особенность предложенного способа состоит в том, что в синтезе используется иммобилизованная форма 2-тиотимина, что позволяет, без потерь исходного соединения, проводить ряд операций, связанных с удалением побочных продуктов.

В ходе работы синтезировано 10 новых производных изоцитозина с выходом 70-97%, структура которых подтверждена методами ИК- и ЯМР ^{13}C -спектроскопии, а их индивидуальность – методом ТСХ.

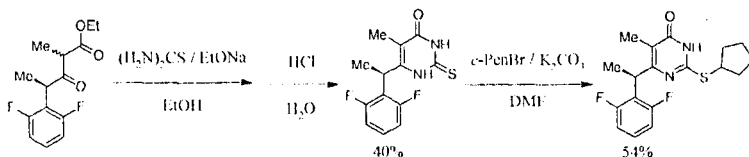
6. Направленный, стереоселективный синтез производных 6-(1-арилэтил)пиримидин-4(3H)-она

Известно, что переход от 6-(арилметил)замещенных производных к 6-(1-арилэтил)замещенным аналогам, неизменно сопровождается более или менее выраженным ростом противовирусной активности полученных соединений. Также, было установлено, что максимум противовирусной активности ассоциируется с *R*-конфигурацией хирального атома углерода бензильной группы.

На примере получения *R*-изомера 6-[1-(2,6-дифторфенил)этил]-5-метил-2-(циклопентилсульфанил)пиримидин-4(3H)-она нами был предложен эффективный подход к направленному стереоселективному синтезу чистых *R*-изомеров 2-замещенных 5-алкил-6-(1-арилэтил)пиримидин-4(3H)-онов. Ключевым интермедиатом в этой схеме явился этиловый эфир (2*RS*,4*R*)-4-(2,6-дифторфенил)-2-метил-3-оксопентановой кислоты, путем конденсации которого с *S*-циклопентилизотиурония бромидом в основной среде и был получен целевой продукт:



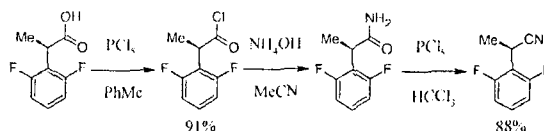
Несмотря на невысокий выход целевого продукта, этот метод оказался более предпочтительным, по сравнению с двустадийной схемой:



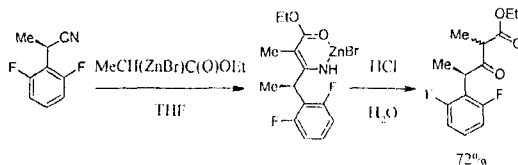
Одностадийная схема позволяет получать целевой продукт с более высоким выходом, обеспечивает практически полное отсутствие рацемизации.

Оптическая чистота полученного соединения была доказана методом ВЭЖХ на хиральной неподвижной фазе, путем сравнения с аутентичным образцом.

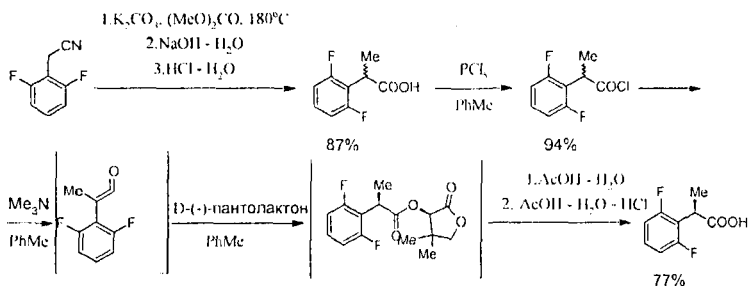
Для получения исходного 3-оксоэфира нами были исследованы методы, основанные на использовании азотистых оснований, а также методы, основанные на использовании металлоорганических соединений. В качестве ацилирующих агентов были применены (2*R*)-2-(2,6-дифторфенил)пропаноилхлорид и (2*R*)-2-(2,6-дифторфенил)пропионитрил, полученные из соответствующей хиральной кислоты по схеме:



Следует отметить, что при использовании методов синтеза 3-оксоэфиров, основанных на применении азотистых оснований, неизменно происходила практически полная рацемизация и образование оптически неактивного 3-оксоэфира. В то же время, при использовании в качестве исходного соединения (2*R*)-2-(2,6-дифторфенил)пропионитрила и получения целевого 3-оксоэфира с применением синтеза Блэйдза, рацемизации практически не происходило:



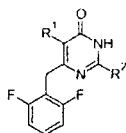
Исходная, оптически деятельная кислота была получена по схеме:



Ключевым промежуточком в синтезе явился этиловый эфир (2*RS*,4*R*)-4-(2,6-дифторфенил)-2-метил-3-оксопентановой кислоты, который был получен путем циклоорганического синтеза Блэйза на основе соответствующего хирального нитрила; при сравнении ЯМР ¹H спектров этилового эфира (2*RS*,4*R*)-4-(2,6-дифторфенил)-2-метил-3-оксопентановой кислоты с его (2*RS*,4*RS*)-изомером, показано, что сигнал протона при С-4 в кислотном остатке выходит в виде квадриплет в области 4.23-4.29 м.д. для (2*RS*,4*R*)-изомера, и в виде мультиплет в области 4.13-4.30 м.д. для рацемата.

7. Исследование биологической активности новых производных изоцитозина

В ходе выполнения синтетической работы, был получен ряд производных изоцитозина, некоторые из которых, к настоящему моменту, уже прошли биологические исследования¹. Химические структуры этих соединений приведены ниже:



где: R¹=H (4k, 4m, 4o, 4q, 4s), Me (4l, 4n, 4p, 4r, 4t);

R²=Et₂N (4k, 4l), (CH₂)₂N (4m, 4n), (CH₂)₃N (4o, 4p);

O(CH₂CH₂)₂N (4q, 4r), MeN(CH₂CH₂)₂N (4s, 4t)

¹ Автор выражает глубокую признательность А. Mai, М. Artico, D. Rotili (Universita degli Studi di Roma «La Sapienza», Italy), I. Cloet-Codina, J. A. Este (Retrovirology Laboratory IrsiCaixa, Badalona, Spain), G. Sbardella (Universita degli Studi di Salerno, Italy), G. Maga (Istituto di Genetica Molecolare IGM-CNR, Pavia, Italy) за проведение биологических исследований.

Противовирусная активность этих соединений была исследована на двух моделях: на колониях клеток, зараженных вирусом, и на изолированных ревертазах ВИЧ-1. В качестве стандартов сравнения были использованы ифавиренц и невирапин – основные, применяемые в клинике нуклеозидные ингибиторы ревертазы ВИЧ-1. В приведенных таблицах суммированы основные данные по активности полученных веществ в отношении дикого штамма ВИЧ-1 (табл.2.), мутантных штаммов ВИЧ-1 (табл.3) и антиревертазной активности (табл.4).

Таблица 2. Противовирусная активность и цитотоксичность новых производных 6-(2,6-дифторбензил)изоцитозина

Соединение	R ¹	R ²	ЭК ₅₀ , мМ	ЦК ₅₀ , мМ	ИС
4k	H	Et ₃ N	0.133	>85	>639
4m	H	(CH ₂) ₅ N	0.013	>82	>6308
4o	H	(CH ₂) ₆ N	0.022	>78	>3545
4q	H	O(CH ₂ CH ₂) ₃ N	0.211	>81	>384
4s	H	MeN(CH ₂ CH ₂) ₃ N	6.09	>78	>13
4l	Me	Et ₃ N	0.03	>81	>2700
4n	Me	(CH ₂) ₅ N	0.003	>78	>26000
4p	Me	(CH ₂) ₆ N	0.05	>75	>1500
4r	Me	O(CH ₂ CH ₂) ₃ N	0.026	>78	>3000
4t	Me	MeN(CH ₂ CH ₂) ₃ N	0.598	>75	>125
Невирапин			0.08	>7	>87
Ифавиренц			0.004	>0.3	>75

Таблица 3. Противовирусная активность новых производных 6-(2,6-дифторбензил)изоцитозина в отношении мутантных штаммов ВИЧ-1

Соединение	R ¹	R ²	ЭК ₅₀ , мМ			
			IR1.98	K103N	Y181C	Y188I
4m	H	(CH ₂) ₅ N	2.2	>10	0.71	8
4o	H	(CH ₂) ₆ N	1.4	>10	0.43	>10
4q	H	O(CH ₂ CH ₂) ₃ N	>10	>10	>10	>10
4n	Me	(CH ₂) ₅ N	0.82	>10	0.14	>10
4p	Me	(CH ₂) ₆ N	1.7	>10	0.57	>10
4r	Me	O(CH ₂ CH ₂) ₃ N	>10	>10	>10	>10
Невирапин			9.9	1.8	0.87	5.6
Ифавиренц			0.08	0.09	0.006	0.23

Таблица 4. Антиревертазная активность новых производных 6-(2,6-дифторбензил)изоцитозина

Соединение	R ¹	R ²	ЭК ₅₀ , мМ						
			WTНВВ	K103N	L1001	V106A	V179D	Y181I	Y181I
4m	H	(CH ₂) ₃ N	2.5	20	10	0.2	20	20	20
4q	H	O(CH ₂ CH ₂) ₂ N	0.7	20	15	2.9	40	20	20
4s	H	MeN(CH ₂ CH ₂) ₂ N	11.23	20	20	40	40	20	20
4r	Me	O(CH ₂ CH ₂) ₂ N	0.05	20	0.9	0.4	8.3	20	20
4l	Me	MeN(CH ₂ CH ₂) ₂ N	2	-	-	0.9	40	-	-
Невирапин			0.4	7	9	10	0.3	35	18
Ифавирец			0.03	3	-	-	-	0.08	-

Из полученных данных видно, что анти-ВИЧ-1 активность полученных веществ в отношении дикого штамма ВИЧ-1 возрастает с введением метильного радикала в положение 5 пиримидинового гетероцикла. Также, повышению противовирусной активности способствует включение экзоциклического атома азота фрагмента изоцитозина, в состав насыщенного, липофильного азотистого гетероцикла. Сопоставление данных об анти-ВИЧ-1 активности и способности угнетать ревертазу у полученных веществ, свидетельствует о том, что они не могут рассматриваться, как «чистые» ингибиторы обратной транскриптазы. По-видимому, противовирусная активность полученных веществ реализуется через целый ряд биохимических механизмов.

На основании проведенной работы выявлен лидер, по уровню противовирусной активности – 5-метил-2-(пиреридин-1-ил)-6-(2,6-дифторбензил)пиримидин-4(3H)-он, превосходящий по анти-ВИЧ-1 активности невирапин и ифавирец, а также – обладающий низкой цитотоксичностью и большой терапевтической широтой.

Выводы:

1. Изучены закономерности синтеза производных изоцитозина, позволяющие получать новые анти-ВИЧ-1 активные агенты на основе этих соединений.

2. Проведен синтез алкиловых эфиров 4-арил-3-оксобутановых кислот и исследована их конденсация с тиомочевинной, приводящая к образованию 5-алкил-6-(арилметил)-2-тиоксо-2,3-дигидропиримидин-4(1*H*)-онов (21-84%).
3. Выполнен сравнительный анализ двухстадийного и одностадийного методов синтеза производных 6-(арилметил)-2-(метилсульфанил)пиримидин-4(3*H*)-она: установлено, что оба метода дают сопоставимый выход целевых продуктов в расчете на исходные алкиловые эфиры 4-арил-3-оксобутановых кислот (32-48%). Таким образом, одностадийный метод отличается большей препаративной простотой, в то время, как двухстадийный метод дает возможность получать более широкий спектр целевых производных.
4. Исследован синтез производных изоцитозина с использованием реакции аминолита соответствующих *S*-метилированных 2-тиоурацилов. Показано, что проведение этой реакции в среде моноэтилового эфира диэтиленгликоля, повышает ее региоселективность и выход целевых продуктов (до 89%), по сравнению с ее проведением в других растворителях и в их отсутствии.
5. Впервые предложен эффективный твердофазный синтез производных изоцитозина, который позволяет получать целевые продукты с высоким выходом (до 93%) и чистотой (98-99%) при комнатной температуре, в среде апротонного растворителя.
6. На примере получения 6-[(1*R*)-1-(2,6-дифторфенил)этил]-5-метил-2-(циклопентилсульфанил)пиримидин-4(3*H*)-она впервые предложен направленный стереоселективный синтез производных 6-[(1*R*)-1-(2,6-дифторфенил)этил]-5-метилпиримидин-4(3*H*)-она, основанный на промежуточном образовании (3*R*)-4,4-диметил-2-оксотетрагирофуран-3-ил (2*R*)-2-(2,6-дифторфенил)пропаноата из полученного *in situ*, прохирального 2-(2,6-дифторфенил)проп-1-ен-1-она.
7. Сравнительная оценка противовирусных свойств 10 соединений производных изоцитозина и их способности угнетать активность обратной транскриптазы дикого и мутантных штаммов ВИЧ-1, показали, что противовирусное действие, у этой группы соединений, очевидно, реализуется

через целый ряд биохимических механизмов, а не только через угнетение активности ревертазы. Установлено, что противовирусная и антиревертазная активность в ряду синтезированных производных изоцитозина возрастает при переходе от 5 незамещенных к 5-метилзамещенным аналогам, а также – при включении экзоциклического атома азота в состав липофильного насыщенного азатетрацикла.

8. В ходе биологических исследований, выявлен лидер по уровню противовирусной активности – 6-(2,6-дифторбензил)-5-метил-2-(пиперидин-1-ил)пиримидин-4(3H)-он, подавляющий репликацию дикого штамма ВИЧ-1 в концентрации 3 нМ и обладающий индексом селективности свыше 26000.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Новаков, И. А. Региоселективная реакция аминоллиза 6-бензил-5-метил-2-(метилсульфанил)пиримидин-4(3H)-она алифатическими и жирноароматическими аминами / И. А. Новаков, Б. С. Орлинсон, Е. А. Гордеева и др. // *Перспективы развития химии и практического применения алициклических соединений.* – 2008: Тез. док. XI Международной научно-технической конференции. – Волгоград, 2008. – С.155.
2. Новаков, И. А. О взаимодействии 8-хлортеофиллина с первичными адамантансодержащими аминами / И. А. Новаков, Б. С. Орлинсон, Е. А. Гордеева и др. // *Перспективы развития химии и практического применения алициклических соединений.* – 2008: Тез. док. XI Международной научно-технической конференции. – Волгоград, 2008. – С.142.
3. Новаков, И. А. Усовершенствованный синтез фенкамфамина / И. А. Новаков, Б. С. Орлинсон, Е. А. Гордеева и др. // *Перспективы развития химии и практического применения алициклических соединений.* – 2008: Тез. док. XI Международной научно-технической конференции. – Волгоград, 2008. – С.140.
4. Новаков, И. А. 5-Алкил-6-(2,6-дигалобензил)-2-[(оксоалкил)сульфанил]-4(3H)-пиримидиноны – новый класс пептидолизных ингибиторов репродукции ВИЧ-1 и ВИЧ-2. / И. А. Новаков, Б. С. Орлинсон, Е. А. Гордеева и др. // *Человек и лекарство.* – 2008. – Тез. док. XV Российского национального конгресса. – Москва, 2008. – С.676.
5. Новаков, И. А. Направленное конструирование новых потенциальных терапевтических агентов на основе азотсодержащих соединений каркасного строения / И. А. Новаков, Б. С. Орлинсон, Е. А. Гордеева и др. // *Перспективы развития химии и практического применения алициклических*

- соединений. – 2008: Тез. док. XI Международной научно-технической конференции. – Волгоград, 2008. – С.10.
6. Поваков, И. А. Синтез и исследование 6-арилметил-5-алкил-изоцитозинон / И. А. Поваков, Б. С. Орлинсон, М. Б. Навроцкий, Е. А. Гордеева // XII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. - Тез. док. - Волгоград, 2007. – С. 17-18.
7. Поваков, И. А. Твердофазный синтез новых производных изоцитозина / И. А. Поваков, Б.С. Орлинсон, Е. А. Гордеева и др. // XIII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. – Тез. док. – Волгоград, 2007. – С. 17-19.
8. Пат. 2334740 РФ, МПК C07D213/30. Способ получения α -рацемата 1-(2-пиперидил)-1,2-этандиола / Поваков И.А., Орлинсон Б.С., Брушилин Р.В., Навроцкий М.Б., Еремейчук С.А., Гордеева Е.А. № 2007125915; заявл. 09.07.07; опубл. 27.09.08.
9. Поваков, И. А. Исследование взаимодействия 6-бензил-5-метил-2-(метилсульфанил)пиримидин-4(3H)-она с алифатическими и жирноароматическими аминами / И. А. Поваков, Б.С. Орлинсон, Е. А. Гордеева и др. // ЖОРХ.- 2009. – Т.45.-№5. – С.786-789.

Подписано в печать 21.05.2009 г. Заказ № 372 . Тираж 100 экз. Печ. л. 1,0
Формат 60 x 84 1/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Типография ИУНЛ
Волгоградского государственного технического университета.
400131, г. Волгоград, ул. Советская, 35