

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина»

На правах рукописи



ЛЯПУСТИН Даниил Николаевич

6-Нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидины. Новые пути синтеза,
химические свойства, биологическая активность

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
химических наук

Екатеринбург – 2023

Работа выполнена на кафедре органической и биомолекулярной химии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор,
УЛОМСКИЙ Евгений Нарциссович

Официальные оппоненты: **КЛИМОЧКИН Юрий Николаевич**,
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Самарский государственный
технический университет», заведующий
кафедрой органической химии;

СУХОРУКОВ Алексей Юрьевич,
доктор химических наук, доцент, ФГБУН
Институт органической химии им. Н.Д.
Зелинского Российской академии наук,
г. Москва, заведующий лабораторией
органических и металл-органических азот-
кислородных систем (№9);

АКСЕНОВ Дмитрий Александрович,
кандидат химических наук, ФГАОУ ВО
«Северо-Кавказский федеральный
университет», г. Ставрополь, доцент
кафедры органической химии

Защита диссертации состоится «19» июня 2023 г. в 16:30 ч на заседании диссертационного совета УрФУ 1.4.06.09 по адресу: 620002, г. 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»:

<https://dissovet2.urfu.ru/mod/data/view.php?d=12&rid=4701>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Поспелова Татьяна
Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Исследования в органической химии, как и в любой другой естественной науке, прежде всего разделяются на фундаментальные и прикладные. Актуальность фундаментальных исследований обуславливается получением новых основополагающих знаний, исследованием законов природы и материи. В то же время, прикладные исследования, опираясь на фундаментальные, направлены на создание и совершенствование новых материалов и технологий. Это способствует повышению уровня жизни человека, решению экологических и гуманитарных проблем и т. д. Одним из способов повышения уровня жизни человека, который предлагает органическая химия, является поиск и разработка новых лекарственных препаратов.

Исследуя рынок современных лекарств, можно отметить, что большинство соединений являются гетероциклами. Более того, множество азотсодержащих гетероциклов необходимы для существования живых организмов. Например, пурины и пиримидины являются основными структурными компонентами нуклеиновых кислот и участвуют в качестве мономеров-предшественников при биосинтезе РНК и ДНК, а также выполняют функции универсальных источников энергии. Вследствие такого высокого значения пуринов для организма, для поиска биологически активных молекул нередко рассматриваются изостеры пуринов – азоло[1,5-*a*]пиримидины, имеющие аналогичную инденовую структуру с тем же минимальным набором гетероатомов. Соединения этого класса проявляют широкий спектр биологической активности и уже много десятков лет продаются в аптеках. С другой стороны, малоисследованным производным таких молекул являются 6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидины. Арсенал синтетических подходов к их получению с начала века практически не пополнился новыми примерами. Несмотря на это, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о больших перспективах применения этих соединений в качестве препаратов против различных вирусов, сепсиса и опухолей. Таким образом, поиск новых методов синтеза нитросодержащих азолопиримидинов, а также способов их модификации представляется актуальной задачей.

Целью работы является разработка нового метода синтеза 6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидинов, исследование их строения, свойств и возможностей практического применения.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- ❖ провести аналитический обзор литературы по способам получения 6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидинов;
- ❖ провести аналитический обзор литературы по способам применения нитросодержащих синтетических эквивалентов (NSE);
- ❖ разработать синтетический подход, включающий возможность получения полизамещенных азоло[1,5-*a*]пиримидинов;
- ❖ исследовать химические, физико-химические и биологические свойства полученных соединений;
- ❖ рассмотреть перспективы использования полученных соединений.

Научная новизна и теоретическая значимость:

- ❖ разработан новый мультикомпонентный подход к синтезу 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов, а также исследованы особенности реакционного пути процесса;
- ❖ разработана методика алкилирования 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов, а также установлены ограничения этой реакции;
- ❖ разработана методика окисления 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов, а также опровергнуты литературные данные, указывающий на невозможность проведения этой реакции. На основании квантово-химических, синтетических и электрохимических экспериментов предположены теоретические особенности ароматизации таких гетероциклов;

❖ исследованы биологические свойства полученных соединений, а также сделаны выводы с точки зрения закономерности структура/активность.

Практическая значимость работы:

❖ получен ряд новых 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов для поиска новых низкомолекулярных противоопухолевых препаратов. Помимо этого, разработанный метод синтеза этих соединений вносит вклад в прикладные аспекты синтеза нитрогетероциклов;

❖ исследована реакция *N*-алкилирования 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Полученные результаты можно рассматривать как разработку базовых условий для создания неприродных нуклеозидов на основе исследуемых соединений;

❖ исследована методика окисления 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Полученные таким образом соединения имеют широкий потенциал для дальнейшей модификации с целью создания лекарственных препаратов;

❖ полученные соединения проявили противоопухолевую активность, что не только свидетельствует о перспективности расширения ряда рассматриваемых гетероциклов для поиска высокоактивных и низкотоксичных производных, но и указывает на перспективность дальнейшего биологического исследования окисленных и алкилированных структур.

Методология и методы диссертационного исследования

В ходе написания диссертации проводился анализ современной литературы по теме исследования, применялся значительный объем классических методов синтеза, выделения и очистки соединений. Для доказательства чистоты и структуры полученных соединений применялись традиционные физико-химические (температура плавления, элементный анализ), спектральные методы (ЯМР, ИК) и хроматографические методы. Также для окончательного установления структуры ряда новых соединений применялся метод РСА.

Положения, выносимые на защиту:

❖ разработка метода синтеза 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов и исследование теоретических аспектов реакции;

❖ разработка метода алкилирования 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов;

❖ разработка метода окисления 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов;

❖ исследование противоопухолевой активности 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов.

Личный вклад соискателя заключался в поиске, анализе и систематизации литературных данных, определении синтетической стратегии и планировании синтеза. Автор принимал непосредственное участие в обработке и интерпретации полученных результатов, в решении возникающих концептуальных проблем, предложении механистических гипотез, а также в написании публикаций.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных физико-химических методов исследования, применением сертифицированного оборудования в центрах коллективного пользования УрФУ и Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, а также хорошей воспроизводимостью экспериментальных результатов.

Основные результаты были представлены на конференциях: Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения» (Красновидово, 2019 г.); XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019 г.); IV Conference «Modern Synthetic Methodologies for Creating Drugs and Functional Materials» (Екатеринбург, 2020 г.); Первая Всероссийская Школа по Медицинской Химии для Молодых Ученых "MedChemSchool 2021" (Новосибирск, 2021 г.); 5-я Российская конференция МедХим-Россия 2021 (Волгоград, 2022 г.).

Публикации. Основное содержание диссертационного исследования изложено в 10 научных работах, в том числе 5 статей, опубликованных в рецензируемых научных

изданиях, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ и индексируемых библиографическими базами Scopus и Web of Science, а также 5 тезисов докладов международных и всероссийских конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 139 страницах, состоит из введения, трех глав: литературный обзор (глава 1), обсуждение результатов (глава 2), экспериментальная часть (глава 3), заключение, список сокращений и условных обозначений. Диссертация содержит 54 схемы, 9 таблиц, 19 рисунков. Библиографический список цитируемой литературы содержит 217 наименований.

Благодарность

Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность коллективу кафедры Органической и Биомолекулярной химии ХТИ УрФУ, в частности, научному руководителю д.х.н, проф. Е.Н. Уломскому, чл.-корр. РАН В.Л. Русинову, академику РАН О.Н. Чупахину, за научное руководство и помощь в проведении исследований и подготовке работы, к.х.н. С.К. Котовской за постоянное внимание и помощь в работе и к.х.н. В.В. Федотову за неоценимую помощь в проведении исследований, поиске новых идей и обсуждении результатов; сотрудникам лаборатории комплексных исследований и экспертной оценки органических материалов в составе ЦКП УрФУ (зав. лаб. к.х.н. О.С. Ельцов) за проведение экспериментов ЯМР, старшему научному сотруднику лаборатории координационных соединений Щепочкину А.В. за проведение электрохимических исследований, младшему научному сотруднику лаборатории высокоэнтропийных сплавов Института Металлургии УрО РАН И.А. Балякину за проведение квантово-химических расчетов, сотрудникам ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» под руководством академика РАН, д.м.н., проф. А.А. Спасова и сотрудникам ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им первого Президента России Б. Н. Ельцина» под руководством к.м.н., доц. В.В. Мелехина за проведение биологических испытаний, а также группе рентгеноструктурного анализа ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН Центра коллективного пользования УрО РАН «Спектроскопия и анализ органических соединений» (руководитель группы к.х.н. П.А. Слепухин) за проведение рентгеноструктурного анализа.

Результаты получены в рамках выполнения Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, № FEUZ-2023-0021 (Н687/42Б.325/23).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты данной диссертационной работы изложены в трех основных разделах. **Во введении** обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования. В **обзоре литературы** (глава 1) обсуждаются методы синтеза 6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидинов, а также химические свойства некоторых 1-нитро-2-*R*-этиленов. **Обсуждение результатов** собственных исследований приведены в главе 2. В **экспериментальной части** (глава 3) представлены объекты исследования, оборудование, реактивы и материалы, методы и методики проведения синтеза.

Глава 2. Обсуждение результатов

2.1 Разработка метода синтеза 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов

Исследование литературы позволило сделать вывод, что поиск новых методов синтеза искомых нитрогетероциклов логичнее всего начать с построения азоло[1,5-*a*]пиримидиновой матрицы на основе аминоазолов **1** и двухуглеродных NSE. Также на основании литературного обзора в качестве такого NSE нами были выбраны 1-морфолино-2-нитроалкены **2**. Для упрощения загруженности последующих схем, на Рисунке 1 представлены основные субстраты, используемые в рамках написания диссертации.

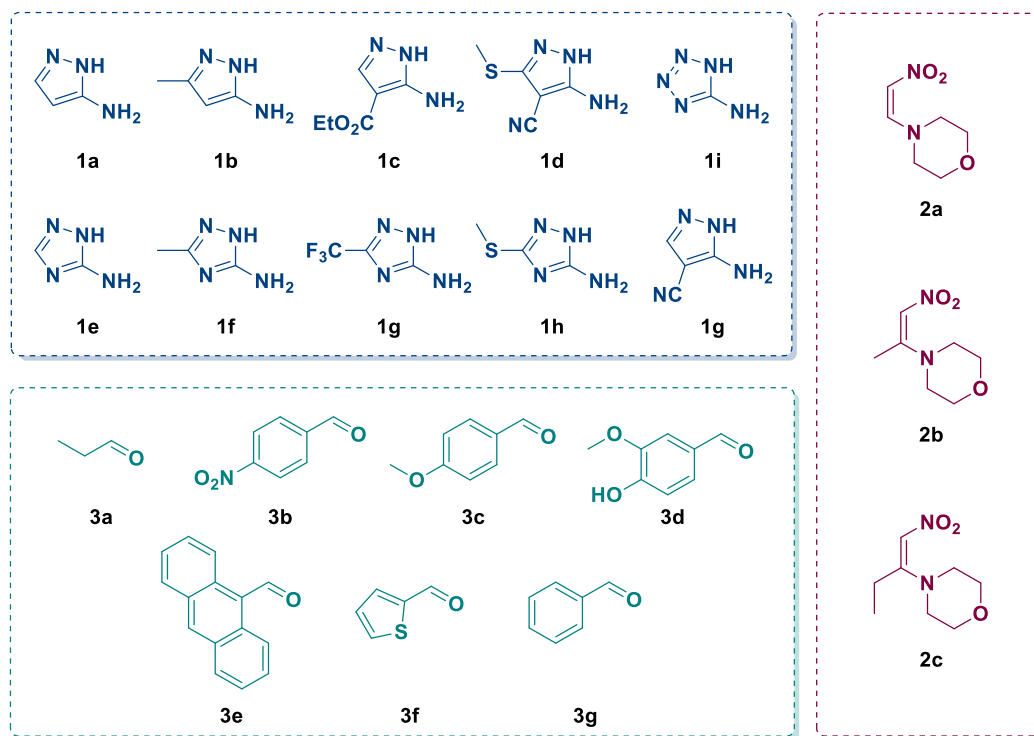


Рисунок 1. Основные исходные компоненты для синтезов, реализуемых в рамках диссертационной работы

Основываясь на литературных прецедентах, мы решили получить гетероциклический имин **5** взаимодействием 3-амино-4-этоксикарбонилпиразола **1c** с различными карбонильными соединениями (Схема 1). Однако, при проведении реакции конденсации бензальдегида **3g** с аминоазолом **1c** в уксусной кислоте получить какой-либо продукт не удалось. 1-Нитробутан-2-он **4b** и калиевая соль нитроуксусного альдегида **4a** в аналогичных условиях также не проявили реакционной способности. Таким образом, аминопипразол **1c** оказался аномально инертен в реакции с карбонильными соединениями.

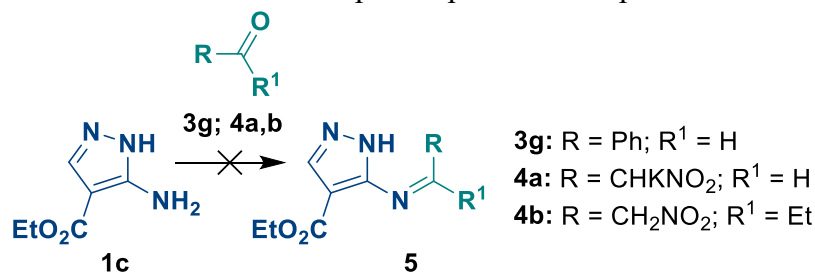


Схема 1. Взаимодействие 3-амино-4-карбэтоксипиразола с различными карбонильными соединениями

Кипячение аминопипразола **1c** в уксусной кислоте с 1-нитро-2-морфолиноэтиленом **2a** в течение двух часов также не дало результатов. Однако, при добавлении к этой смеси 1 эквивалента бензальдегида **3g** уже через час методом ТСХ было зафиксировано образование новых продуктов реакции. После выдержки реакционной массы в течение 10 часов нам удалось выделить искомый 6-нитро-7-фенил-3-этоксикарбонил-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидин **6a** с выходом 41% (Схема 2). В результате, была продемонстрирована фундаментальная возможность трёхкомпонентной реакции с образованием гетероцикла **6a** при участии нитроенаминов **2**, что не только указывает на возможность варьирования заместителей во всех положениях гетероциклической матрицы при использовании различных субстратов, но и представляется удобным и современным атом экономичным методом с точки зрения современных трендов «зеленой химии».

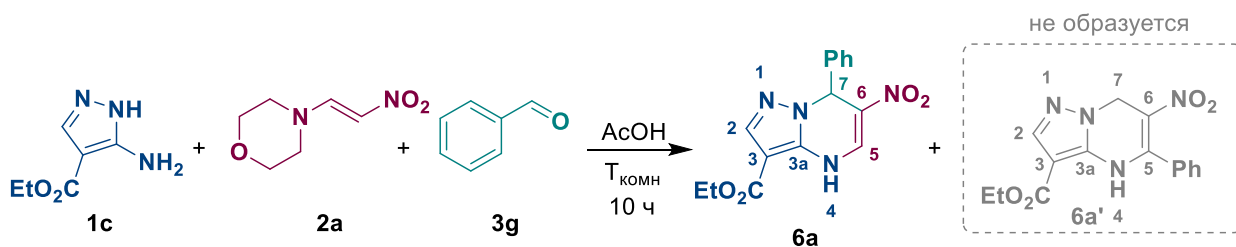


Схема 2. Получение 6-нитро-7-фенил-3-этоксикарбонил-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиридина **6a**

Данные метода РСА однозначно подтвердили образование предполагаемого региоизомера (Рисунок 2). Интересным является тот факт, что фенильное кольцо располагается перпендикулярно гетероциклической матрице и находится по одну сторону с этильной группой в положении C₅. Тем не менее, вследствие особенностей проведения рентгеноструктурного анализа, для фенильного фрагмента нельзя однозначно определить абсолютную конфигурацию.

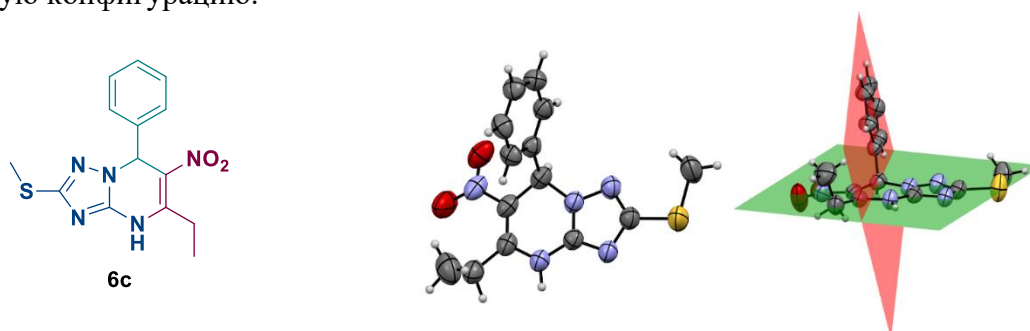
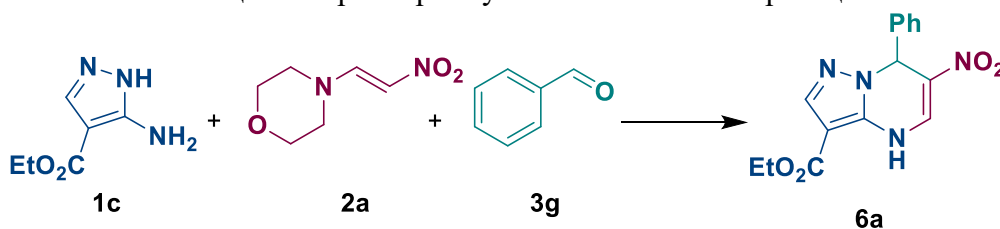


Рисунок 2. Вид структуры **6c**, приведенный с вероятностью смещения эллипсоида и показывающий схему расположения атомов. Н-Атомы показаны в виде маленькй сфер произвольных радиусов.

К сожалению, выход соединения **6a** оставлял желать лучшего. Поэтому было проведено исследование влияния природы растворителей, катализаторов и условий реакции на выход целевого продукта (Таблица 1).

Таблица 1. Параметры мультикомпонентной реакции



№	Растворитель	Катализатор	Температура, °С	Время, ч	Выход, %
1	AcOH	-	кипячение	10	41
2	<i>n</i> -BuOH	-	кипячение	20	-
3	CF ₃ CH ₂ OH	-	кипячение	10	-
4	PhNO ₂	-	120	10	-
5	MeSO ₃ H	-	120	10	-
6	AcOH/Py (1/1 мол)	-	130	10	55
7	-	-	110	3	-
8	AcOH	Микроволновое излучение	130	0.3	48
9	AcOH	CuI (20 мол%)	кипячение	3.5	-
10	AcOH	Cu(OAc) ₂ (20 мол%)	кипячение	3.5	-
11	AcOH	ZnCl ₂ (10 мол%)	60	1.5	-
12	H ₂ O	нано CeO ₂	80	5	-
13	MeCN _{сух}	I ₂	80	10	-
14	<i>n</i> -BuOH	2 экв TsOH·H ₂ O	кипячение	4	56
15	1,4-Диоксан	2 экв TsOH·H ₂ O	кипячение	10	-
16	<i>n</i> -BuOH	2 экв MeSO ₃ H	кипячение	2	-

Таблица 1 (продолжение)

17	<i>n</i> -BuOH	ZnCl ₂	кипячение	2	-
18	<i>n</i> -BuOH	ZnCl ₂	25→80	-	-
19	<i>n</i> -BuOH	1.5 экв BF ₃ ·Et ₂ O	кипячение	2	69
20	MeCN _{abs}	1.5 экв BF ₃ ·Et ₂ O	кипячение	2	-
21	1,4-Диоксан	1.5 экв BF ₃ ·Et ₂ O	кипячение	10	-
22	<i>i</i> -PrOH	1.5 экв BF ₃ ·Et ₂ O	110 (автоклав)	3	67
23	CHCl ₃	1.5 экв BBr ₃	25	-	-
24	<i>n</i> -BuOH	1.5 экв B(OH) ₃	кипячение	10	-
25	<i>n</i> -BuOH	1.5 экв B(<i>n</i> -BuO) ₃	кипячение	1.5	-

Первоначальный эксперимент показывает (Таблица 1, № 1), что реакция может быть реализована при длительном нагревании и высокой температуре. Далее мы пробовали осуществить мультикомпонентную реакцию при использовании растворителей различной природы, однако замена уксусной кислоты на менее и более кислотные (Таблица 1, № 2, 3, 5) растворители, а также использование апротонного неполярного растворителя (Таблица 1, № 4) не привело к образованию необходимого продукта. Сплавление исходных реагентов также не привело к желаемому результату (Таблица 1, № 7), а использование эквимольной смеси уксусной кислоты и пиридина позволило увеличить выход продукта **6a** до 55% (Таблица 1, № 6). Использование уксусной кислоты в качестве растворителя при микроволновом излучении не приводило к значительному увеличению выхода, однако существенно ускоряло образование продукта **6a** (Таблица 1, № 8). Использование условий для мультикомпонентных реакций, найденных в литературе, никак положительно не повлияло на протекание реакции (Таблица 1, № 9-13). Удачным оказался эксперимент с использованием *n*-BuOH в качестве растворителя и TsOH·H₂O в качестве катализатора реакции (Таблица 1, № 14). Однако, замена растворителя на апротонный 1,4-диоксан (Таблица 1, № 15) или замена катализатора на более сильную, хоть и родственную, метансульфо кислоту (Таблица 1, № 16) снова не привели к положительным результатам. Замена протонных кислот на кислоты Льюиса также продемонстрировала неоднозначные результаты. Использование хлорида цинка в *n*-BuOH не привело к образованию продукта **6a** (Таблица 1, № 17, 18), а использование 1.5 экв BF₃·Et₂O позволило увеличить выход до 69% (Таблица 1, № 19). Далее нами было установлено, что использование апротонных растворителей даже при катализе BF₃·Et₂O не приводит к образованию целевого продукта **6a** (Таблица 1, № 20-21). Также был предложен способ получения продукта **6a** с использованием более благоприятного (с точки зрения растворимости в воде и зеленой химии) растворителя *i*-PrOH (Таблица 1, № 22) с выходом выше среднего. Использование других борсодержащих кислот Льюиса также не способствовало протеканию реакции (Таблица 1, № 23-25). Более того, учитывая, что реакция совершенно не протекала при катализе B(*n*-BuO)₃, можно утверждать, что BF₃·Et₂O во время реакции в бутаноле не претерпевает изменений, и именно эфират трифторида бора является катализирующим агентом. Из полученных выше данных можно сказать, что хоть оптимизируемая реакция не особо чувствительна к нагреванию и длительному выдерживанию, она сильно зависит от типа растворителя и качественных характеристик катализатора.

Таким образом, подобрав оптимальные условия для проведения реакции, мы исследовали возможность вовлечения в реакцию субстратов различной электронной природы, изменяя один из исходных реагентов при двух неизменных. Так, при использовании 1-нитро-2-морфолинопропилена **2b**, бензальдегида **3g** с варьированием 3-аминоазолов **1a-i** мы получили ряд 5-метил-6-нитро-7-фенил-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов **7** с выходами от средних до хороших (Схема 3).

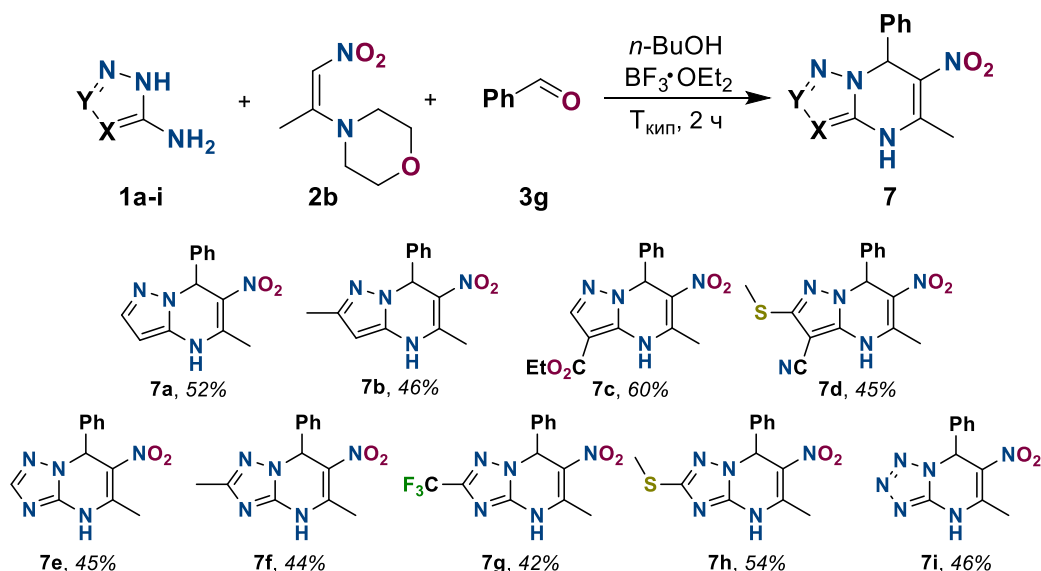


Схема 3. Получение 5-метил-6-нитро-7-фенил-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов

Далее мы варьировали компоненту 1-морфолино-2-нитроалкенов **2**. Число синтетически доступных нитроалкенов **2** весьма ограничено, но все они оказались вполне реакционноспособны при получении дигидронитропроизводных **8** (Схема 4).

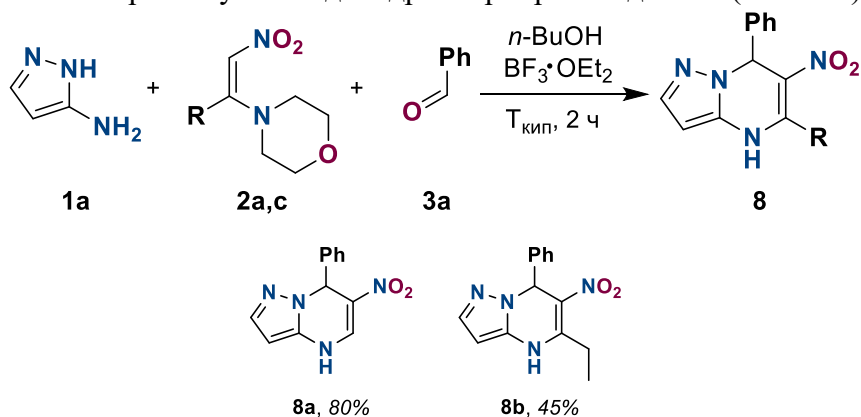


Схема 4. Получение 5-*R*-6-нитро-7-фенил-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **8**

Наконец, мы рассмотрели влияние строения третьей компоненты – альдегидов на образование 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов **9**. В качестве объектов исследования использовался пропионовый альдегид **3a**, а также производные бензальдегида с электрондонорными **3c,d** и электронакцепторными **3b** группами, полициклический антраценкарбальдегид **3e** и гетероциклический тиофенкарбальдегид **3f**. Использование разработанных реакционных условий позволило получить 7-*R*-5-метил-6-нитро-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидины **9** с выходами от средних до хороших (Схема 5).

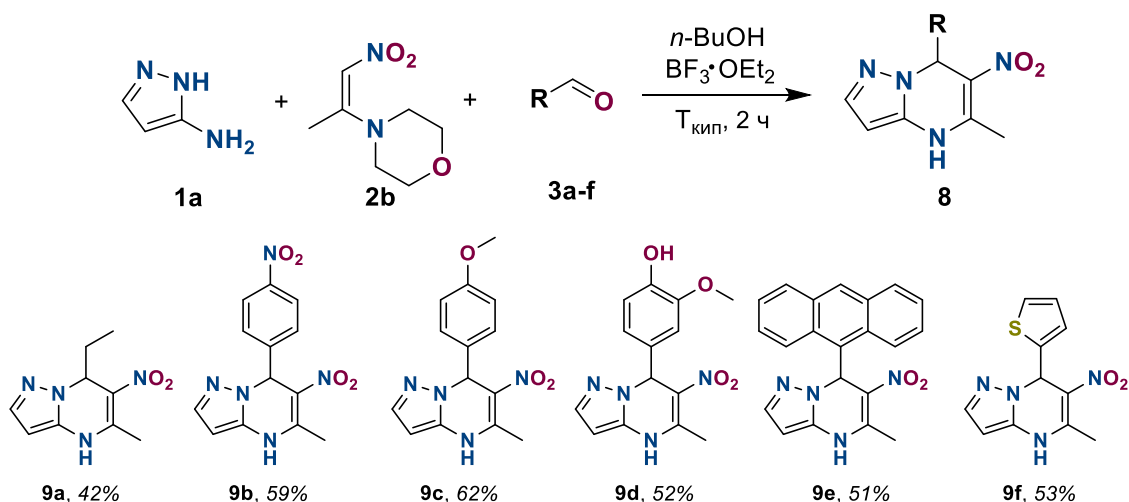
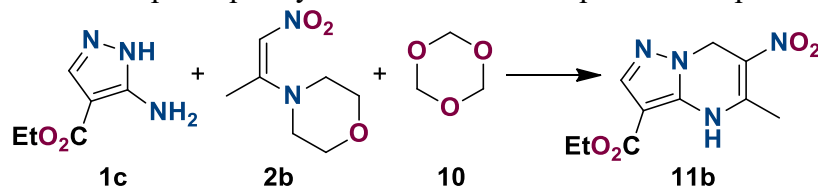


Схема 5. Синтез 5-метил-6-нитро-7-R-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидинов

В дополнении к использованным альдегидам мы решили провести мультикомпонентную реакцию с использованием триоксана **10**. Нами было опробовано несколько условий для определения оптимального способа проведения реакции (Таблица 2).

Таблица 2. Параметры мультикомпонентной реакции с триоксаном



№	Растворитель	Катализатор	Время выдержки, ч	Температура, °С	Выход, %
1	<i>n</i> -BuOH	BF ₃ ·Et ₂ O	2	120	-
2	AcOH	-	2	120	-
3	<i>n</i> -BuOH	TsOH·H ₂ O	2	120	21
4	<i>n</i> -BuOH	H ₂ SO _{4(к)}	2	120	23*
5	<i>i</i> -PrOH	H ₂ SO _{4(к)}	2	120 (автоклав)	51

*Выход целевого вещества в смеси на основании данных спектра ЯМР ¹H

Использование эфирата трифторида бора не приводило к конверсии триоксана **10** (Таблица 2, № 1), что указывает на предпочтительность использования протонных кислот. Уксусная кислота никак не проявила себя в данной реакции (Таблица 2, № 2), а использование TsOH позволило получить продукт **11b** с малым выходом (Таблица 2, № 3). Применение серной кислоты позволило немного увеличить выход реакции (Таблица 2, № 4), однако помимо основного 5-метил-6-нитро-3-этоксикарбонил-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидина **11b** образовывался 5-метил-6-нитро-3-бутоксикарбонил-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидин в мольном соотношении на выделенное вещество 1:2. Поэтому мы попробовали провести реакцию с использованием более стерически затрудненного изопропанола в качестве растворителя, вместо *n*-бутанола, и получили гетероцикл **11b** с выходом 51%. Таким образом, нами были получены два 6-нитро-3-этоксикарбонил-5-R-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидина **11** со средними выходами (Схема 6).

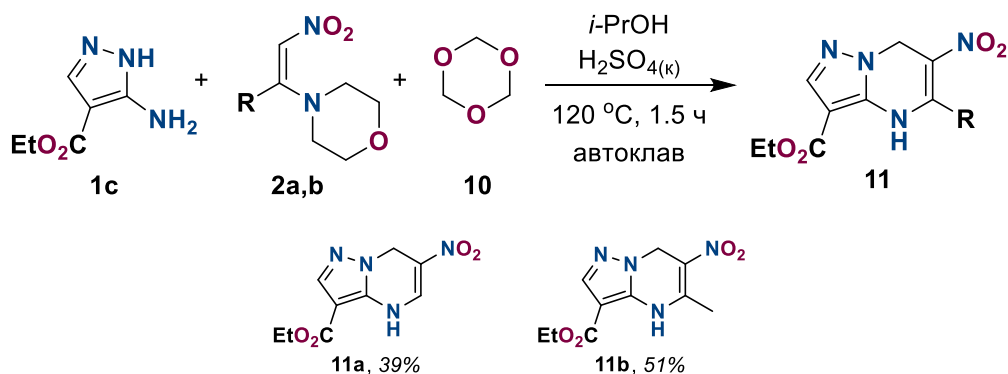


Схема 6. Получение 6-нитро-5-R-3-этоксикарбонил-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **11**

На основании проведённых синтезов можно сделать вывод, что обнаруженная реакция, а также подобранные к ней условия, позволяют использовать множество разнообразных аминоазолов **1** и альдегидов **3**, **10** с целью создания полизамещенных 4,7-дигидро-6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидинов.

Глава 2.2. Исследование механизма образования 4,7-дигидро-6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидинов

2.2.1 Мультикомпонентная реакция при катализе кислотой Льюиса

Получив достаточно примеров, подтверждающих синтетические возможности обнаруженного нами процесса, мы решили установить последовательность превращений в мультикомпонентной реакции. Для такого исследования нами были использованы бензальдегид **3g**, аминоазолы **1c,h** и 1-нитро-2-морфолинопропилен **2b**. Было установлено, что в уксусной кислоте реагенты друг с другом попарно не реагируют, а при катализе эфиром трифторида бора проходит только реакция между нитроалкеном **2b** и аминоазолами **1c,h** с образованием N-нитропроп-1-ен-2-ил-N-азолиламинов **12a,b** с отличными выходами (Схема 7). Образующиеся азолиленамины **12** далее способны циклизироваться с бензальдегидом в соответствующие гетероциклы **7c,h** при катализе $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.

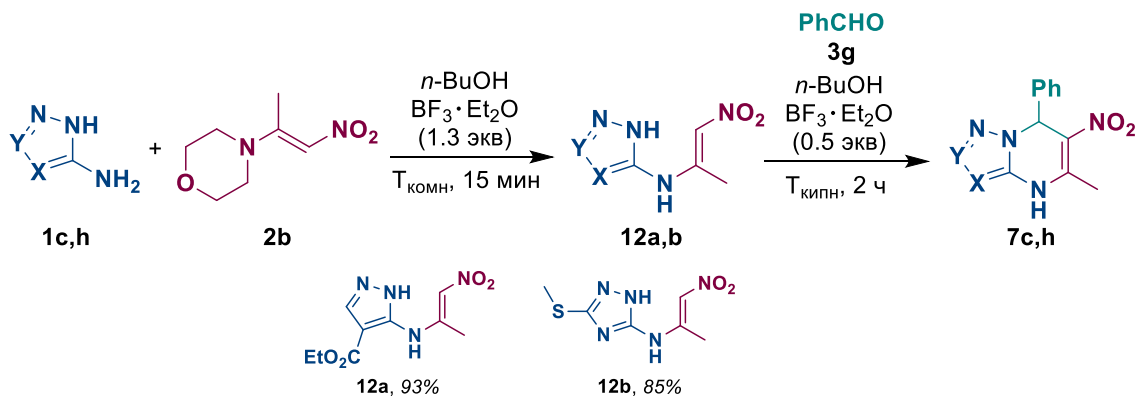


Схема 7. Взаимодействие аминоазолов **1c,h** и нитроенамина **2b** в присутствии $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$

Дальнейшие исследования показали, что с эфиром трифторида бора реагирует в первую очередь морфолинонитропропилен **2b**. При добавлении 1.3 экв $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ к суспензии морфолинонитропропилена **2b** в бутаноле или низших спиртах ($\text{C}_1 \div \text{C}_3$) образуется раствор, а само исходное вещество **2b** методом ТСХ более не фиксируется. Аналогично реагируют морфолиноэтилены **2a,c** и их структурные аналоги – 3-морфолиноакрилонитрил и этил-3-морфолиноакрилат. Во всех случаях из реакционной массы был выделен тетрафторборат морфолиния **15**.

Таким образом, мы предполагаем для первой стадии образования енамина **12** следующую последовательность превращений: взаимодействие трифторида бора с пуш-пульным морфолиноалкеном **2** приводит к образованию алкина **13** и борфторида морфолина **14** (Схема 8). Далее комплекс **14** в реакции с бутанолом превращается в

терафторборат морфолина **15** и трибутилборат. Следует снова подчеркнуть, что в апротонных растворителях (хлороформ, ацетонитрил, ТГФ) реакция не протекает.

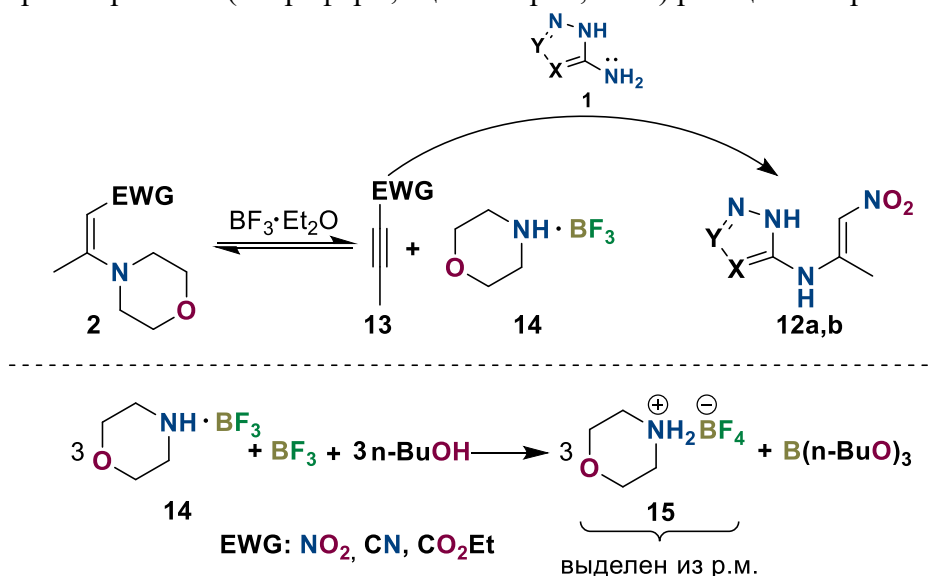


Схема 8. Предполагаемое взаимодействие морфолиноалкенов **2** с BF₃·Et₂O в *n*-бутаноле

Таким образом, мы не только установили реакционный путь мультикомпонентной реакции, но и получили очень важный побочный продукт **15**, наличие которого позволяет выдвинуть предположение о том, что в процессе реакции образуется крайне редко встречающаяся молекула нитроалкина **13**.

2.2.2 Мультикомпонентная реакция при катализе кислотой Брендстеда

Установив, каким образом протекает исследуемая реакция при катализе BF₃·Et₂O, мы решили получить промежуточные азолиленамины **12** при катализе уксусной кислотой. К нашему удивлению, реакция между аминазолами **1c,h** и нитроалкенами **2a,b** в этом случае не протекала совсем. С другой стороны, первоначальный эксперимент в присутствии всех трёх исходных компонентов был удачно реализован именно при нагревании в уксусной кислоте (Схема 2). В попытках разъяснить эту аномалию мы повторили эксперимент, однако провели его в уксусной кислоте без нагревания. При таком проведении процесса уже через 30 минут из реакционной массы выпадал осадок, который после выделения в чистом виде был охарактеризован нами как 7-морфолино-6-нитро-5-фенил-3-этоксикарбонил-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-*a*]пиримидин **16c** (Схема 9). Таким образом нами был получен небольшой ряд новых неожиданных тетрагидрозамещенных азолопиримидинов **16**.

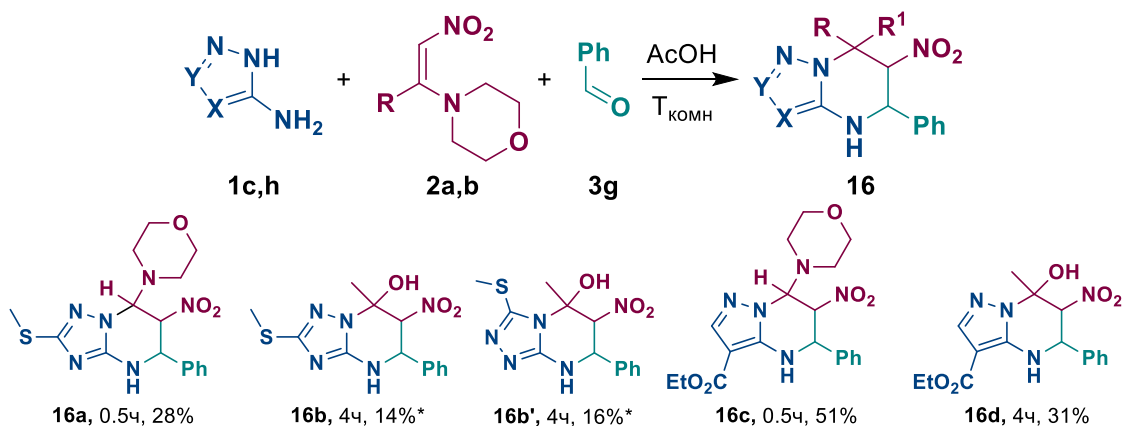


Схема 9. Получение 4,5,6,7-тетрагидро-6-нитро-5-фенил-7-*R*-7-*R*¹-азоло[1,5-*a*]пиримидинов **16**

При проведении мультикомпонентной реакции с участием 1-морфолино-2-нитропропилена **2b** образуются 7-гидрокси-7-метил-6-нитро-5-фенил-4,5,6,7-

тетрагидроазоло[1,5-*a*]пиримидины **16b,d** (Схема 9). Данный результат можно объяснить менее стерически затрудненной ситуацией в случае гидроксильной группы в сравнении с морфолиновым заместителем.

Поскольку реакция инициируется только при наличии всех трёх исходных компонентов в реакционной смеси, можно предположить, что первоначально протекает обратимое присоединение NSE **2a** к пиридиновому N-атому азоло **1c,h** с образованием аддукта **17**. Далее протекает реакция Кневенагеля бензальдегида **3g** с аци-нитроформой аддукта **17**, завершающаяся гетероциклизацией с образованием 7-морфолино-6-нитро-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидроазоло[1,5-*a*]пиримидина **16a,c** (Схема 10). В случае использования 1-морфолино-2-нитропропилена **2b**, образующиеся гетероциклы подвергаются реакции нуклеофильного замещения, в которой морфолиновый фрагмент замещается на гидроксильную группу.

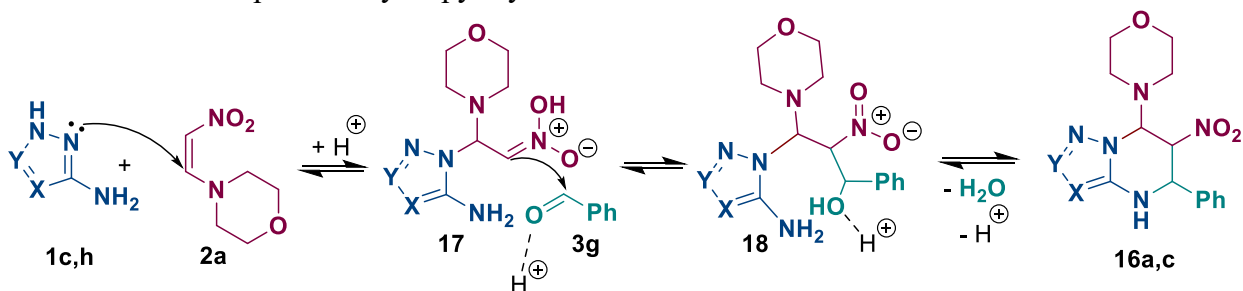


Схема 10. Предполагаемый механизм образования 7-морфолино-6-нитро-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов **16a,c**

Далее мы пробовали нагревать гетероцикл **16c** в уксусной кислоте. К нашему удивлению, в этих условиях образовывался полученный ранее 6-нитро-3-этоксикарбонил-4,7-дигидропирозоло[1,5-*a*]пиримидин **6a** (Схема 11). Образование продукта **6a** указывает на перегруппировку соединения **16c** в кислых условиях при повышенной температуре. Мы предполагаем, что азолопиримидин **16c** претерпевает экзо-разрыв в азольном кольце под действием уксусной кислоты, сопровождающийся таутомерным превращением с образованием тетрагидропиримидина **20'**, который в дальнейшем циклизуется в более стабильный азолопиримидин **21**.

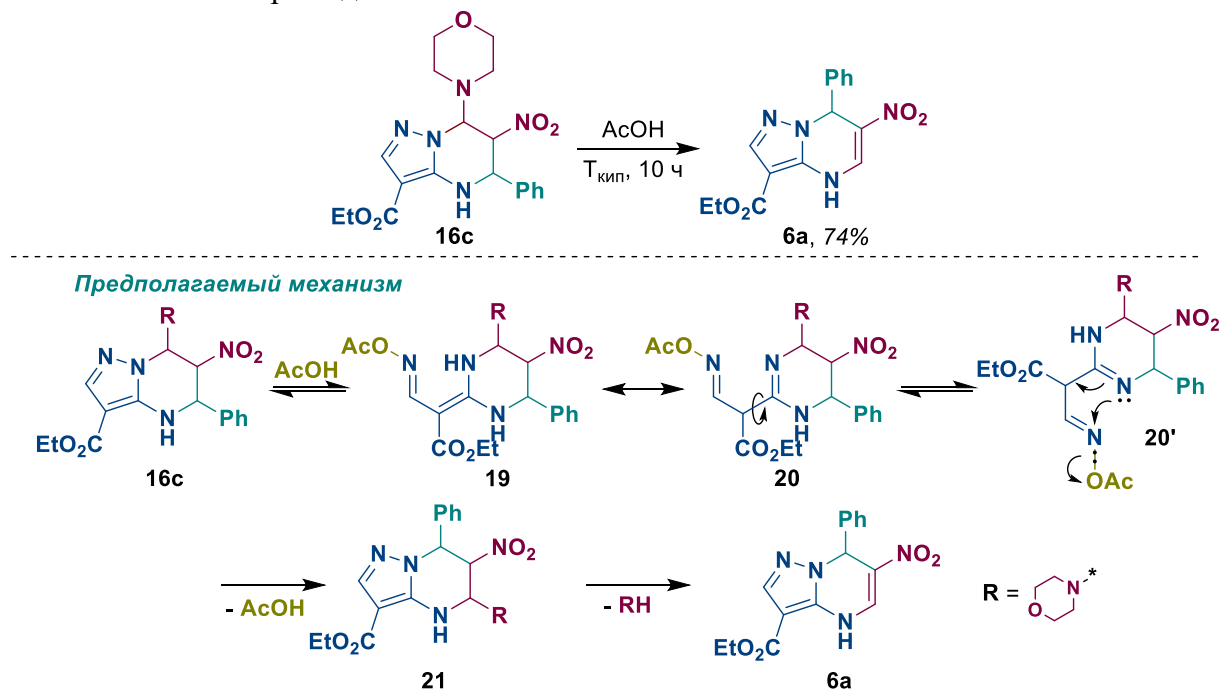


Схема 11. Предполагаемый механизм перегруппировки соединений **16**

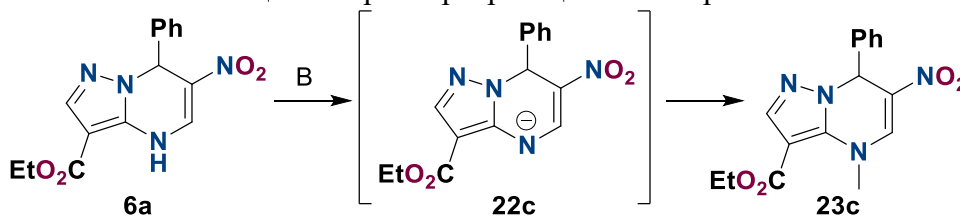
Таким образом, в рамках разработки метода синтеза 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов нами были исследованы механизмы протекания реакции при катализе двумя

различными типами кислот – Брендстеда и Льюиса. Было установлено, что взаимодействие NSE **2** с $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ приводит к образованию соответствующего нитроалкина **13**, который далее быстро присоединяется к аминоазолу **1** и циклизуется с альдегидами **3** при повышенной температуре. В свою очередь, проведение мультикомпонентного процесса в уксусной кислоте приводит к образованию тетрагидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов **16**, претерпевающих при нагревании в уксусной кислоте перегруппировку с образованием, по всей видимости, более стабильных гетероциклов **6a**. В обоих случаях интермедиаты **12,16**, подтверждающие предполагаемые реакционные пути, были выделены и охарактеризованы.

Глава 2.3. Алкилирование 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов

Далее мы исследовали возможность алкилирования 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Проявление кислотных свойств азотистых гетероциклов, содержащих эндоциклическую NH-группу, является их фундаментальным свойством: во-первых, появляется возможность привить к структуре фрагменты, изменяющие физиологические проявления молекулы, во-вторых, образование соли на порядки увеличивает биодоступность самих 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. По этим причинам нами были опробованы методики как одностадийного алкилирования исследуемых гетероциклов, так и с выделением промежуточной соли. Данные для оптимизируемой реакции приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Параметры реакции алкилирования



Параметры реакции алкилирования

№	Растворитель	Основание	Метилирующий агент	Температура метилирования, °С	Выход, %
1	DMF	NEt_3	Me_2SO_4	70	-
2	DMF	K_2CO_3 1.5 экв	Me_2SO_4	55	58
3	DMF	K_2CO_3 1.5 экв	MeI	55 (автоклав)	73
4*	1)EtOH 2)DMF	NaOH	MeI	55 (автоклав)	65
5*	1)EtOH 2)DMF	NaOH	Me_2SO_4	55	55
6*	1)THF 2)DMF	NaN	MeI	55 (автоклав)	19

* Методики с выделением соли **22**. Первый растворитель для образования соли, второй для алкилирования.

Использование органического основания (Таблица 3, № 1) не привело к образованию целевого продукта метилирования, поскольку основность триэтиламина оказалась недостаточна для образования соответствующей соли. Метилирование без выделения промежуточной соли (Таблица 3, № 2,3) в случае оптимизируемой реакции показало наилучшие выходы в сравнении с двухстадийным процессом (Таблица 3, № 4-6). Среди примеров с выделением соли для оптимизируемой реакции наименее удачным оказалось использование гидрида натрия в тетрагидрофуране с дальнейшим алкилированием метилиодидом (Таблица 3, № 6). Следует отметить, что при выделении соли из этанола необходимо дополнительно осушить продукт от растворителя в эксикаторе, поскольку без этого соль может разрушаться до исходного гетероцикла.

Таким образом, нами был получен ряд 4-метил-6-нитро-5-*R*-7-*R*¹-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов **23** при использовании карбоната калия и диметилформамида с выходами от средних до хороших (Схема 12). При проведении реакции алкилирования мы столкнулись с проблемой: 5-метил-6-нитро-7-

фенилпиразоло[1,5-*a*]пиримидины **23d,f,h** либо не образовывались совсем, либо наблюдались лишь их следовые количества. Причём подобная ситуация повторялась при использовании различных реакционных условий и алкилирующих агентов, таких как диметилсульфат, метилиодид и диметилформаида диметилацеталь.

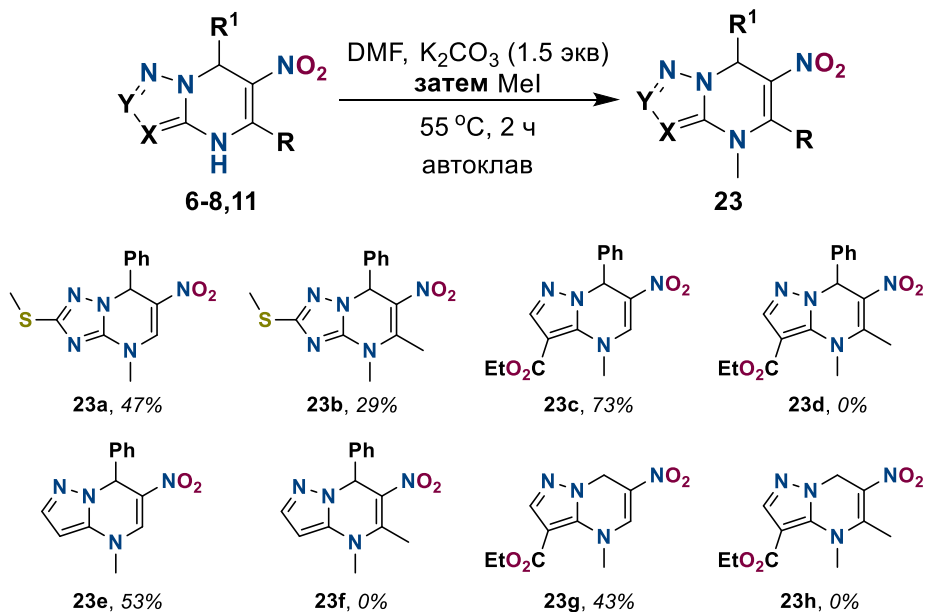


Схема 12. Получение 4-метил-6-нитро-5-*R*-7-*R'*-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов **23**

По этой причине мы попробовали провести алкилирование азолиленамина **12a**, чтобы в дальнейшем зациклизовать его в желаемый продукт. Однако, мы столкнулись с любопытным результатом – при использовании выбранной ранее алкилирующей системы нами был получен 2-амино-(4-этоксикарбонил)-1'-метилпиразолил-1-нитропропилен **24** (Схема 13). В этом случае алкилированию подвергался однозначно менее кислотный гетероциклический N-атом. К тому же, вследствие стерических затруднений алкилировался N_(1')-атом, а не N₍₂₎. По всей видимости, стерические факторы и являются основным препятствием для получения 4,5-диметил-6-нитро-7-фенил-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **23d,f,h**.

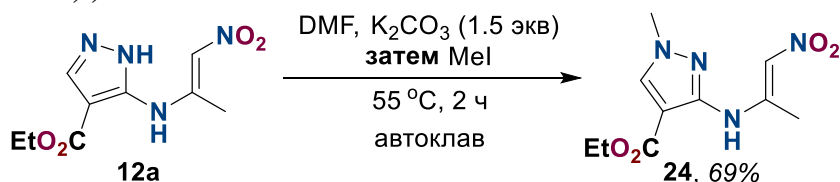


Схема 13. Алкилирование 2-амино-(4-этоксикарбонил)-пиразолил-1-нитропропилена **22a**

Таким образом, нами была исследована реакция алкилирования полученных ранее 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Было установлено, что исследуемые соединения обладают достаточной кислотностью, чтобы образовывать соли с не самыми сильными неорганическими основаниями. Проявление кислотных свойств таких гетероциклов крайне полезное и перспективное явление для потенциально биологически активных соединений, поскольку способности к алкилированию и солеобразованию предоставляют возможность к получению как более биодоступных соединений, так и к дополнительным модификациям.

Глава 2.4. Окисление 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов

Следующим этапом работы стало исследование возможности окисления 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Образование полностью ароматической системы интересно с нескольких точек зрения – во-первых, изменяется геометрия молекул, что однозначно сказывается на проявлении их биологической активности. Во-вторых, ароматичные структуры обладают уникальными химическими свойствами, позволяющими проводить дальнейшие актуальные модификации гетероциклической системы.

Из литературы известно, что 6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидины **26** получают при взаимодействии аминоазолов с калиевой солью нитромалонового диальдегида **25** в кислой среде. Дальнейшие исследования таких гетероциклов **26** показали, что они способны вступать в реакции присоединения по положению 7 с различными нуклеофилами, такими как π -избыточные гетероциклы, α -СН-кислоты и полифенолы (Схема 14).

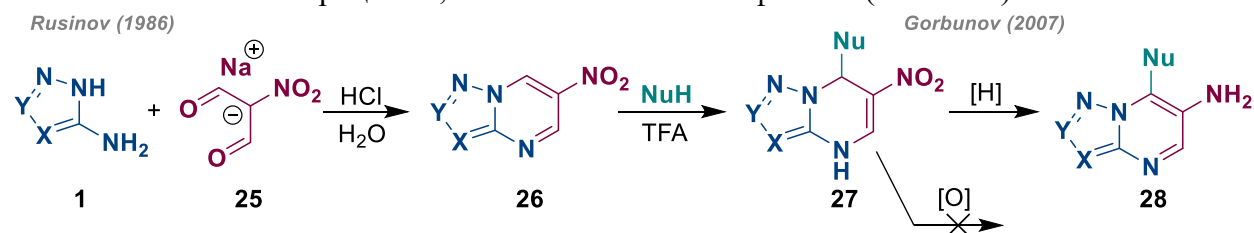
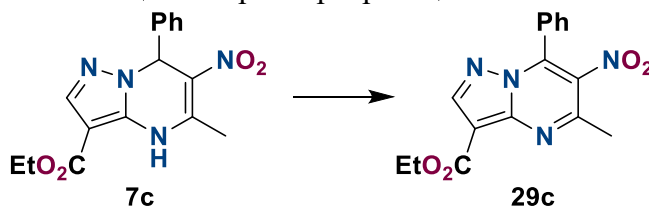


Схема 14. Попытки окисления 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов, описанные в литературе

Следует отметить, что получение 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов **27** подобным способом имеет определенные принципиальные недостатки. Например, исключительно нуклеофильный вариант структурных модификаций, ограниченность возможных позиций для модификации, двухстадийная процедура синтеза, а также труднодоступность получения нитромалонового диальдегида. Помимо этого, для таких гетероциклов **27** была постулирована невозможность ароматизации, поскольку попытки окисления приводили либо к неудачным результатам, либо к смеси неидентифицируемых продуктов. Для окисления применялся метод «восстановительной автоароматизации», при котором во время восстановления нитрогруппы протекает самопроизвольная ароматизация гетероциклической системы (Схема 14).

Основываясь на имеющихся в литературе данных, а также на полученных ранее результатах, нами было проведено исследование возможности окисления 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов с сохранением нитрогруппы. Так, на примере соединения **7с** было проведено исследование влияния природы растворителей и окислителей на выход продукта модельной реакции. Результаты продемонстрированы в Таблице 4.

Таблица 4. Параметры реакции окисления



№	Растворитель	Окислитель	Температура, °С	Время реакции, ч	Выход, %
1	H ₂ O	KMnO ₄ , NaOH	25	1	-
2	TFA	O ₂	25	10	-
3	CH ₂ Cl ₂	DDQ	25→40	5	-
4	MeCN	DDQ	25→80	5	-
5	CH ₂ Cl ₂	DMP	25	5	-
6	AcOH	PCC	50	5	49
7	CH ₂ Cl ₂	PIDA	25→40	5	-
8	AcOH	PIDA	100	1	81

Установлено, что исследуемое вещество **7с** разлагается при действии сильного неорганического окислителя (Таблица 4, № 1) и не окисляется кислородом в кислых условиях (Таблица 4, № 2), дихлордидиазобензохиноном (Таблица 4, № 3,4), реактивом Десса-Мартина (Таблица 4, № 5) и фенилйоддиацетатом (Таблица 4, № 7). Тем не менее, использование пиридинхлорхромата (Таблица 4, № 6) и фенилйоддиацетата (Таблица 1, № 8) в уксусной кислоте при повышенной температуре приводит к образованию гетероцикла **29с** выходами 49 и 81%, соответственно. Таким образом, при использовании фенилйоддиацетата в уксусной кислоте при соответствующей температуре нами был

получен ряд ранее неизвестных 5-метил-6-нитро-7-фенилазоло[1,5-*a*]пиримидинов **42** с выходами от умеренных до отличных (Схема 15).

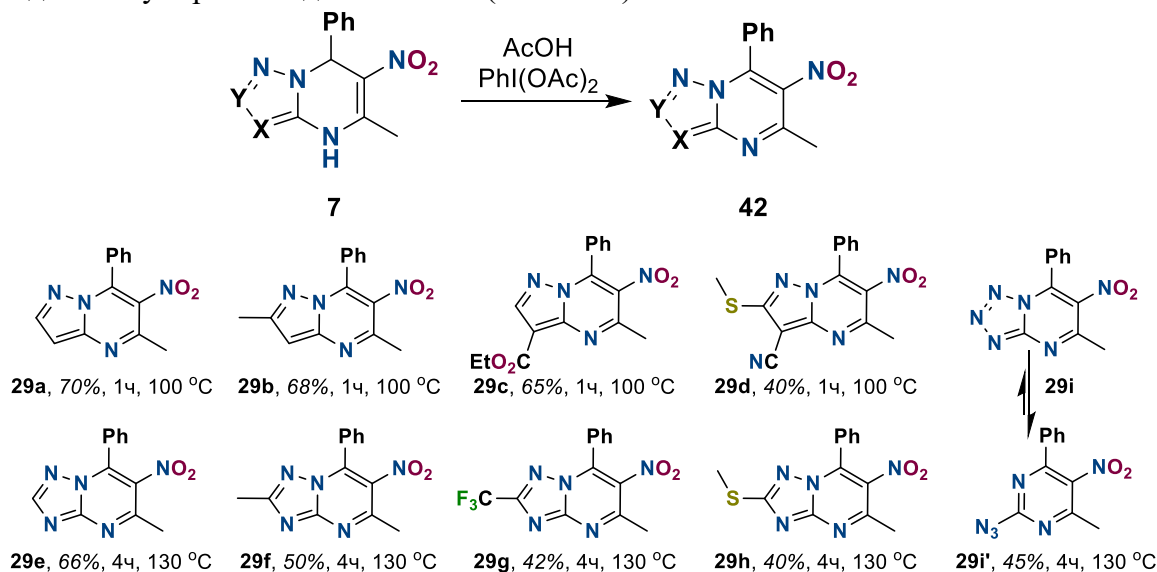


Схема 15. Получение 5-метил-6-нитро-7-фенилазоло[1,5-*a*]пиримидинов **29**

Окисление триазоло- и тетразолопиримидинов **7e-i** происходит в более жестких условиях, чем пиразольных производных **7a-d**: для проведения процесса требуется как более высокая температура, так и большее время выдержки. По всей видимости, это связано с повышением π -дефицитных свойств пятичленных гетероциклов при увеличении числа N-атомов. Особенностью же тетразольного производного **29i** является образование продукта азидо-тетразольной таутомерии 2-азидо-6-метил-5-нитро-4-фенилпиримидина **29i'**, что подтверждается данными ИК-спектроскопии, где наблюдается сильная полоса в области 2143 cm^{-1} .

Таким образом, нами была реализована окислительная ароматизация дигидронитропиримидинов типа **7**, ранее считавшаяся невозможной. Следующим шагом стало окисление описанных выше 6-нитро-7-фенил-5-R-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **8**. Как и в случае варьирования азольной составляющей, рассматриваемые гетероциклы **8** были успешно дегидрированы (Схема 16).

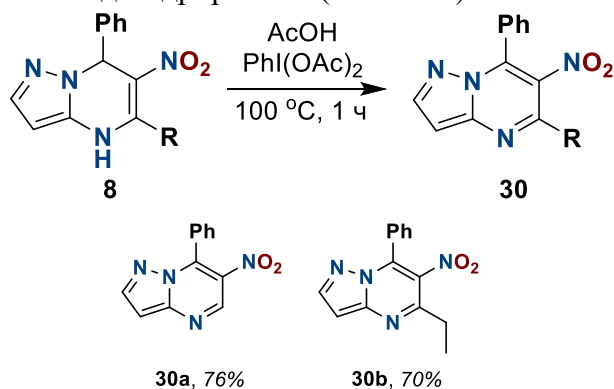


Схема 16. Получение 6-нитро-7-фенил-5-R-пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **30**

Наконец, были окислены 5-метил-6-нитро-7-R-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидины **9** с заместителями различной электронной природы в положении 7 при использовании аналогичной методики. Однако, при проведении дегидрирования мы обнаружили, что взаимодействие гетероцикла **9d** с фенилйоддиацетатом даже при комнатной температуре приводит к осмолению реакционной массы. Окисление гетероциклов **9c** и **9e** также сопровождается образованием побочных продуктов, хотя нам и удалось выделить искомые соединения **31c,e** с выходами 24% и 30%, соответственно. Основные результаты представлены на Схеме 17.

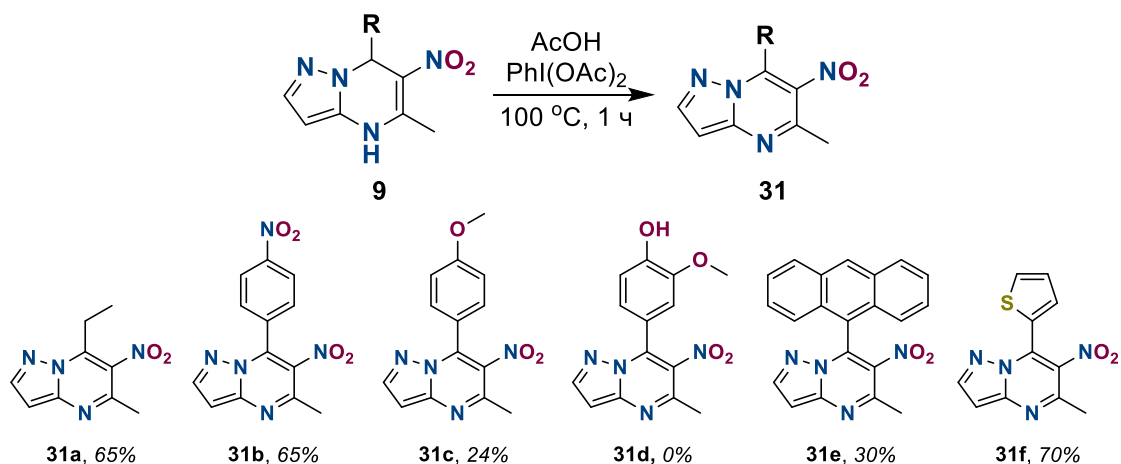


Схема 17. Получение 5-метил-6-нитро-7-*R*-пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **31**

Таким образом, результаты настоящей работы опровергают заявленную в литературе невозможность окисления 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Окисление осложняется только в случае соединений с электрондонорным заместителем в положении 7.

Для получения более полной информации, касающейся особенностей окисления, мы попробовали определить побочные продукты реакции. Так, при окислении нитропиразолопиримидина **9e** помимо основного продукта **31e** методом флеш-хроматографии были выделены также 9-ацетокси-10-оксоантрацен **32** и антрахинон **33** (Схема 18).

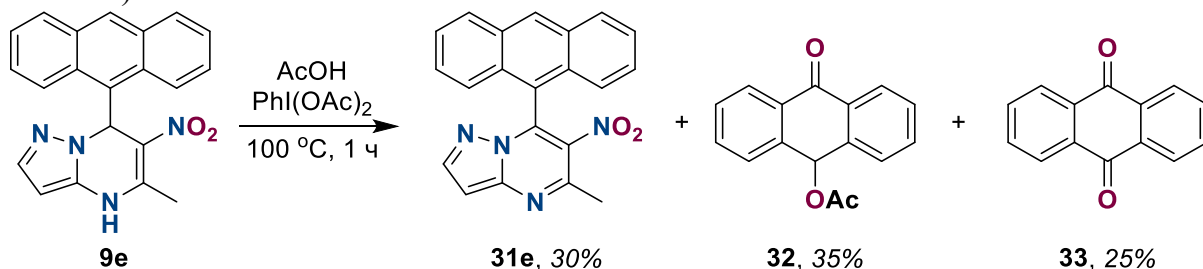


Схема 18. Окисление 7-(антрацен-9-ил)-5-метил-6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидина **9e**

Для обоснования экспериментальных данных мы провели квантово-химический расчет¹ соединений **7a**, **9a-e** для установления конфигурации ВЗМО. На Рисунке 3 представлены результаты для соединений **9b** и **9e**.

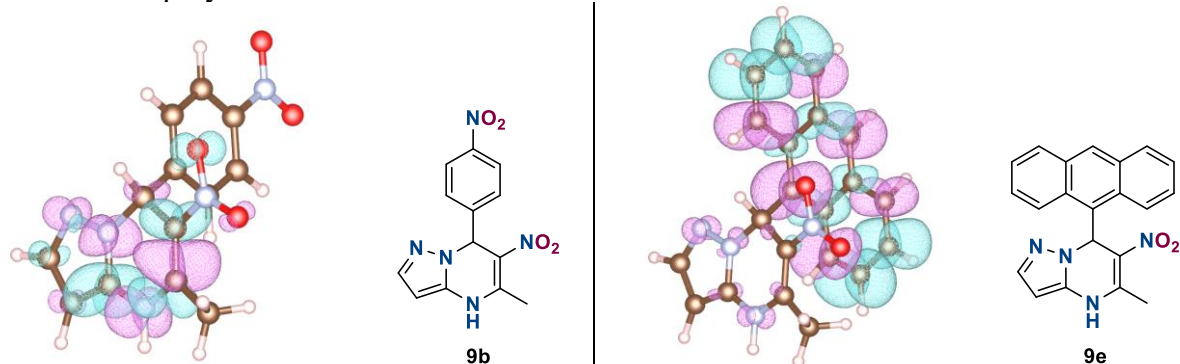


Рисунок 3. Визуальное представление ВЗМО, полученное в приближении РВЕ0 для соединений **9b** и **9e**

Действительно, данные расчетов демонстрируют, что в соединениях с электрондонорным заместителем в положении 7 происходит вовлечение заместителя в

¹ За проведение квантово-химических расчетов автор выражает благодарность сотруднику Института Металлургии УрО РАН И.А. Балякину

распределение электронной плотности, что может оказывать серьезное влияние на направление окисления. По этой причине в данных структурах, предположительно, разрывается ковалентная связь атома C(7) и арильного заместителя, и происходит нестехиометрическое образование побочных продуктов окисления.

Кроме того, на различное поведение соединений **9** в условиях окисления указывают результаты циклической вольтамперометрии² (Рисунок 4). Так, для соединения **9b** наблюдается один необратимый пик двухэлектронного окисления. Напротив, соединение **9e** характеризуется двумя пиками, по-видимому, одноэлектронного окисления.

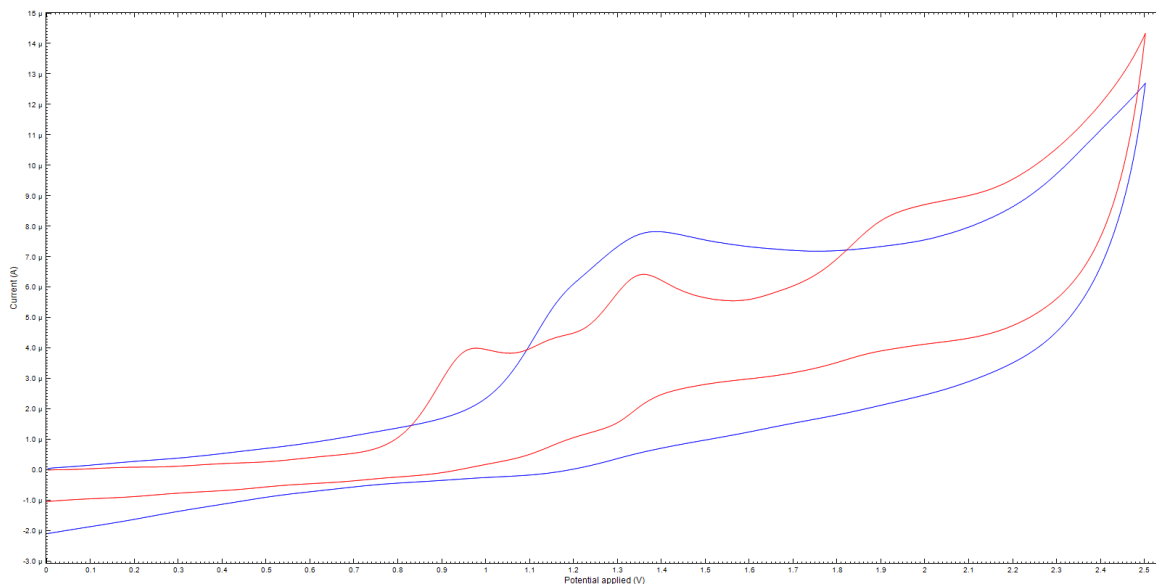


Рисунок 4. Циклические вольтамперограммы соединений **9b** (синяя) и **9e** (красная), $C = 5 \cdot 10^{-3}$ М в CH_3CN в присутствии $\text{N}(n\text{-Bu})_4\text{PF}_6$ 0.1 М; скорость съемки 100 мВ/с; стеклянный графитовый рабочий электрод, стеклянный графитовый противоэлектрод, Ag/AgNO_3 (0.01 М) электрод сравнения

Таким образом можно сделать вывод, что 6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидины, даже содержащие электрондонорный заместитель в положении 7, способны к окислению с образованием ароматической структуры. С другой стороны, при окислении необходимо учитывать особенности этих структур, поскольку реакция может осложняться побочными процессами. Однако, нет оснований полагать, что подобные соединения нельзя получить при помощи какого-либо альтернативного синтетического подхода, исключающего деструктивный характер ключевых полупродуктов. В свою очередь, полученные экспериментальные и теоретические данные хорошо коррелируют друг с другом, что свидетельствует о возможности применения такого набора методов для исследования реакций окисления данного класса органических соединений.

Глава 2.5. Ингибирование казеинкиназы 2 (СК2) и противоопухолевая активность 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов

Заключительным этапом работ в диссертации стал поиск применения полученных нитросодержащих азоло[1,5-*a*]пиримидинов. Для этого нами была исследована ингибирующая активность соединений ряда 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов в отношении СК2 и их цитотоксический эффект в отношении культивируемых опухолевых клеток глиобластомы человека (A-172), эмбриональной рабдомиосаркомы (Rd) и остеосаркомы человека (Hos), а также эмбриональных клеток почки человека (НЕК-293).

Для этих исследований нами использовались несколько полученных в предыдущих разделах 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов, а также новые производные этого

² За проведение электрохимического исследования автор выражает благодарность старшему научному сотруднику лаборатории координационных соединений Института Органического Синтеза УрО РАН к.х.н. А.В. Щепочкину

ряда, синтезированные специально для установления закономерностей структура/активность. Синтез этих соединений проиллюстрирован на Схеме 19.

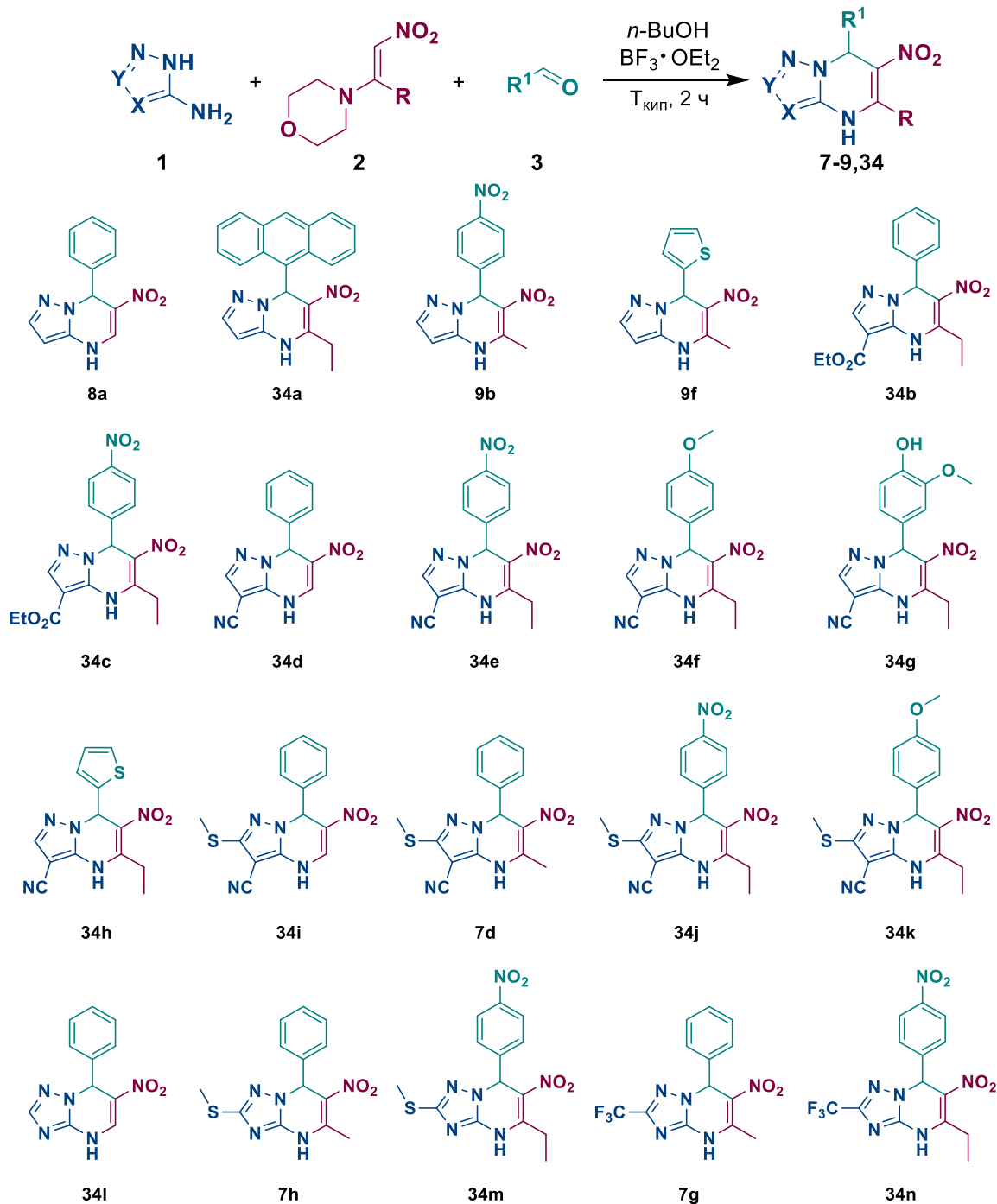


Схема 19. Синтез 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов **7-9,34** для исследования противоопухолевой активности

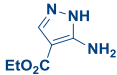
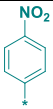

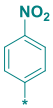


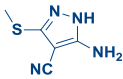

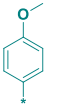
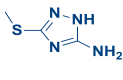
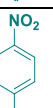

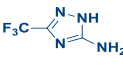
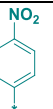
2.5.1. Ингибирование казеинкиназы 2

Первоначально полученные соединения были оценены в отношении человеческой рекомбинантной СК2 с помощью анализа ADP-Glo™³ (Таблица 5). Первичный скрининг при 50 мкМоль показал, что большинство соединений парадоксально усиливают активность СК2, либо не проявляют вовсе (значения н.а. в Таблице 5). Умеренное ингибирование продемонстрировали соединения **34с**, **34е**, **34h**, **34i** и **34n**, среди которых производные **34с**, **34е** и **34h** оказались наиболее активными ингибиторами. Количественные

³ Исследование проводилось в сотрудничестве с ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» под руководством академика РАН, д.м.н., проф. А.А. Спасова

исследования показывают, что соединения **34c**, **34e**, **34h** и **34i** являются микромолярными ингибиторами, в то время как **34n** имеет наиболее низкую активность (Таблица 6). Коэффициент Хилла около (-1) показывает, что наиболее активные соединения, а также препарат сравнения «Стауроспорин», ведут себя как классические ингибиторы, которые связываются с одним киназным сайтом.

Таблица 5. Результаты биологических испытаний наиболее активных соединений

№	Аминоазол	R	R ¹	Клеточные линии IC ₅₀ , мкМоль				Ингибирование СК2 (m±SD), Δ%
				A-172	Rd	Hos	Hek-293	
34c		Et		212.4 ± 42.9	122.0 ± 13.5	170.1 ± 11.2	35.9 ± 4.3	53.81±0.42
34e		Et		323.4 ± 22.7	378.6 ± 20.4	235.0 ± 25.8	153.5 ± 12.4	54.80±0.87
34h		Et		110.2 ± 3.0	89.4 ± 10.5	77.3 ± 3.1	107.6 ± 11.1	66.81±7.97**
34i		H		77.8 ± 4.0	124.7 ± 6.8	92.9 ± 3.9	162.3 ± 10.0	48.35±4.48*
7d		Me		13.4 ± 1.0	27.5 ± 2.8	18.5 ± 1.8	211.7 ± 10.8	н.а.
34k		Et		22.5 ± 2.9	36.3 ± 3.4	28.1 ± 3.9	169.3 ± 10.9	н.а.
34m		Et		41.3 ± 4.1	71.1 ± 6.4	40.9 ± 4.1	227.5 ± 25.2	н.а.
7g		Me		27.5 ± 1.7	37.3 ± 3.8	23.3 ± 1.8	50.1 ± 4.4	н.а.
34n		Et		82.4 ± 2.2	192.7 ± 10.3	93.7 ± 5.9	54.2 ± 5.3	39.82±19.52
Стауроспорин								72.34±6.39**
Цисплатин				3.64 ± 0.21	4.99 ± 0.31	2.36 ± 0.12	4.41 ± 0.24	

н.а. – не активно; *p < 0.05. **p < 0.01 - значение vs. DMSO-контроль. Тест Крускала-Уоллеса

Таблица 6. Ингибирование СК2 наиболее активными соединениями

Соединение	СК2 IC ₅₀ (μМ)	95% С.И. (μМ)	Коэффициент Хилла
34c	52.83	39.12 – 59.08	-1.369
34e	59.47	32.99 – 66.81	-1.566
34h	52.26	30.10 – 105.80	-1.183
34i	57.20	57.14 – 57.26	-2.947
34n	>100	–	–
Стауроспорин	69.85	50.96 – 98.39	-0.974

2.5.2. Противоопухолевая активность

Параметры IC₅₀ в отношении 4 линий опухолевых клеток были рассчитаны на основании результатов МТТ-теста⁴ (Таблица 5). В целом, полученные значения варьируются в интервале от 13 мкМ до > 650 мкМ. Наибольшее снижение жизнеспособности опухолевых клеток отмечается при рассмотрении соединений **7d**, **34k**,

⁴ За проведение цитотоксического исследования автор выражает благодарность зав. лабораторией первичного биоскрининга, клеточных и генных технологий УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, к.м.н. В.В. Мелехину

34m и **7g**. Важно отметить, что для наиболее активных производных азолопиримидинов более выражено подавляют жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению с эмбриональными клетками почек человека (Рисунок 5,6).

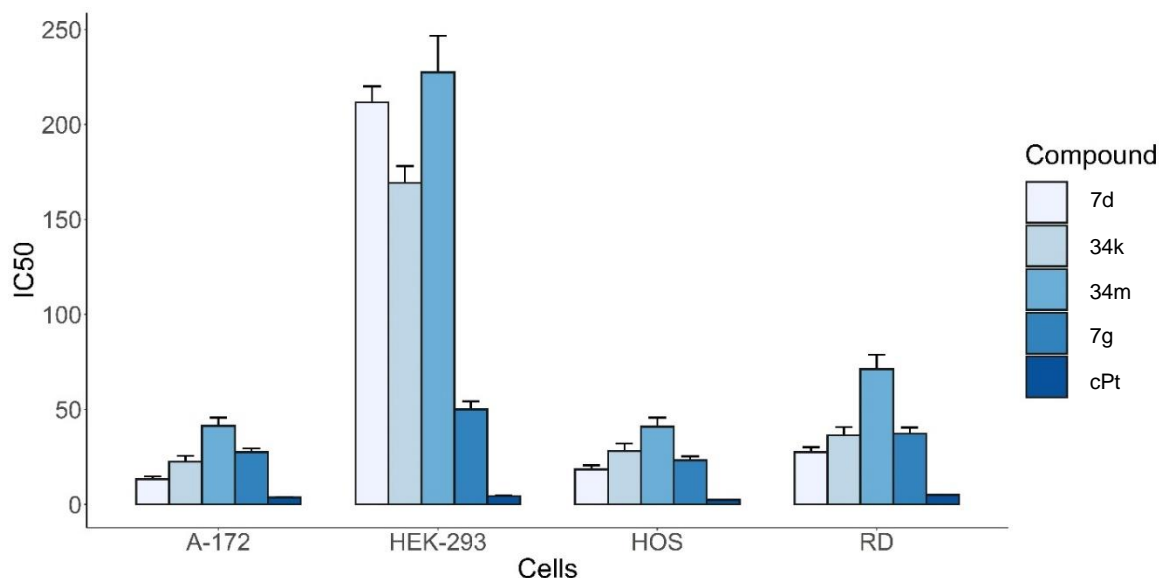


Рисунок 5. Цитотоксический индекс $IC_{50} \pm SE$ для соединений **7d**, **34k**, **34m** и **7g** в сравнении с Цисплатином (сPt)

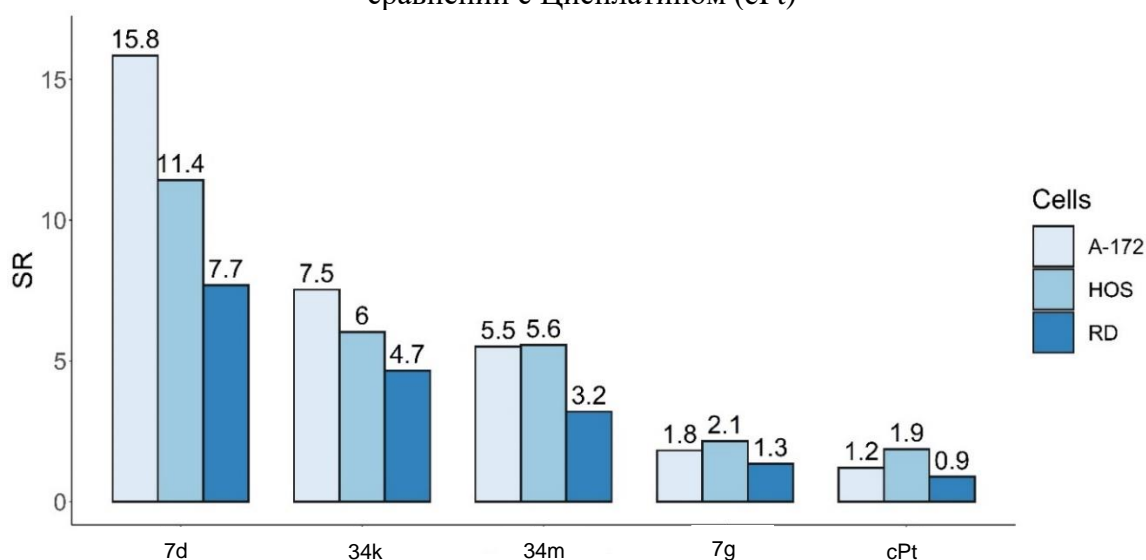


Рисунок 6. Сравнение коэффициентов селективности (нормальные/опухолевые клетки)

Было установлено, что IC_{50} для соединений **7d**, **34k**, **34m** и **7g** при исследовании линий опухолевых клеток в основном не превышает 50 мкМ, в то время как показатель цитотоксичности на эмбриональных клетках превышает 169 мкМ (**7d**, **34k**, **6m**). Следует отметить, что соединение **7g**, содержащее триазольный фрагмент с трифторметильной группой в структуре, имеет схожие микромолярные значения IC_{50} для клеток почек и опухолевых клеток. Наименьший цитотоксический эффект на неопухолевые клетки был определен для соединения **34m** (227.5 мкМ). Таким образом, результаты показывают, что гетероцикл **7d** может обладать наиболее выраженными противоопухолевыми свойствами, и с осторожностью позволяют предполагать наличие избирательной противоопухолевой активности у этого соединения.

Между тем, механизмы подавления роста культивируемых клеток остаются неясными и требуют дальнейшего изучения. Можно предположить, что экспериментальные данные цитотоксического действия не полностью объясняются

влиянием на СК2. С одной стороны, отмечено, что азоло[1,5-*a*]пиримидины **34h**, **34i** и **34n** ингибируют как ферментативную активность СК2, так и жизнеспособность опухолевых клеток. С другой стороны, соединения **7d**, **34k**, **34m**, **7g** значительно подавляют рост неопластических клеток, не влияя на СК2. Можно предположить, что цитотоксический эффект синтезированных соединений может быть обусловлен воздействием на другие внутриклеточные мишени.

Что касается выявления закономерностей в ряду структура/активность, то нельзя сделать каких-либо однозначных выводов: некоторые результаты свидетельствуют о том, что для ингибирования СК2 и проявления цитотоксического действия благоприятным представляется наличие цианогруппы в положении 3 пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов, а также наличие метилтиогруппы в положении 2 азоло[1,5-*a*]пиримидинов. Также наиболее удачные результаты показали соединения с наличием метильной или этильной группы в положении 5 в сравнении со структурами, где этот заместитель отсутствует. С точки зрения фрагмента в положении 7, стабильно хорошие результаты демонстрируют соединения с фенильным и с *p*-нитрофенильным заместителем. Также неплохие результаты в единичных случаях дают соединения с тиофенильным и анизольным заместителем, а наименее удачный результат в обоих методах исследований показало соединение с ванилиновым остатком.

Заключение

При выполнении диссертационной работы получены следующие результаты:

- ❖ разработан новый метод синтеза 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Исследована толерантность этой мультикомпонентной реакции, а также реакционный путь процесса. На основании полученных ключевых полупродуктов были установлены различные реакционные пути процесса, зависящие от типа используемого кислотного катализатора – кислоты Льюиса или кислоты Бренстеда;
- ❖ разработана методика алкилирования полученных 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Установлено, что наличие метильного заместителя в положении 5 азоло[1,5-*a*]пиримидинов существенно влияет на протекание алкилирования вследствие наличия избыточных пространственных затруднений;
- ❖ разработан метод окисления полученных 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Были опровергнуты литературные данные о невозможности окисления подобного рода структур. На основании выделенных побочных продуктов окисления, квантово-химических расчетов и электрохимического окисления был предположен механизм окисления и окислительной деструкции рассматриваемых структур;
- ❖ была создана библиотека соединений ряда 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов с целью исследования их на способность ингибирования СК2, а также цитотоксических свойств в отношении опухолевых и нормальных клеток. В результате биологических испытаний было установлено, что рассматриваемые соединения ингибируют как ферментативную активность СК2, так и жизнеспособность опухолевых клеток. На основании полученных результатов были выявлены наиболее перспективные структуры для дальнейшего исследования подобных свойств, а также сделаны некоторые выводы о зависимости структура/активность.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшее развитие темы может быть связано с более глубоким изучением механизмов разработанной мультикомпонентной реакции с целью внесения новых знаний в фундаментальную базу схожих превращений, а также получения энантиомерно чистых 6-нитро-4,7-дигидроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. С химической точки зрения интересным представляется рассмотрение конкурирующих реакций восстановления нитрогруппы и двойной связи в 4,7-дигидро-производных, а также разработка дальнейших способов модификации ароматических 6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Помимо этого, безусловно интересным представляется исследование аналогичных противоопухолевых свойств 6-

нитроазоло[1,5-*a*]пиримидинов, и в целом дальнейший поиск биологически перспективных молекул в полученных рядах соединений.

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ:

1. **Lyapustin, D.N.** Three-Component Coupling of Aromatic Aldehydes, 1-Morpholino-2-nitroalkenes, and 3-aminoazoles via Boron Trifluoride Etherate Catalysis: Reaction Pathway and Features of the Formation of Intermediates / **D. N. Lyapustin**, E. N. Ulomsky, T. O. Zanaxov, V. L. Rusinov. // *Journal of Organic Chemistry*. – 2019. – Vol. 84, Issue 23. – P. 15267 – 15275. (0.563 п.л./0.141 п.л.). (*Scopus, Web of Science*).

2. **Lyapustin, D.N.** 6-Nitro-4,7-dihydroazolo[1,5-*a*]pyrimidines: an alternative mechanism of formation and studies of alkylation / **D. N. Lyapustin**, E. N. Ulomsky, V. L. Rusinov // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2020. Vol. 56, Issue 11. – P. 1465 – 1472. (0.500 п.л./0.167 п.л.). (*Scopus, Web of Science*).

3. **Lyapustin, D.N.** Oxidative Aromatization of 4,7-Dihydro-6-nitroazolo[1,5-*a*]pyrimidines: Synthetic Possibilities and Limitations, Mechanism of Destruction, and the Theoretical and Experimental Substantiation / **D. N. Lyapustin**, E. N. Ulomsky, I. A. Balyakin,, A. V. Shchepochkin, V. L. Rusinov, O. N. Chupakhin // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, Issue 16. – P. 4719. (1.188 п.л./ 0.198 п.л.). (*Scopus, Web of Science*).

4. **Lyapustin, D.N.** CK2 Inhibition and Antitumor Activity of 4,7-Dihydro-6-nitroazolo[1,5-*a*]pyrimidines / **D. N. Lyapustin**, S. K. Kotovskaya, I. I. Butorin, E. N. Ulomsky, V. L. Rusinov, D. A. Babkov, A. A. Pokhlebin, A. A. Spasov, V. V. Melekhin, M. D. Tokhtueva, A. V. Shcheglova, O. G. Makeev // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, Issue 16. – P. 5239. (0.875 п.л./0.073 п.л.). (*Scopus, Web of Science*).

5. **Lyapustin, D.N.** Recent advances in the chemistry of two-carbon nitro-containing synthetic equivalents / **D. N. Lyapustin**, V. V. Fedotov, E. N. Ulomsky, V. L. Rusinov, O. N. Chupakhin // *Russian Chemical Reviews*. – 2023. – Vol. 92, № 4. – RCR5077 (3.688 п.л./0.748 п.л.). (*Scopus, Web of Science*).

Другие публикации

6. **Ляпустин Д.Н.** Азаиндолизины в качестве ключевых предшественников азолопуринов / **Д. Н. Ляпустин**, Е. Н. Уломский, Т. О. Занахов, Н. И. Ефименко, В. Л. Русинов // Научная конференция Марковниковские чтения. Органическая химия: От Марковникова до наших дней (WSOC 2019): Тезисы докладов – Москва, Красновиново, 2019. – С. 61. (0.060 п.л./0.012 п.л.).

7. **Lyapustin D.N.** 6-Nitroazolo[1,5-*a*]pyrimidines. Synthesis and properties / **D. N. Lyapustin**, E. N. Ulomsky, T. O. Zanaxov, N. I. Efimenko, V. L. Rusinov // Международная конференция «XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии»: Тезисы докладов – Санкт-Петербург, 2019. – С. 184 (0.060 п.л./0.012 п.л.).

8. **Ляпустин Д.Н.** 4,7-Дигидро-6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидины: изучение механизма образования и некоторых химических свойств. / **Д. Н. Ляпустин**, Е. Н. Уломский, В. Л. Русинов // IV Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM2020): Тезисы докладов – Екатеринбург, 2020. – С. OR-23 (0.060 п.л./0.020 п.л.).

9. **Ляпустин Д.Н.** 4,7-Дигидро-6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидины: получение мультикомпонентной реакцией, механизмы образования и химические свойства / **Д. Н. Ляпустин**, **Е. Н. Уломский**, В. В. Федотов, В. Л. Русинов // Первая всероссийская школа по медицинской химии для молодых ученых «MedChemSchool2021»: Тезисы докладов – Новосибирск, 2021. – С. 96 (0.060 п.л./0.015 п.л.).

10. **Ляпустин Д.Н.** Новый подход к синтезу 4,7-дигидро-6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидинов – потенциальных ингибиторов казеинкиназы 2 / **Д. Н. Ляпустин**, Е. Н. Уломский, В. В. Федотов, В. Л. Русинов, С. К. Котовская, А. А. Спасов, Д. А. Бабков // 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021»: Тезисы докладов – Волгоград, 2022. – С. 239 (0.060 п.л./0.009 п.л.).