

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

На правах рукописи



МУХИН Евгений Максимович

**3-ГАЛОГЕНПИРАЗОЛО[1,5-*a*]ПИРИМИДИНЫ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И
ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ**

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2025

Работа выполнена на кафедре органической и биомолекулярной химии и в лаборатории органического синтеза Научно-образовательного и Инновационного центра химико-фармацевтических технологий Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН,
РУСИНОВ Владимир Леонидович

Официальные оппоненты:

ФЕДОРОВ Алексей Юрьевич,
доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. НИ. Лобачевского», заведующий кафедрой органической химии химического факультета;

ФИЛЯКОВА Вера Ивановна,
доктор химических наук, профессор, ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, ведущий научный сотрудник лаборатории гетероциклических соединений;

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

Защита диссертации состоится «07» апреля 2025 г. в 14:00 ч на заседании диссертационного совета УрФУ 1.4.06.09 по адресу: 620062, 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=6939>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Поспелова Татьяна Александровна

галогенирование N-бром- или N-иодсукцинимидом предварительно синтезированных пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов;

- Исследована реакционная способность 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов в реакциях с литийорганическими реагентами, а также металлическим магнием. Показано, что 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидины способны вступать в реакцию обмена «галоген-литий» с последующим взаимодействием с электрофилом с образованием новой C-C-псевдогликозидной связи;

- Обнаружен ряд необычных, ранее не описанных, превращений, основанных на СН-кислотности метильных заместителей в 3-бром-5,7-диметилпиразоло[1,5-*a*]пиримидине в присутствии сильных оснований. Также показано, что действием LDA, LiHMDS и *n*-BuLi на 3-бром-7-Н-пиразоло[1,5-*a*]пиримидины могут быть получены димерные структуры в результате, предположительно, нуклеофильного замещения водорода при углеродном C7 атоме.

- Проведены исследования противовирусной активности в отношении коронавируса SARS-CoV-2 и цитотоксичности в системах *in vitro* и *in vivo* для полученных 3-Н- и 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов.

Практическая значимость работы:

- Разработан простой и эффективный подход к получению 3-бром- и 3-иодпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов. Данные соединения представляют интерес не только как самостоятельные молекулы с ценной фармакологической активностью, но и как перспективные предшественники новых C-нуклеозидов;

- На основании полученных экспериментальных данных по реакционной способности 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов в реакциях с литийорганическими реагентами может быть разработан синтез как новых, ранее не описанных C-нуклеозидов, так и димерных структур с потенциально интересными фармакологическими, химическими и физико-химическими свойствами;

- Выявлено, что некоторые 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидины проявляют противовирусную активность в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*. Исследование противовирусной активности *in vivo* соединения-лидера этилового эфира 2-(адамант-1-ил)-3-бром-7-оксопиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты показало значительное преимущество данного соединения перед соединением-прототипом, 3-бензил-5-метил-6-(фенилтио)-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7(3Н)-оном по показателям SI и цитотоксичности, что позиционирует 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидины как новый хемотип с высокой противовирусной активностью.

Личный вклад автора состоял в сборе, систематизации и анализе литературных данных из открытых источников по синтезу и свойствам галогенсодержащих азолоазинов и получению на их основе неприродных C-нуклеозидов за последние 10 лет; постановке целей и задач исследования, проведении экспериментальных синтетических исследований, обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций.

Методология и методы диссертационного исследования

В ходе выполнения диссертационной работы проводился анализ современной литературы по теме исследования и направленный синтез с использованием современных синтетических методологий, а также методов выделения и очистки продуктов реакции. Доказательство структуры и индивидуальности полученных соединений проведено с использованием современных физико-химических (температура плавления, элементный анализ), спектральных (ЯМР, ИК) методов анализа и методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии. В некоторых случаях структура соединений была дополнительно подтверждена при помощи рентгеноструктурного анализа.

Положения, выносимые на защиту:

- Разработка методов синтеза 3-бром- и 3-иодпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов;

- Исследование реакционной способности 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов в реакциях с литийорганическими реагентами, в том числе, с целью образования новой гликозидной С-С связи;
- Изучение противовирусной активности в отношении вируса SARS-CoV-2 и цитотоксичности в системах *in vitro* и *in vivo* для полученных 3-Н- и 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов.

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: 5-я Российская конференция по медицинской химии МедХим-Россия 2021 (Волгоград, 2022 г.), The Sixth International Scientific Conference «Advances in synthesis and complexing» (Москва, 2022 г.), 6-я Международная научно-практическая конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2022 г.), VIII Междисциплинарная конференция Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии (Санкт-Петербург, 2023 г.), 8-я Международная научно-практическая конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2024 г.), 6-ая Российская конференция по медицинской химии МедХим-Россия 2024 (Нижний Новгород, 2024 г.).

Публикации

Основное содержание диссертационного исследования опубликовано в 9 научных работах, из них 3 статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ, индексируемых библиографическими базами Scopus и Web of Science, а также в 6 тезисах международных и всероссийских конференций.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 193 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 123 схемы, 13 таблиц, 27 рисунков. Библиографический список цитируемой литературы содержит 125 наименований.

Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность коллективу кафедры Органической и Биомолекулярной химии ХТИ УрФУ, в частности, научному руководителю чл.-корр. РАН, проф. В. Л. Русинову, к.х.н, доценту К. В. Саватееву за научное руководство и помощь в проведении исследований и подготовке работы, к.х.н С. К. Котовской и коллективу лаборатории под руководством проф., д.х.н. Уломскому Е. Н. за постоянное внимание и помощь в работе, сотрудникам лаборатории комплексных исследований и экспертной оценки органических материалов в составе ЦКП УрФУ (зав. лаб. к.х.н. О. С. Ельцов) за проведение исследований спектроскопии ЯМР, Волковой Н. Н за проведение исследований ГХ-МС, к.х.н. Слепухину П. А. (ИОС УрО РАН, г. Екатеринбург) за проведение рентгеноструктурных исследований, коллективу лаборатории под руководством Вараксина М. В. и коллективу лаборатории под руководством Утеповой И. А. (кафедра ОиБХ ХТИ УрФУ) за консультации по работе с литийорганическими соединениями в инертной атмосфере, коллективу ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под руководством к.б.н. Пьянкова О. В. за проведение исследований противовирусной активности.

Результаты получены в рамках программы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Приоритет 2030» (проект «Противовирусные нуклеозиды в ряду пиримидинов и их азолоаннелированных аналогов»), проекта фундаментальных и поисковых научных исследований Российского научного фонда (проект 22-23-00282).

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 подходы к получению гетероциклов класса С-нуклеозиды, в том числе, на основе галогенсодержащих азолазинов. **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, а также методики проведения биологических испытаний.

Глава 2. Обсуждение результатов

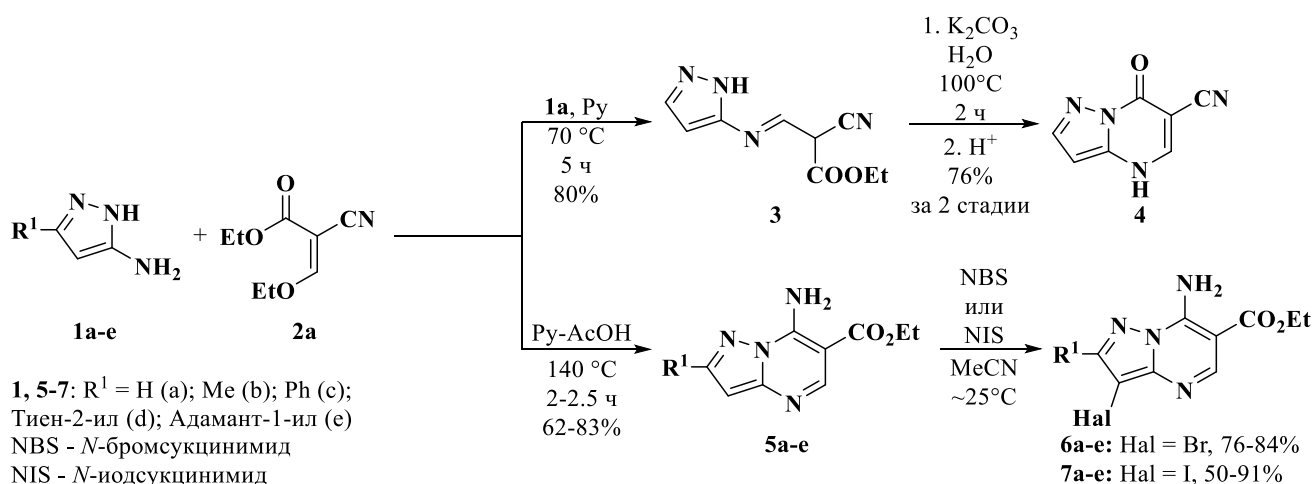
2.1 Разработка методов синтеза 3-бром- и 3-йодпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов

На основании проведённого литературного обзора современных подходов к синтезу С-нуклеозидов и родственных им структур показано, что наиболее распространенным и перспективным является метод прямого образования гликозидной связи «углерод-углерод» между предварительно функционализированными агликоном и (псевдо)углеводом. При этом самый распространенный вариант реализации этого метода – использование бром- и йодсодержащих агликонов, которые активируют металлоорганическими реагентами и вводят в реакцию с (псевдо)углеводами, содержащими электрофильный фрагмент. Также отмечается, что использование производных, содержащих атомы фтора или хлора, для реакции обмена «металл-галоген», зачастую, не приводит к образованию желаемого карбаниона.

Таким образом, одной из ключевых частей данной работы является разработка методов синтеза 3Н-, 3-бром- и 3-йодпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов, как важных молекул для исследования возможностей образования гликозидной С-С связи в присутствии металлоорганических агентов. Кроме того, изучение их строения, химических свойств в целом, а также исследование биологической активности полученных соединений остаётся важной частью исследования.

Одна из классических ретросинтетических схем получения пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов предполагает циклоконденсацию по принципу [3+3], в которой используются аминокпиразолы и различные биелектрофильные синтетические эквиваленты. Возможно два варианта этой стратегии: использование в качестве исходных соединений галогенсодержащих аминокпиразолов или построение бициклической системы и последующее введение атома галогена уже в пиразолопиримидин. Было обнаружено, что циклоконденсация 5-амино-4-галогенпиразолов с различными биелектрофильными молекулами приводит к образованию частично дегалогенированных и полигалогенированных производных, наряду с желаемым продуктом. Введение же галогена в сконструированную предварительно бициклическую систему позволяет избежать образования нежелательных продуктов реакции.

Для получения пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов была проведена циклоконденсация 3-аминопипразолов **1a-e** с этоксиметиленциануксусным эфиром **2a**. При кипячении реагентов **1a-e** и **2a** в смеси пиридина и уксусной кислоты (1:1) в течение 2-2,5 ч были выделены производные этилового эфира 7-аминопипразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **5a-e**. В случае взаимодействия **1a** и **2a** в пиридине при нагревании до 70 °С в течение 5 ч образуется енамин **3**, который при нагревании в растворе карбоната калия циклизуется с участием не нитрильной, а этоксикарбонильной группы, в результате чего был выделен 6-циано-7-оксопипразоло[1,5-*a*]пиримидин **4**, выход которого по двум стадиям составил 76%. Далее была проведена модельная реакция галогенирования *N*-бромсукцинимидом и *N*-йодсукцинимидом этилового эфира 7-аминопипразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **5a**. В результате были получены этиловые эфиры 7-амино-3-бром- и 3-йодпипразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **6a** и **7a** с общим выходами 66% и 63% соответственно (схема 1).



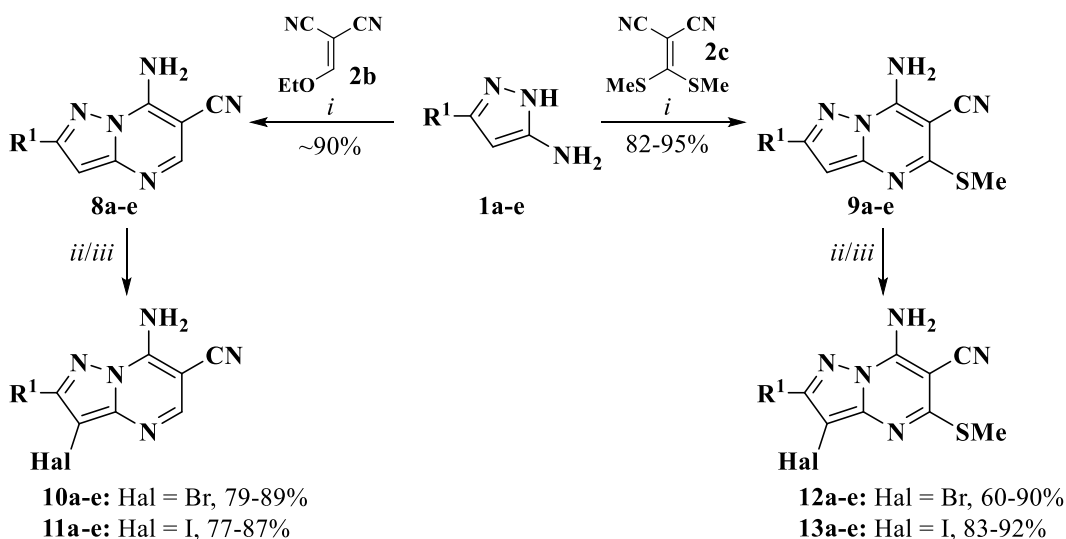
Хороший общий выход целевых продуктов и их химическая индивидуальность стали стимулом для дальнейшей наработки ряда ключевых структур с использованием данного подхода, в результате чего были получены пирозолопиримидины **6b-e** и **7b-e**.

Галогенирование соединений **5a-e** протекает за 4-5 ч при комнатной температуре без использования инертной атмосферы и предварительной подготовки растворителей с хорошими выходами (76-91%). Также стоит отметить простоту выделения продуктов галогенирования **6a-e** и **7a-e**, которая заключается в упаривании MeCN с последующим суспендированием остатка в воде (для удаления образующегося сукцинимид) и фильтровании целевого продукта.

На основании полученных результатов было принято решение использовать для синтеза 3-галогенпирозоло[1,5-*a*]пиримидинов метод, основанный на введении галогена в предварительно сконструированную бициклическую систему, путём циклоконденсации 5-аминопирозолов с различными биелектрофильными молекулами.

Соединения **8a-e** и **9a-e** получены взаимодействием 3-аминопирозолов **1a-e** с производными метиленамалонитрила **2b** и **2c**. В случае циклоконденсации **1a-e** с этоксиметиленамалонитрилом **2b** в среде пиридина только для соединения **8e** наблюдался выход ниже отличного (61%), в остальных же случаях выход продуктов реакции варьировался от 85 до 94%, при этом продолжительность реакции не превышала 3.5 ч, тогда как для образования соединений **9a-e** требовалось до 8 часов. Так, для получения 2-фенил- и 2-(тиен-2-ил)пирозоло[1,5-*a*]пиримидинов **9c**, **9d** требуется непродолжительное кипячение реакционной массы в течение 1 ч, после чего продукты реакции были выделены с выходами 82% и 84%. Синтез соединений **9a**, **9b** занимает 6 ч и 8 ч, соответственно. При этом выход реакции несколько выше и составляет 95% и 91%.

Было обнаружено, что галогенирование продуктов циклоконденсации **8a-e** и **9a-e** с помощью NIS или NBS не во всех случаях протекает полностью. Так, при получении гетероциклов **10a** и **12a** в MeCN при комнатной температуре выделены образцы, содержащие исходные соединения **8a** и **9a**. Подобный результат наблюдался и при иодировании соединения **8d**. Заменяв MeCN на ДМФА, удалось выделить целевые продукты **10a**, **10d**, **11d**, **12a**, **12d**, **13d** в индивидуальном виде с выходом 60-79% (схема 2). После вышеуказанной замены растворителя на ДМФА выделение целевых продуктов осуществлялось добавлением равного объёма воды к реакционной массе с последующим фильтрованием выпавшего осадка.

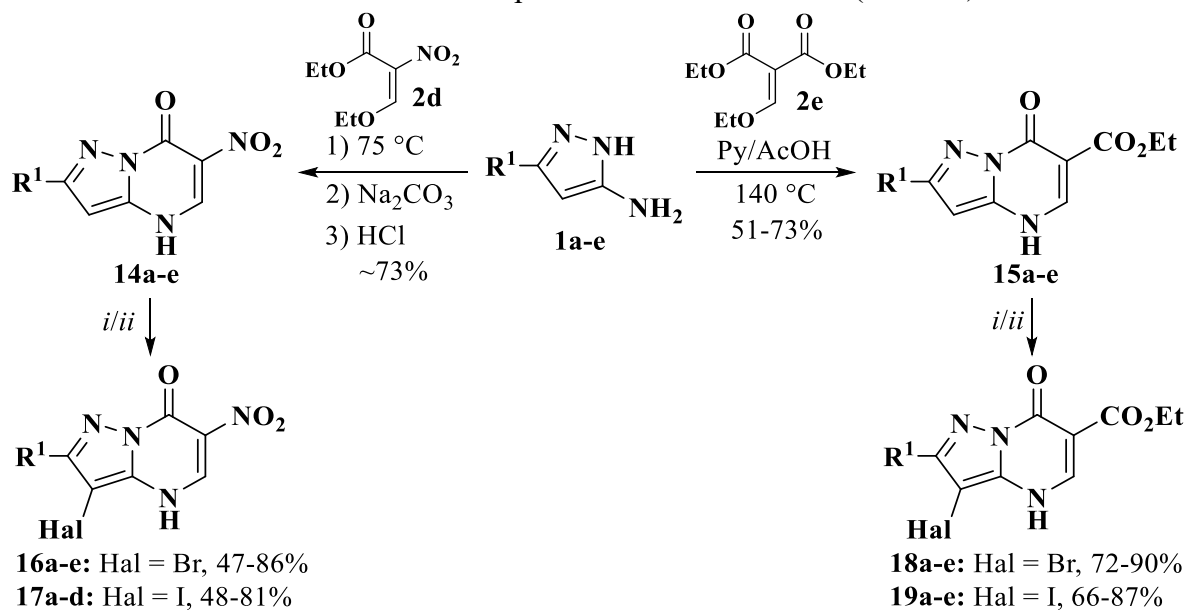


1, 8-13: R¹ = H (a), Me (b); Ph (c); Тиен-2-ил (d); Адамант-1-ил (e)

Схема 2. Получение 7-аминопиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбонитрилов **8a-e**, **9a-e** и их галогенирование

Реагенты и условия: *i.* Py, 115 °С, 1-8 ч; *ii.* NBS, MeCN (Метод А, **10b, c, e** и **12b, c, e**) или ДМФА (Метод Б, **10a, d** и **12a, d**), 5 ч; *iii.* NIS, MeCN (Метод А, **11a-c, e**, **13a-c, e**) или ДМФА (Метод Б **11d, 13d**), 5 ч.

Соединения **14** и **15** были получены взаимодействием этоксикарбонилсодержащих производных **2d** и **2e** с 5-замещёнными пиразолил-3-аминами **1a-e** (схема 3).



1, 14-19: R¹ = H (a); Me (b); Ph (c); Тиен-2-ил (d); Адамант-1-ил (e)

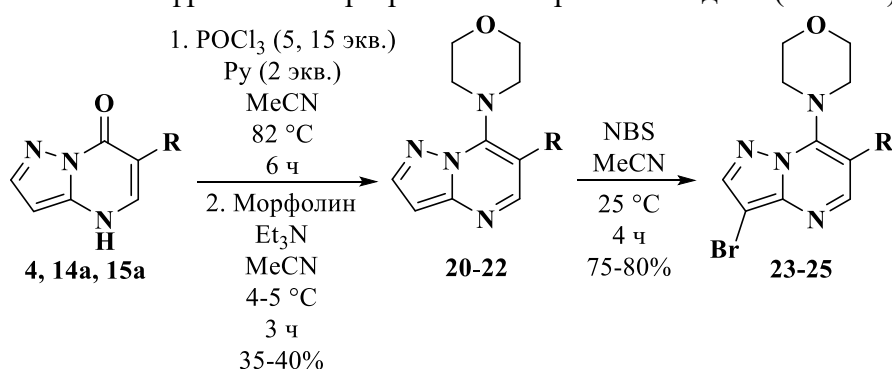
Схема 3. Получение 6-нитро- и 6-этоксикарбонилпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **14a-e**, **15a-e** и их галогенирование

Реагенты и условия: *i.* NBS, MeCN (Метод А **16a, c, e**, **18a-e**) или ДМФА (Метод Б **16b, d**), 5 ч; *ii.* NIS, MeCN (Метод А **17a, b, e**, **19a-e**) или ДМФА (Метод Б **17c, d**), 5 ч.

Синтез соединений **14** основан на двухстадийном *one pot* методе, заключающемся в предварительном получении енаминов сплавлением исходных реагентов при 75 °С и их последующей циклизации в основных условиях (водный раствор Na₂CO₃) с получением натриевых солей 6-нитропиразоло[1,5-*a*]пиримидинов, которые были переведены в целевые продукты **14a-e** подкислением реакционной массы концентрированной соляной кислотой. Выход

6-нитропиразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов **14a-d** составил ~73% и лишь 2-адамантилсодержащее производное **14e** получено с выходом 39%. Этиловые эфиры пиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **15a-e** были получены кипячением исходных реагентов в эквимольной смеси пиридин-уксусная кислота с выходом от 51 до 73%. Снижение выхода целевых гетероциклов может быть связано с протеканием побочной реакции ацилирования исходных пиразолов. После галогенирования этиловых эфиров 2-замещённых-7-оксопиразоло[1,5-*a*]пиримидинов карбоновой кислоты **15a-e** в MeCN с помощью NBS/NIS выделены продукты реакции **18-19** в индивидуальном виде, без примесей исходных соединений. Однако, конверсия соединений **14b-d** в целевые продукты галогенирования вновь была неполной: в спектрах ЯМР ^1H наблюдался характерный сигнал протона (δ_{H} 6-7 м.д) пиразольного фрагмента. По аналогии с методикой получения бромпроизводных **10a**, **10d**, **11d**, **12a**, **12d** и **13d** (схема 2) MeCN был заменён на ДМФА, в результате чего были выделены целевые продукты **16b**, **d** и **17c**, **d** в индивидуальном виде.

Также были получены 3-галоген-7-морфолинилпиразоло[1,5-*a*]пиримидины **23-25** с помощью последовательного хлордезоксигенирования и нуклеофильного замещения атома хлора на морфолинильный фрагмент по разработанной ранее методике (схема 4).



R = NO_2 (**23**), CN (**24**), COOEt (**25**)

Схема 4. Получение пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **20-22** и их галогенирование

Для образования 7-хлорпроизводных пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов, содержащих в положении C6 нитро и карбонитрильный заместители, оказалось достаточным кипячения исходных гетероциклов **4** и **14a** в среде MeCN с 5 эквивалентами хлорокиси фосфора. В ходе оптимизации условий процесса было установлено, что для образования 7-хлорпроизводного соединения **15a** реакцию необходимо проводить с 15 эквивалентами POCl_3 . В обоих случаях в реакцию вводится 2 эквивалента пиридина, который выступает в роли активатора. Для получения желаемых алкиламинопиразолопиримидинов **20-22** соответствующие хлорпроизводных были обработаны *in situ* морфолином при 2-4 °C в присутствии Et_3N для нейтрализации выделяющейся HCl . Общий выход гетероциклов **20-22** составил 35-40%. Последующее бромирование этих соединений в ацетонитриле с помощью NBS протекало гладко, в результате чего общий выход пиразолопиримидинов **23-25** составил 25-35%.

Проведение хлордезоксигенирования этилового эфира 2-(адамант-1-ил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он карбоновой кислоты **15e** по аналогичной методике (см. схему 4) приводит к получению смеси 7-хлорпроизводного **26** и исходного гетероцикла, с преобладанием последнего. С другой стороны, кипячение гетероцикла **15e** в POCl_3 с добавлением пиридина с последующей обработкой образующегося этилового эфира 2-(адамант-1-ил)-7-хлорпиразоло[1,5-*a*]пиримидин карбоновой кислоты *in situ* различными аминспиртами в присутствии Et_3N привело к выделению целевых структур **27a-c** с выходом 53-83% (схема 5). Дальнейшим галогенированием были получены целевые структуры **28a**, **b** с выходами 83% и 81%, соответственно.

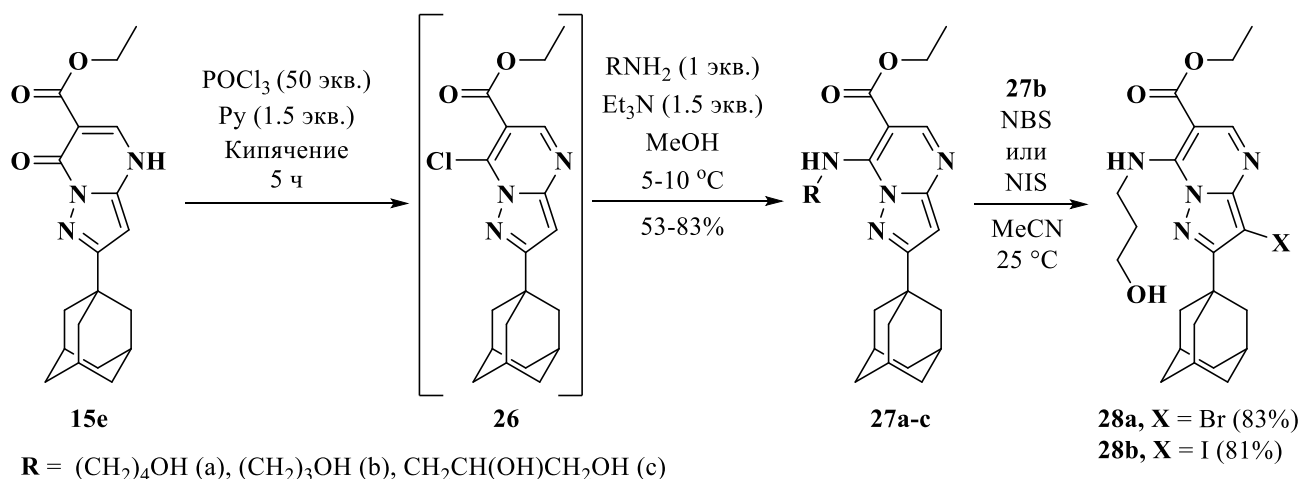


Схема 5. Получение этиловых эфиров 2-(адамант-1-ил)-7-(гидроксиалкиламинов)пиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **27a-c** и галогенирование соединения **27b**

3-Бром-7-(метилсульфанил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидин **33** был получен из соединения **15a** в 5 стадий с общим выходом 39% (схема 6).

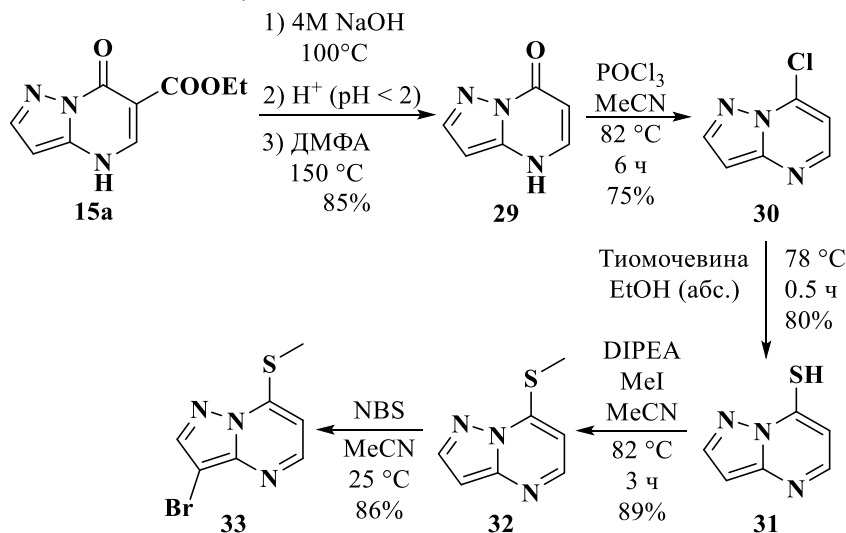


Схема 6. Получение 3-бром-7-(метилсульфанил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидина (**33**)

Для получения гетероциклов **34-38**, содержащих метилсульфанильный фрагмент при С(2)-атоме (аналогичный фрагменту в этом положении у Триазавирина), нами был разработан оригинальный подход, основанный на реакциях циклоконденсации производных СН-активных соединений **2a-e** с 3-амино-5-(метилсульфанил)пиразол-4-карбоновой кислотой (**1f**). Оказалось, что в условиях реакции, при нагревании в различных растворителях, происходит *one pot* образование пиразолопиримидиновой системы и декарбоксилирование (схема 7). При этом выход целевых гетероциклов **34a-38a** составил 54-62%.

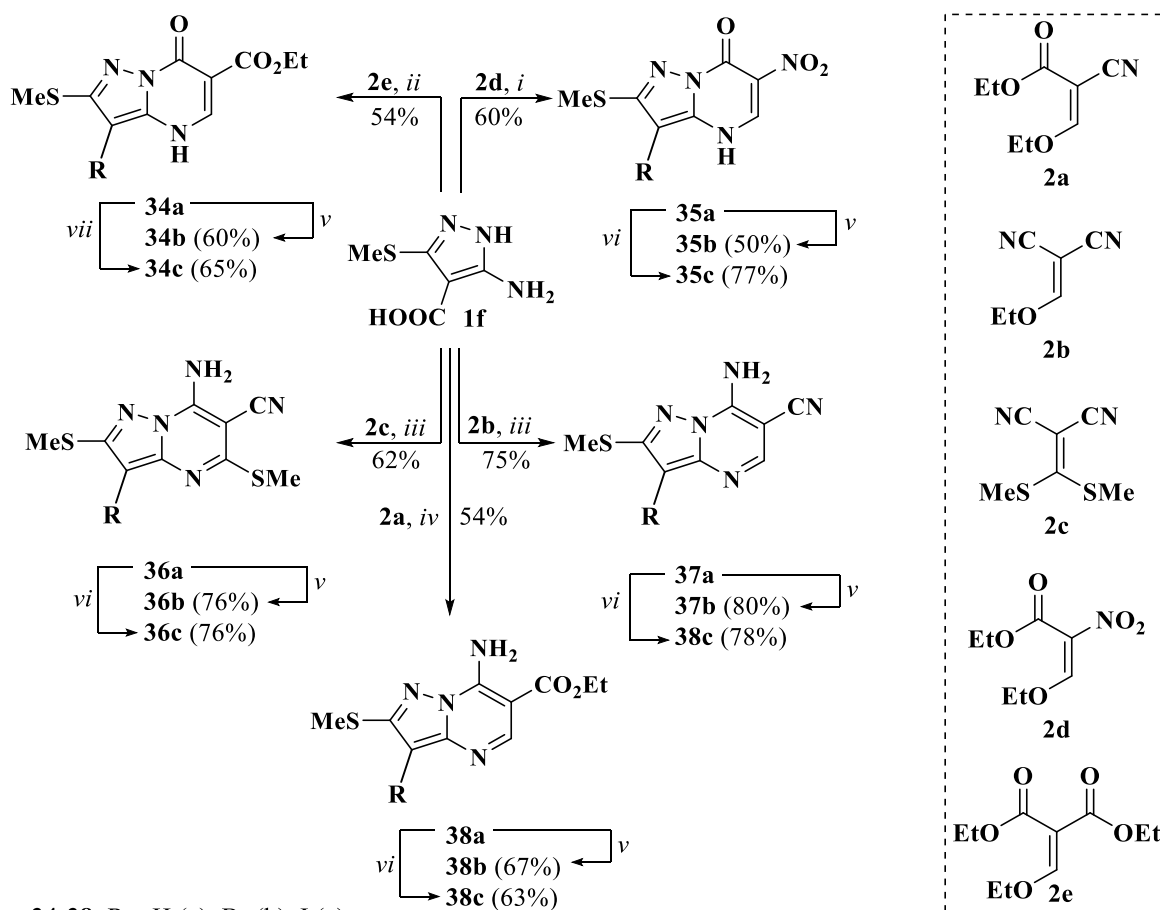


Схема 7. Получение 2-(метилсульфанил)пирозоло[1,5-*a*]пиримидинов **34a-38a** и их галогенирование

Реагенты и условия: *i.* Py-AcOH, 140 °C, 5 ч; *ii.* AcOH, 118 °C, 7 ч; *iii.* Py, 115 °C, 5 ч; *iv.* Py-AcOH, 140 °C, 2 ч; *v.* NBS, MeCN, 5 ч; *vi.* NIS, MeCN, 5 ч; *vii.* NIS, ДМФА, 5 ч.

В дальнейшем полученные соединения **34a-38a** были прогалогенированы при комнатной температуре в ацетонитриле с помощью NIS или NBS. Единственный случай, когда конверсия исходного соединения в продукт реакции была неполной – иодирование производного **34a**, в этом случае целевой продукт **34c** был получен в ДМФА.

Важно отметить, что в ряду полученных 3-галогенпирозоло[1,5-*a*]пиримидинов нами не было обнаружено зависимости легкости галогенирования от заместителей как в пиримидиновом фрагменте, так и от заместителей в C2-положении. В подавляющем большинстве случаев выход продуктов галогенирования варьировался от 60 до 80%, за исключением 3-галоген-2-фенил-6-нитропирозоло[1,5-*a*]пиримидинов – соединения **16c** и **17c** получены с выходами 47% и 48%, соответственно. Продолжительность реакции во всех случаях составила 5 ч.

3-Галогенпирозоло[1,5-*a*]пиримидины **40a-d** оказалось удобнее синтезировать, используя 4-бром-3-аминопиразолы **1g-j**. Кипячение в этаноле с тетраметоксипропаном **2f** в присутствии каталитических количеств *para*-толуолсульфокислоты позволило получить гетероциклы **40a-d** с хорошими выходами (схема 8). Путём сплавления аминопиразола **1g** с ацетилацетоном был получен 3-бром-5,7-диметилпирозоло[1,5-*a*]пиримидин **39** с выходом 35%.

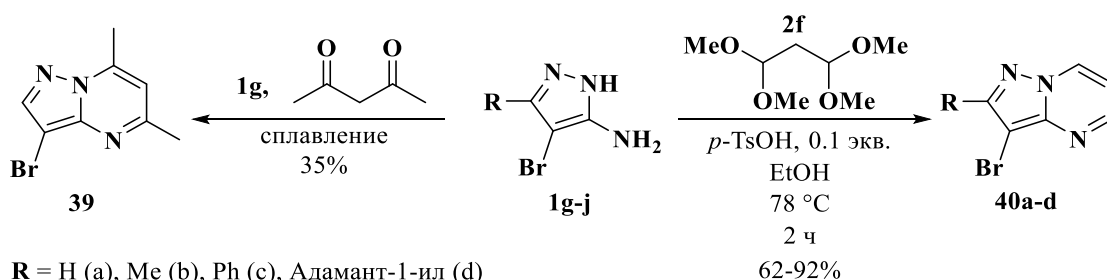


Схема 8. Получение 3-бромпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **39**, **40a-e**

С помощью указанных методов удалось наработать библиотеку различных 3-бром- и 3-иодпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов, которые представляют интерес не только как субстраты для взаимодействия с (псевдо)рибонуклеотидами для получения С-нуклеозидов в присутствии металлорганических реагентов, но и как самостоятельные перспективные соединения с потенциально высокой фармакологической активностью. Структура полученных гетероциклов была доказана с использованием всех современных физико-химических методов анализа: ^1H , ^{13}C ЯМР, ИК спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа.

2.2 Изучение взаимодействия 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов с (псевдо)рибонуклеотидами в присутствии металлорганических реагентов

Наиболее привлекательными для синтеза новых С-нуклеозидов являются агликоны, содержащие нитрогруппу или её аналоги (карбонитрил, этоксикарбонил), как структурно-подобные Триазавирину. В качестве рибозидного фрагмента логично применять рибонуклеотиды, которые позволяют получить наиболее близкие к Ремдесивиру структуры. С другой стороны, для разработки метода образования гликозидной С-С связи в ранее неисследованной, с этой точки зрения, азолоазиновой системе с мостиковым атомом азота удобнее пользоваться доступными электрофилами. В качестве такой модельной молекулы для изучения способности 3-галогенпиразолопиримидинов образовывать С-С-связь в реакциях с *n*-BuLi был выбран циклогексанон **42**. Важными преимуществами данного соединения являются его доступность, простота дозирования, а также низкая гигроскопичность. Также немаловажным является то, что его достаточно легко сушить: перегнанный над MgSO_4 , циклогексанон долго остаётся сухим при его хранении в закупоренной таре над MgSO_4 .

Тем не менее, в первом эксперименте с использованием 3-галоген-6-нитропиразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов **16a** и **17a**, с предварительным силилированием N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамидом (BSTFA) *in situ*, и обработкой *n*-BuLi при -78°C с последующим введением в реакционную массу циклогексанона **42**, не удалось получить 3-циклогексилзамещённый пиразолопиримидин (схема 9).

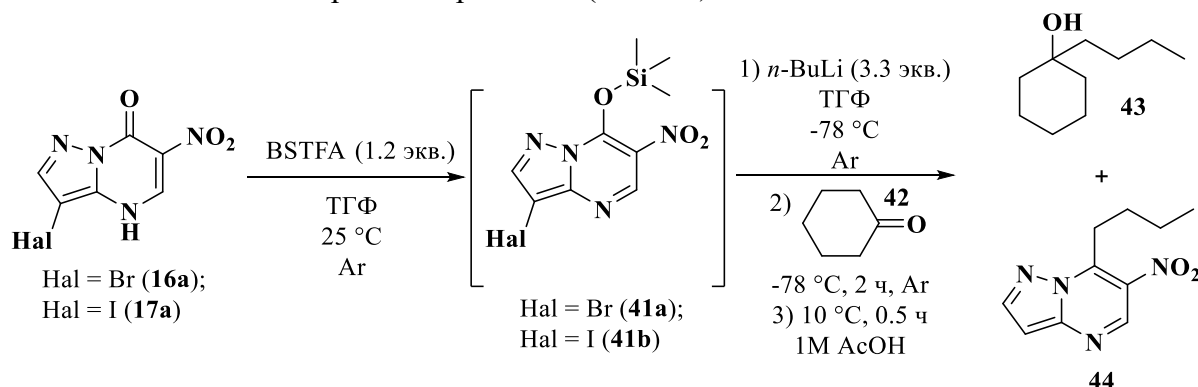


Схема 9. Взаимодействие 3-галоген-6-нитропиразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов **16a** и **17a** с циклогексаноном в присутствии *n*-BuLi

Если реагентом было производное **17a**, полученный после реакции образец, по данным ГХ-МС, содержал значительное количество 1-бутилциклогексанола **43** ($t_{уд} = 5.271$ мин, $[M^+] - 156$) и деиодированного продукта нуклеофильного замещения по С7-положению **44** ($t_{уд} = 8.626$ мин, $[M^+] - 220$). В случае реакции с 3-бром-6-нитропиразоло[1,5-*a*]пиримидином **16a** удалось выделить смесь, которая содержала, в основном, циклогексанон **42** и другие трудно идентифицируемые соединения.

В надежде избежать протекания реакции по положению С7 азолазиновой системы нами были использованы 7-морфолинилпроизводные **23-25**, которые к тому же не требуют введения силильной защиты перед взаимодействием с *n*-BuLi, что также снижает вероятность протекания побочных процессов. Однако, обработка раствора нитропроизводного **23** в ТГФ *n*-BuLi при -78°C с последующим добавлением в реакционную массу циклогексанона **42** привела к получению смеси соединений (схема 10).

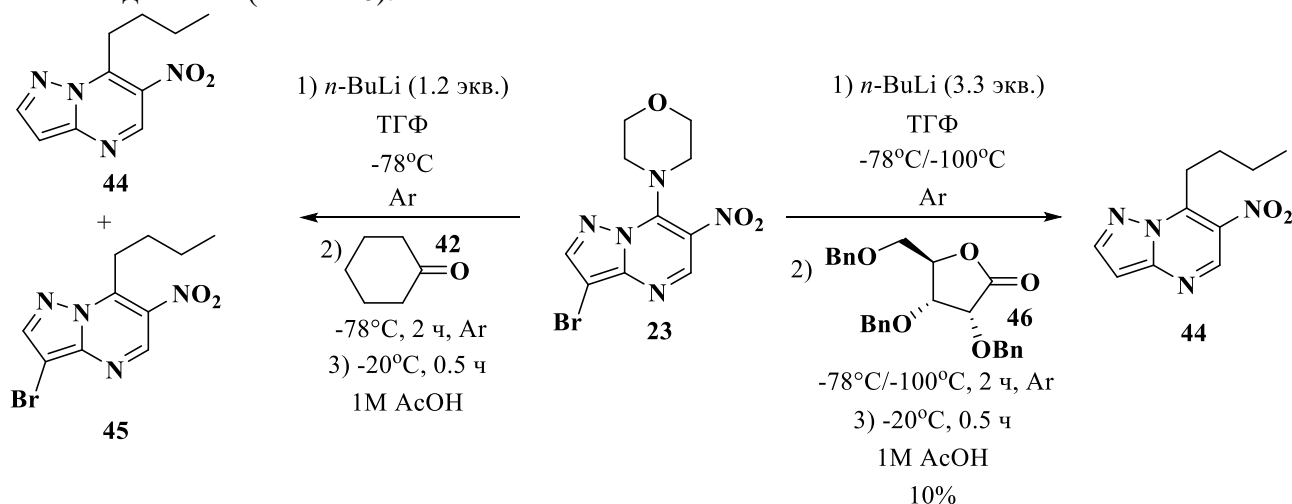


Схема 10. Взаимодействие 3-бром-7-(морфолин-4-ил)-6-нитропиразоло[1,5-*a*]пиримидина **23** с циклогексаноном **42** и рибанолактоном **46** в присутствии *n*-BuLi

По данным ГХ-МС было обнаружено, что смесь содержит 9 соединений, среди которых количественно преобладают, предположительно, дебромированный продукт нуклеофильного замещения морфолина **44** (27%), $t_{уд} = 8.616$ мин с $[M^+] - 220$ и аналогичный гетероцикл **45**, содержащий атом брома (60%), $t_{уд} = 9.948$ мин с $[M^+]$ и $[M^+ + 2]^+ - 298$ и 300. Стоит отметить, что циклогексанон **42** был взят в количестве 1 экв., *n*-BuLi – 1.2 экв. В случае увеличения количества *n*-BuLi до 3.3 экв. был выделен остаток, содержащий по данным ГХ-МС 53% 1-бутилциклогексанола **43** и 24% соединения **44**.

Во избежание образования большого количества 1-бутилциклогексанола **43** нами была проведена замена электрофила на рибанолактон **46**. В полученном после реакции маслянистом остатке по данным ГХ-МС преобладает продукт дегалогенирования и нуклеофильного замещения морфолинильного фрагмента **44**, который был выделен методом колоночной хроматографии с выходом 10%. Также, согласно данным ГХ-МС, в образце присутствуют 7 трудно идентифицируемых соединений, среди которых не обнаружено ни целевого продукта, ни исходных веществ.

Проведение аналогичной реакции без выдержки реакционной массы после добавления *n*-BuLi (стандартное время – 10-20 мин на основе литературных данных) привело лишь к увеличению количества примесей, среди которых преобладает соединение **44** ($t_{уд} = 8.607$ мин) и ещё 3 соединения, которые невозможно идентифицировать по данным ГХ-МС. Проведение реакции при -100°C также приводит к продукту **44**, содержащему бутильный фрагмент (44%), бензильному спирту (9%) и другим примесям, согласно данным ГХ-МС.

Для того, чтобы избежать нуклеофильного замещения морфолинильного фрагмента на бутильный остаток в качестве основания был использован бис(триметилсилил)амид лития

(LiHMDS), который является ненуклеофильным литирующим агентом. Однако, обработка раствора соединения **24** в ТГФ LiHMDS в атмосфере аргона при -78°C , последующее добавление циклогексанона **42** и соответствующая обработка реакционной массы для выделения продуктов, привели к получению лишь исходного гетероцикла **23** (схема 11).

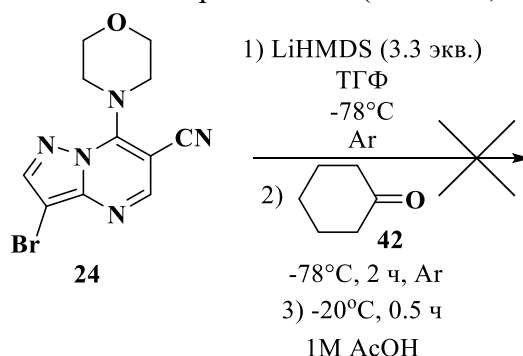


Схема 11. Попытка образования С-С-связи соединения **24** с циклогексаноном **42** в присутствии LiHMDS

Обработка 6-этоксикарбонильного производного **25** с помощью *n*-BuLi с последующим введением в реакцию циклогексанона **42** привела к получению образца, содержащего по данным ГХ-МС 72% вещества с пиком молекулярного иона $[\text{M}]^+ = 288$, для которого, в соответствии с данными ^1H ЯМР и результатами масс-спектрометрии, была приписана структура 1-(7-морфолин-4-илпириазоло[1,5-*a*]пиримидин-6-ил)пентан-1-она **47** (схема 12).

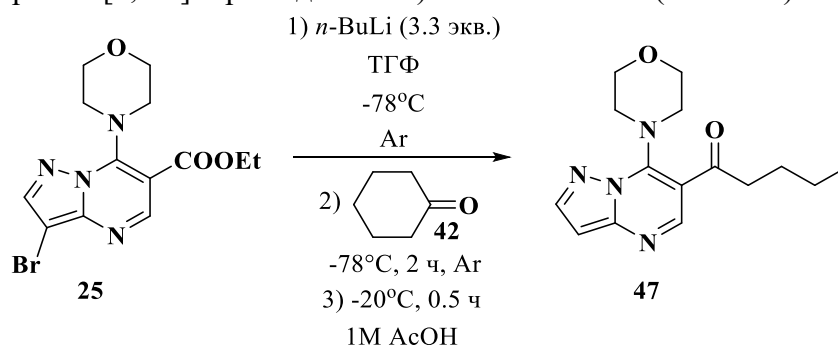


Схема 12. Попытка образования С-С-связи соединения **25** с циклогексаноном в присутствии *n*-BuLi

Следующим субстратом для проведения реакции литиирования был выбран 3-бром-5,7-диметилпиразоло[1,5-*a*]пиримидин **39**.

После разделения полученного в результате реакции (табл. 1, эксп. 1) остатка методом колоночной хроматографии был выделен 1-((5-метилпиразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-ил)метил)циклогексан-1-ол **48** с выходом 52% (схема 13).

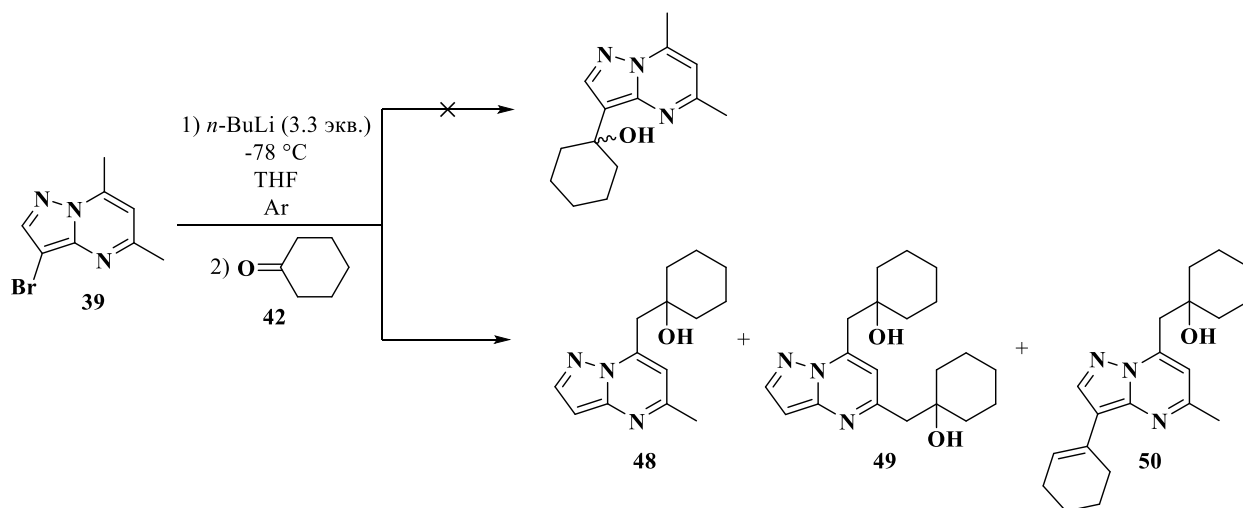


Схема 13. Получение соединений **48-50**

Структура соединения **48**, помимо основных физико-химических методов анализа, подтверждена при помощи рентгеноструктурного анализа (рисунок 1).

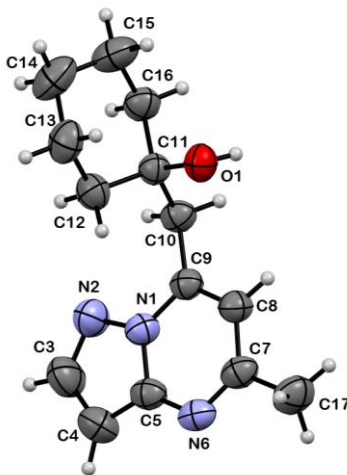


Рисунок 1. Строение молекулы 1-((5-метилпиразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-ил)метил)циклогексан-1-ола **48** в тепловых эллипсоидах 50% вероятности

Несмотря на неожиданное присоединение циклогексанона к метильной группе в *C*(7)-положении, согласно полученным результатам ЯМР ^1H , ГХ-МС и рентгеноструктурного анализов, атом брома в выделенном продукте отсутствует, что может свидетельствовать о протекании реакции обмена галоген-литий с образованием соответствующего карбаниона, который в последствии подвергается гидролизу.

Возможный механизм образования продукта **48** представлен на схеме 14. Можно предположить, что первоначально, путем депротонирования метильной группы в *C*(7)-положении соединения **39** под действием *n*-BuLi, образуется 7-метилкарбанион, вступающий в реакцию нуклеофильного присоединения по карбонильной группе циклогексанона. После того, как весь циклогексанон прореагирует, происходит отщепление атома брома из-за присутствия избытка *n*-BuLi с образованием 3-литийкарбаниона. При последующем подкислении реакционной массы происходит обмен лития на протон с образованием структуры **48**.

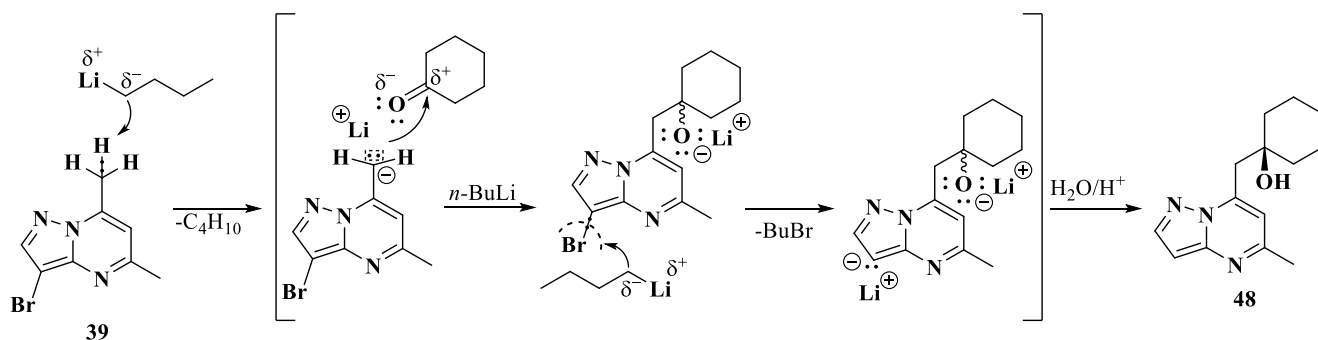


Схема 14. Предполагаемый механизм образования соединения **48**

С целью получения желаемого продукта присоединения циклогексанона по С3 положению гетероциклической системы был проведён ряд экспериментов с варьированием параметров процесса (таблица 1).

Таблица 1. Условия проведения реакции литиирования и электрофильного присоединения.

| № | 42, экв | n-BuLi, экв | Время выдержки после добавления n-BuLi, мин | Растворитель | Выход, % | | |
|---|---------|-------------|---|-------------------|----------|----|-----|
| | | | | | 48 | 49 | 50 |
| 1 | 1 | 3.3 | 15 ^a | ТГФ | 52 | - | - |
| 2 | 1 | 3.3 | 15 ^b | ТГФ | 33 | - | 5 |
| 3 | 1.2 | 3.3 | 15 ^a | ТГФ | 79 | 10 | 0.5 |
| 4 | 1 | 3.3 | 10 ^a | Et ₂ O | 42 | - | 2 |
| 5 | 1 | 2 | 15 ^a | ТГФ | 60 | - | 6 |
| 6 | 3 | 6 | 20 ^a | ТГФ | 22 | - | 2 |
| 7 | 1 | 1.2 | 20 ^a | ТГФ | 53 | - | 2 |

^a – n-BuLi добавлен по каплям

^b – n-BuLi добавлен одной порцией

Полученные в результате реакции образцы (таблица 1, эксп. 2-7) были подвергнуты разделению методом колоночной хроматографии. Обнаружено, что в результате реакции в указанных условиях происходит присоединение циклогексанона по С7-метильному фрагменту соединения **39**, которое отмечалось и ранее (см. схему 14), но также циклогексанон взаимодействует с С3 атомом углерода, образуя желаемую гликозидную С-С связь, однако, с элиминированием молекулы воды в результате чего, образуется фрагмент циклогексена в продукте **50**.

Доказательством получения соединения **50** являются, в том числе, данные рентгеноструктурного анализа (рисунок 2).

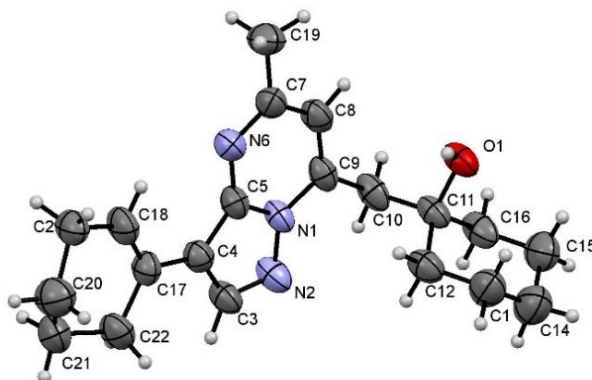


Рисунок 2. Строение молекулы 1-((3-циклогекс-1-ен-1-ил)-5-метилпиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)метил)циклогексан-1-ола **50** в тепловых эллипсоидах 50% вероятности

Нужно отметить, что в результате реакции с использованием 1.2 экв. циклогексанона (таблица 1, эксп. 3) помимо соединений **48** и **50** был выделен продукт присоединения циклогексанона по двум метильным группам при C5 и C7 атомах **49**.

Также была изучена возможность образования карбаниона из соединения **39** при обработке фениллитием **51**. Предполагалось, что последующее подкисление реакционной массы раствором 1М AcOH приведёт к образованию 5,7-диметилпиразоло[1,5-*a*]пиримидина **52**, однако, в результате был выделен лишь исходный гетероцикл **39** (схема 15).

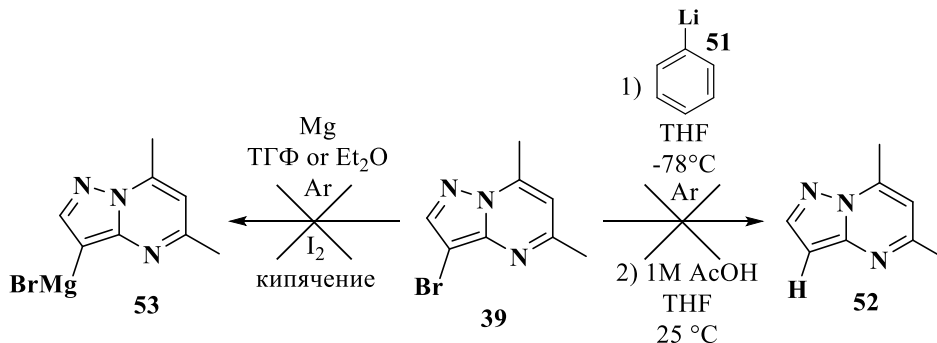


Схема 15. Изучение возможности получения реактива Гриньяра на основе соединения **39**, а также возможности образования карбаниона при обработке фениллитием **51**

Другим известным методом генерации карбаниона является получение реактивов Гриньяра. Для этого было проведено нагревание раствора соединения **39** в свежеперегнанном ТГФ/диэтиловом эфире в присутствии свежеполученной магниевой стружки под аргоном. Однако, даже длительное кипячение или добавление каталитических количеств иода не привело к растворению магния и, следовательно, образованию металлорганического соединения **53**.

На основании того, что в результате взаимодействия соединения **39** с циклогексаноном в присутствии *n*-BuLi основным продуктом реакции является соединение **48** (наряду с продуктами **49** и **50**), можно сделать вывод, что метильные группы, связанные с азолоазиновой системой, обладают СН-кислотными свойствами и потому нами, на примере 3-бром-7-(метилсульфанил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидина **33**, была исследована возможность протекания реакции обмена «галоген-литий» с последующим взаимодействием литиевой соли с циклогексаноном. Однако, после разделения полученного в результате реакции остатка колоночной хроматографией, было выделено соединение **54** (схема 16).

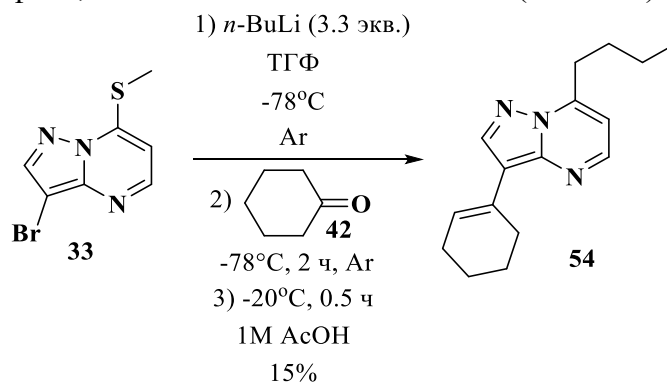


Схема 16. Получение соединения **54**

После такой серии обескураживающих результатов, нами было принято решение использовать в данных превращениях 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидин **40a**, который не активирован к реакциям нуклеофильного замещения и не содержит заместителей с подвижным атомом водорода (метильных групп, NH или OH фрагментов). Была проведена серия экспериментов, в которых варьировалось мольное соотношение с используемым кетоном и *n*-

BuLi, а также продолжительность выдержки после добавления литирующего агента и температура проведения процесса. Результаты сведены в таблицу 2.

Таблица 2. Серия экспериментов по исследованию взаимодействия 3-бромпиразоло[1,5-*a*]пиримидина **40a** с реагентами **42** и **46** в присутствии *n*-BuLi

| № Реакции | 1. <i>n</i> -BuLi ТГФ Ar | | | | | 2. Кетон 42 или лактон 46 | |
|--|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Кетон/лактон | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 46 | 46 |
| Кол-во кетона/лактона, экв | 1 | 1 | 1 | 3.3 | 1.2 | 1 | 1.5 |
| Кол-во <i>n</i> -BuLi, экв | 3.3 | 3.3 | 3.3 | 3.3 | 2.2 | 3.3 | 3.3 |
| Время выдержки, после добавления <i>n</i> -BuLi, мин | 10 | 15 | 30 | 15 | 60 | 15 | 15 |
| Температура проведения реакции, °C | -78 | -100 | -78 | -78 | -78 | -78 | -78 |
| Продукты реакции | 43 + примеси | 43 + примеси | 43 + примеси | 43 + примеси | 43 + примеси | 55 | 55 |

Однако, результаты анализов ГХ-МС полученных образцов после реакций с циклогексаноном **42** (№1-5, Таблица 2) в каждом случае были почти идентичными – значительное преобладание 1-бутилциклогексанола **43** (>70-80%) и большое количество трудно идентифицируемых соединений в низкой концентрации.

Замена циклогексанона **42** на рибонлактон **46** (№6, 7, таблица 2) тоже не привела к получению целевого С-нуклеозида – по данным ГХ-МС остаток после обработки реакционной массы представлял собой смесь большого количества трудно идентифицируемых соединений с преобладанием дегалогенированного исходного соединения **40a**. После разделения колоночной хроматографией полученного остатка помимо ранее упомянутого дегалогенированного гетероцикла удалось выделить и охарактеризовать соединение **55** с выходом 5%.

Подтверждением структуры соединения **55** стали, в том числе, данные рентгеноструктурного анализа, которые согласуются с другими физико-химическими методами анализа, полученными ранее (рисунок 3).

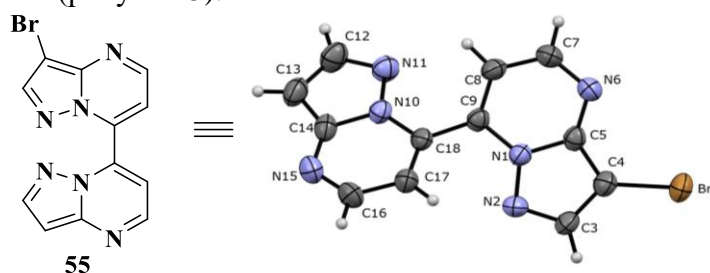


Рисунок 3. Строение молекулы 3-бром-7,7'-бипиразоло[1,5-*a*]пиримидина **55** в тепловых эллипсоидах 50% вероятности

Увеличение количества рибнолактона **46** (№7, таблица 2) и разделение полученной смеси с помощью колоночной хроматографии также не позволило обнаружить желаемого продукта присоединения рибнолактона к агликону – основной фракцией после хроматографии оказался продукт дебромирования исходного гетероцикла.

Для того, чтобы избежать нуклеофильного присоединения бутильного фрагмента к циклогексанону, была произведена замена литирующего агента на ненуклеофильный диизопропиламид лития (LDA). Проведение соответствующей реакции с субстратом **40a** (схема 17), последующая обработка реакционной массы и анализ полученного продукта позволили приписать ему структуру **56a**.

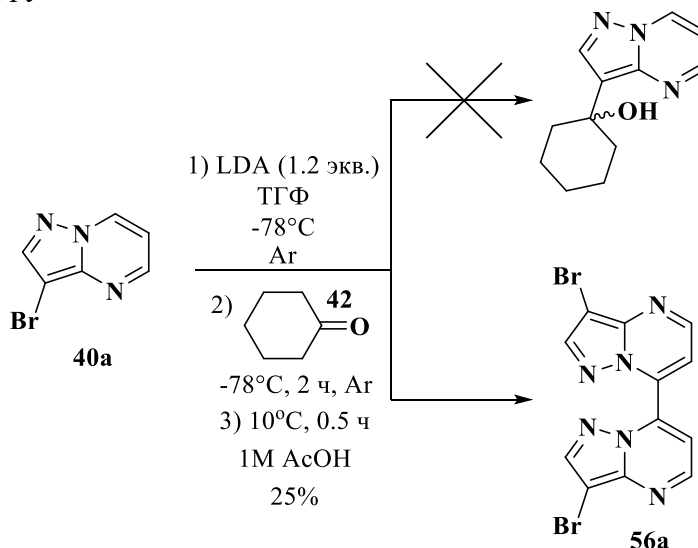


Схема 17. Попытка образования С-С-связи соединения **40a** с циклогексаноном в присутствии LDA

Возможный механизм образования соединения **56a** представлен на схеме 18. Предполагается, что первоначально происходит отщепление атома водорода при С7-атоме **40a** с образованием карбаниона, который реагирует по механизму S_N^H с исходным 3-бромпиразоло[1,5-*a*]пиримидином **40a**. Подкисление реакционной массы при обработке 1М раствором АсОН приводит к NH-форме, которая ароматизуется под действием кислорода воздуха, приводя к конечному димеру **56a**.

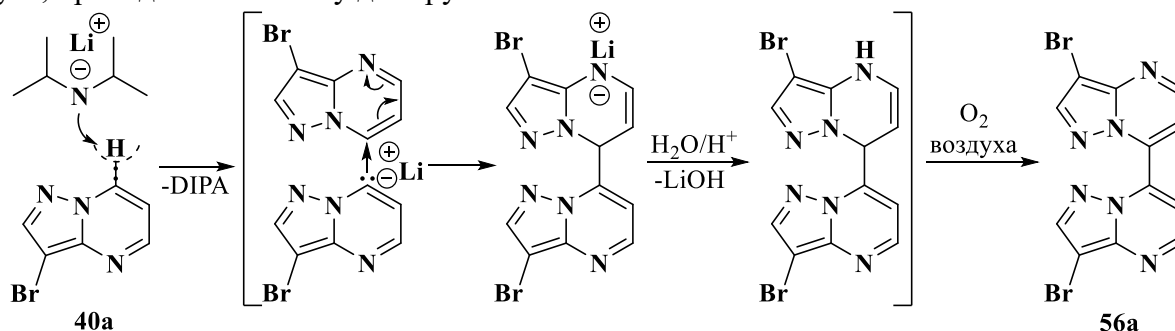
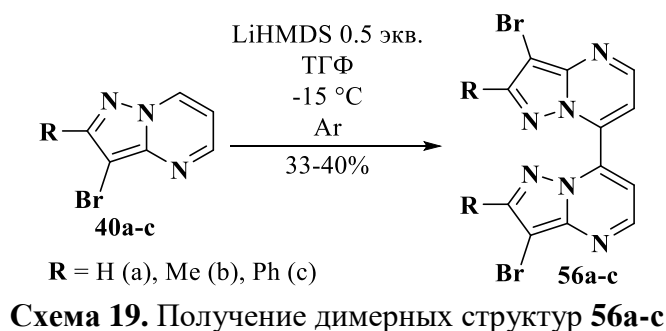


Схема 18. Предполагаемый механизм образования соединения **56a**

Проведена серия экспериментов с 2-замещёнными 3-бромпиразоло[1,5-*a*]пиримидинами **40a-d**, с использованием LiHMDS в качестве основания (схема 19).



Было обнаружено, что обработка 3-бром-2-(адамант-1-ил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидина **40d** LiHMDS в указанных условиях не приводит к образованию ожидаемой димерной структуры, а в результате реакции был выделен лишь исходный гетероцикл **40d**. Полученный результат может быть связан с низкой растворимостью соединения **40d** в ТГФ как при комнатной, так и при температуре ниже 0°С, из-за наличия в структуре липофильного адамантильного фрагмента. Проведение аналогичной реакции с соединениями **40a-c** приводит к образованию димерных структур **56a-c** с умеренными выходами. Стоит отметить, что для протекания данной реакции достаточно 0.5 экв. LiHMDS, что согласуется с предполагаемым механизмом (схема 18), и температуры в -15 °С, при этом выход целевых соединений составлял не более 40%. Понижение температуры вплоть до -78 °С, использование LiHMDS в количестве до 1.5 экв. не повлияло на выход гетероциклов **56a-c**.

Таким образом, было проведено масштабное изучение реакционной способности различных 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов в реакциях с кетонами при предварительной активации металлорганическими соединениями. Показано, что азолоазины с мостиковым атомом азота, содержащие атом галогена в азольном цикле, как уходящую группу для образования карбаниона, не реагируют с фениллитием, бис(триметилсилил)амидом лития, или металлическим магнием. С другой стороны, действие *n*-BuLi приводит, зачастую, к сложной смеси продуктов, которые трудно идентифицировать. Вероятно, такой эффект связан со склонностью азолоазиновых систем с мостиковым атомом азота к раскрытию азольного или азинового фрагмента под действием оснований. Тем не менее, удалось обнаружить несколько необычных превращений исходных гетероциклов под действием *n*-BuLi и диизопропиламида лития, а также продемонстрировать принципиальную возможность образования гликозидной С-С связи для пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов, как структурных аналогов Триазавирина.

2.2 Исследование противовирусной активности 3-Н- и 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов в отношении SARS-CoV-2¹

2.2.1. Противовирусная активность *in vitro*

Было проведено *in vitro* исследование противовирусной активности полученных 3-галоген и 3Н- пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов в отношении двух вариантов коронавируса SARS-CoV-2 (варианты hCoV-19/Russia/Vologda-171613-1208/2020 и nCov/Victoria/1/2020).

Таблица 3. Противовирусная активность в отношении вируса SARS-CoV-2 (вариант hCoV-19/Russia/Vologda-171613-1208/2020) для значения концентрации 50 мкМ и в диапазоне 0,05-1000 мкМ для соединений **18e** и **34b**

| № | Шифр соед. | Токсичность | | | Противовирусная активность | | | SI (TC ₅₀ /IC ₅₀) |
|---|------------|-------------|------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|------------------|--|
| | | Ср.знач. ОП | % сохранности монослоя | ТС ₅₀ , мкМ | Ср.знач. ОП | % сохранности монослоя | IC ₅₀ | |
| 1 | 34b | 0,553 | 79,34 | 906,0 | 0,534 | 52,83 | ≥1000 | – |
| 2 | 35b | 0,805 | 115,45 | н.и | 0,306 | 30,22 | н.и | н.и |

¹ Исследование проводилось в сотрудничестве с ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под руководством заведующего отделом «коллекция микроорганизмов», к.б.н. Пьянкова О. В.

| | | | | | | | | |
|------------|------------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|------|
| 3 | 36b | 0,598 | 85,80 | н.и | 0,103 | 10,15 | н.и | н.и |
| 4 | 37b | 0,822 | 117,98 | н.и | 0,099 | 9,79 | н.и | н.и |
| 5 | 38b | 0,739 | 105,98 | н.и | 0,125 | 12,39 | н.и | н.и |
| 6 | 5e | 0,683 | 97,94 | н.и | 0,187 | 18,49 | н.и | н.и |
| 7 | 6e | 0,531 | 76,23 | н.и | 0,092 | 9,06 | н.и | н.и |
| 8 | 7e | 0,500 | 71,78 | н.и | 0,098 | 9,72 | н.и | н.и |
| 9 | 15e | 0,489 | 70,21 | н.и | 0,347 | 34,31 | н.и | н.и |
| 10 | 18e | 0,635 | 91,10 | 365,35 | 0,940 | 92,93 | 41,47 | 8,81 |
| 11 | 8e | 0,358 | 51,36 | н.и | 0,269 | 26,59 | н.и | н.и |
| 12 | 10e | 0,413 | 59,25 | н.и | 0,101 | 9,99 | н.и | н.и |
| 13 | 14e | 0,464 | 66,62 | н.и | 0,093 | 9,19 | н.и | н.и |
| 14 | 9e | 0,664 | 95,31 | н.и | 0,115 | 11,34 | н.и | н.и |
| Ремдесивир | | 0,634 | 120,3 | н.и | 0,539 | 102,28 | н.и | н.и |
| Прототип | | н.и | н.и | 101,76 | н.и | н.и | 34,70 | 2,93 |

ОП – оптическая плотность

н.и – не исследовались

В ряду 2-(метилсульфанил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов (табл. 3, №1-5) были исследованы соединения, содержащие атом брома при С3 атоме. Среди данных соединений наименьшей цитотоксичностью и наилучшей противовирусной активностью обладает этиловый эфир 3-бром-2-(метилсульфанил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **34b**. Замена 7-оксозаместителя на 7-аминогруппу (соед. **38b**, №5) приводит к существенному снижению противовирусной активности. Аналогичный эффект наблюдает и при замене этоксикарбонильной группы на нитрогруппу в положении С6 (соед. **35b**, №2).

Среди 2-(адамантил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов также наблюдается существенный разброс в показателях противовирусной активности и цитотоксичности в зависимости от заместителей при С5, С6 и С7 углеродных атомах. В ряду этиловых эфиров 7-амино-3-Н(галоген)пиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновых кислот **5e-7e** (№6-8) происходит увеличение цитотоксичности и снижение противовирусной активности в зависимости от заместителя при С2 атоме – наилучшие результаты наблюдаются для соединения **5e**, содержащего атом водорода в этой позиции, а введение галогенов снижает противовирусную активность и повышает токсичность. Наихудшие показатели у соединения **7e**, имеющего атом иода в С3 положении. Однако, для этиловых эфиров 2-(адамантил)-7-оксопиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновых кислот **15e** и **18e** (№9, 10) наблюдается обратная зависимость. Введение атома брома в азолазиновую систему позволило существенно снизить цитотоксичность и в 3 раза увеличить противовирусную активность. Важно отметить, что соединение **18e** (№10) является соединением-лидером среди протестированных в отношении штамма hCoV-19/Russia/Vologda-171613-1208/2020 вируса SARS-CoV-2 соединений.

На основании расширенных исследований, в которых определялись показатели TC₅₀ и IC₅₀ для соединений-лидеров, можно сделать вывод, что для соединения **34b** цитотоксическая доза ниже, чем та, при которой проявляется противовирусное действие.

Для соединения **18e** показатели цитотоксичности оказались существенно ниже, чем у прототипа, при этом по показателю противовирусной эффективности (IC₅₀) данное соединение уступает незначительно. В результате, по показателю SI соединение **18e** превосходит прототип в 3 раза

Также были проведены *in vitro* биологические исследования в отношении варианта nCov/Victoria/1/2020 коронавируса SARS-CoV-2 3-Н- и 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов, обладающих адмантильным, фенильным и тиенильным заместителями при С2 атоме. При этом наилучшие показатели продемонстрировали адамантилсодержащие соединения (таблица 4).

Таблица 4. Показатели полуингибирующей и полутоксической концентраций при трех схемах исследования в отношении коронавируса SARS-CoV-2 (штамм nCov/Victoria/1/2020)

| № | Шифр | Токсичность CC ₅₀ (µM) | Скрининг | | Лечебная схема | | Профилактическая схема | |
|---|------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------|--------------------------|----------|---------------------------|----------|
| | | | IC ₅₀ (µM) | SI | IC ₅₀ (µM) | SI | IC ₅₀ (µM) | SI |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1 | 5e | 25,7± 6,1 | 5,4± 4,2 | 5,0± 2,9 | 1,9±0,3 | 9,8±5.0 | 5,3 ±1,3 | 4,9 ±2,6 |
| 2 | 27b | 16,3±6,1 | 4,6± 2,9 | 4,7± 0,8 | 6,4± 3.7 | 3,4± 2.7 | 6,1± 2,7 | 2,9± 0,0 |
| 3 | 28a | 13,6± 7,1 | 2,0± 1,2 | 10,6± 1,3 | 1,7 | 5,3 | 2,6± 0,1 | 3,6± 0,1 |
| 4 | 28b | 11,7±4,2 | 2,4± 0,4 | 3,8± 0,1 | 4,8±2.2 | 3,4±0.7 | 2,5± 0,3 | 5,4± 0,9 |
| 5 | Ремдесивир | Более 150 | 5,3± 4,1 | | 8,6± 3,8 | | 6,8 ±1,2 | |

На основании полученных данных цитотоксичности исследованных соединений можно сделать вывод, что введение атома галогена (Br и I) в С3 положение (соединения **27b**, **28a**, **28b**) не оказывает существенного влияния на значение CC₅₀, которое, тем не менее, остаётся достаточно низким, что свидетельствует о их высокой токсичности для культуры клеток *Vero E6* и является причиной относительно низких значений индекса селективности. Полученные значения ингибирующей концентрации исследованных соединений находятся в диапазоне от 9,6 до 1,7 µM, что сопоставимо с препаратом сравнения Ремдесивиром.

При наличии относительно высокой противовирусной активности вышеперечисленных соединений значения индекса селективности не превышают значения 8,0, за исключением показателей, полученных для **5e** при лечебной схеме и для **28a** полученных при скрининге.

2.2.2. Противовирусная активность *in vivo*

Для соединения-лидера **18e** проведено исследование противовирусной активности *in vivo* на модели сирийского хомячка. В эксперименте использованы сирийские хомячки мужского пола возрастом 4 мес. массой 90-100 г, разделённые на 2 группы: лечения и контроля. Для заражения был использован вариант hCoV-19/Russia/Vologda-171613-1208/2020 коронавируса SARS-CoV-2.

В результате проведенного исследования показано, что этиловый эфир 2-(адамantan-1-ил)-3-бром-7-оксо-4,7-дигидропиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **22e** обладает выраженным противовирусным действием в отношении коронавируса SARS-CoV-2. В частности, вирусная нагрузка в легких животных экспериментальной группы значимо ($p < 0.05$, Манн-Уитни) снизилась в 7,9 раз по сравнению с данным параметром в контрольной группе животных. Кроме того, продемонстрировано, что при использовании соединения заметно снижается тяжесть заболевания, что подтверждено достоверно меньшей потерей массы тела на протяжении всего эксперимента и значительно более низким значением массового коэффициента легких (меньшим повреждением тканей легких животных, исследованных гистологическими методами) по сравнению с контролем.

Заключение

При выполнении диссертационной работы получены следующие результаты:

1) Разработан универсальный метод синтеза широкого ряда 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов, основанный на последовательности «циклоконденсация-галогенирование» по ретросинтетической схеме [3+3]. Показано, что такая последовательность более эффективна, чем циклоконденсация галогенсодержащих аминопиразолов с биелектрофилами, в результате которой образуются побочные, дегалогенированные и полигалогенированные продукты и, как следствие, существенно снижается выход целевого гетероцикла;

2) Исследована возможность замещения атома галогена в полученных 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинах с образованием соответствующего карбаниона под действием *n*-BuLi, LDA, LiHMDS и PhLi с целью дальнейшего взаимодействия с кетонами. Показано, что взаимодействие 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов с кетонами в присутствии *n*-BuLi зачастую приводит к неожиданным продуктам нуклеофильного замещения по

пиримидиновому кольцу или по функциональным группам в этом кольце с параллельным дегалогенированием пиразольного цикла, однако без образования желаемой С-С гликозидной связи с кетоном. С помощью оптимизации условий процесса удалось продемонстрировать, что возможно образование новой С-С гликозидной связи между пиразоло[1,5-*a*]пиримидиновым агликоном и кетоном в присутствии *n*-BuLi, однако данный процесс протекает медленнее, чем побочные реакции по пиримидиновому циклу;

3) Обнаружен ряд необычных, ранее неописанных превращений, основанных на СН-кислотности метильных фрагментов в 3-бром-5,7-диметилпиразоло[1,5-*a*]пиримидине в присутствии *n*-BuLi, при этом показано, что С7-метильная группа более активна, чем С5-метильный фрагмент;

4) Показана склонность 2-*R*-3-бромпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов в присутствии LDA, LiHMDS или *n*-BuLi вступать в реакцию димеризации по С7Н-положению в соответствии с механизмом нуклеофильного замещения водорода (S_NH);

5) Исследована противовирусная активность и цитотоксичность некоторых синтезированных гетероциклов ряда 3-Н- и 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов в системах *in vitro* и *in vivo* в отношении вируса SARS-CoV-2. Проанализированы полученные результаты биологических испытаний и сделаны выводы по соотношению «структура-активность». Для соединения-лидера этилового эфира 2-(адамант-1-ил)-3-бром-7-оксопиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты подготовлена и отправлена заявка на получение патента РФ (Регистрационный номер 2024121106).

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшее развитие темы может быть связано с расширенными исследованиями 3-Н- и 3-галоген-2-(адамант-1-ил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов, нацеленными на поиск соединений с высокой фармакологической активностью не только в отношении коронавирусной инфекции, но и других социально значимых и опасных заболеваний. Такой поиск может быть построен на выявленных в рамках данной диссертации закономерностях «структура-активность». Немаловажным является более детальное изучение региоселективности взаимодействия литийорганических реагентов с 3-Н- и 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинами. В результате оптимизации условий реакции и варьирования электрофильных реагентов могут быть получены С-нуклеозиды пиразоло[1,5-*a*]пиримидинового ряда с высокими выходами и потенциально высокой фармакологической активностью. Обнаруженные необычные превращения в ряду пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов в присутствии литийорганических реагентов также требуют пристального изучения. Изучение механизма реакции образования димерных структур при помощи современных физико-химических методов анализа, а также варьирования электрофильных реагентов в реакциях с 3-бром-5,7-диметилпиразоло[1,5-*a*]пиримидином может привести к открытию новых методов функционализации пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов с получением ранее неизвестных, и потому крайне привлекательных, структур с потенциально интересными химическими и фармакологическими свойствами. Обнаруженный метод синтеза 7,7'-бипиразоло[1,5-*a*]пиримидинов открывает путь к получению систем с потенциально интересными фотофизическими свойствами, в том числе, пуш-пульного типа при введении донорных арильных фрагментов в соединение **56a** с использованием реакцией кросс-сочетания.

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

1. Mukhin, E. M. Approaches to the synthesis of heterocyclic C-nucleosides / E. M. Mukhin, K. V. Savateev, V. L. Rusinov // Russian Chemical Bulletin. – 2023. – Vol. 72, Issue 2. – P. 425-481. (3.42 п.л./1.14 п.л.) (*Scopus, Web of Science*).

2. Mukhin, E. M. 3-Halopyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines as promising precursors of novel C-nucleosides / E. M. Mukhin, K. V. Savateev, E. K. Voinkov, E. N. Ulomsky, V. L. Rusinov // Russian Chemical Bulletin. – 2023. – Vol. 72, Issue 8. – P. 1821-1836. (0.96 п.л./0.19 п.л.) (*Scopus, Web of Science*).

3. **Mukhin E. M.** Unexpected transformations of 3-bromo-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine in reactions with *n*-BuLi / **E. M. Mukhin**, K. V. Savateev, P. A. Slepukhin, V. L. Rusinov // Russian Chemical Bulletin. –2024. – Vol. 73, Issue 6. – P. 1640-1646, Q3 (0.42 п.л./0.11 п.л.) (*Scopus, Web of Science*).

Другие публикации

4. **Mukhin E. M.** The combination of the key structural features of Triazavirin and Remdesivir in the development of azoloazine C-nucleosides / **E. M. Mukhin**, V. L. Rusinov, K. V. Savateev // The Sixth International Scientific Conference «Advances in synthesis and complexing»: Book of abstracts – Moscow, 2022. P – 211. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

5. **Мухин Е. М.** Неприродные С-нуклеозиды в ряду азолоазинов / **Е. М. Мухин**, В. Л. Русинов, К. В. Саватеев // 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021»: Тезисы докладов – Волгоград, 2022. С. 31. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

6. **Мухин Е. М.** С-нуклеозиды азолоазинового ряда – структурные аналоги Ремдесивира и Триазавирин / **Е. М. Мухин**, В. Л. Русинов, К. В. Саватеев // VI Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов»: Тезисы докладов – Екатеринбург, 2022. С. 68. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

7. **Мухин Е. М.** 3-Галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидины – предшественники новых С-нуклеозидов / **Е. М. Мухин**, К. В. Саватеев, В. Л. Русинов // Всероссийская научная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии»: Тезисы докладов – Санкт-Петербург, 2023. – С. 222. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

8. **Мухин Е. М.** Функционализация 3-бром-5,7-диметилпиразоло[1,5-*a*]пиримидина в присутствии *n*-BuLi / **Е. М. Мухин**, К. В. Саватеев, В. Л. Русинов // 6-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2024»: Тезисы докладов – Нижний Новгород, 2024. – С. 260. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

9. **Мухин Е. М.** Исследование взаимодействия 3-бромпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов с LiHMDS / **Е. М. Мухин**, К. В. Саватеев, В. Л. Русинов // VIII Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов»: Тезисы докладов – Екатеринбург, 2024. С. 170. (0.06 п.л./0.02 п.л.)