

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

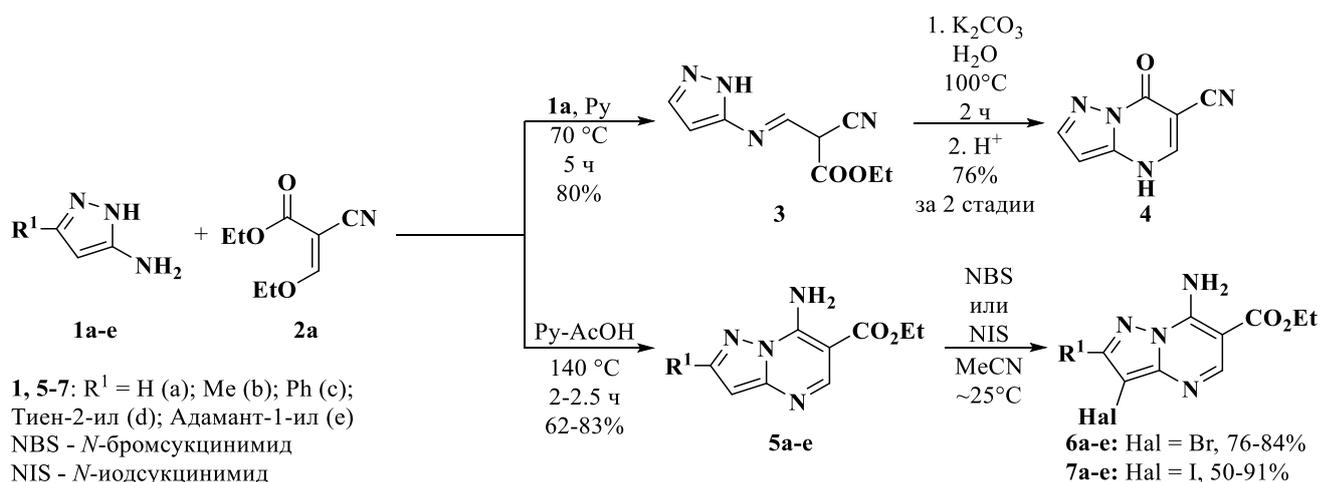
2.1 Разработка методов синтеза 3-бром и 3-йодпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов

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 аминопиразолы и различные биелектрофильные синтетические эквиваленты. Возможно два варианта этой стратегии: использование в качестве исходных соединений галогенсодержащих аминопиразолов 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-аминопиразолов **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-аминопиразоло[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-оксопиразоло[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-аминопиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **5a**. В результате были получены этиловые эфиры 7-амино-3-бром- и 3-йодпиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **6a** и **7a** с общим выходами 66% и 63% соответственно (схема 1).



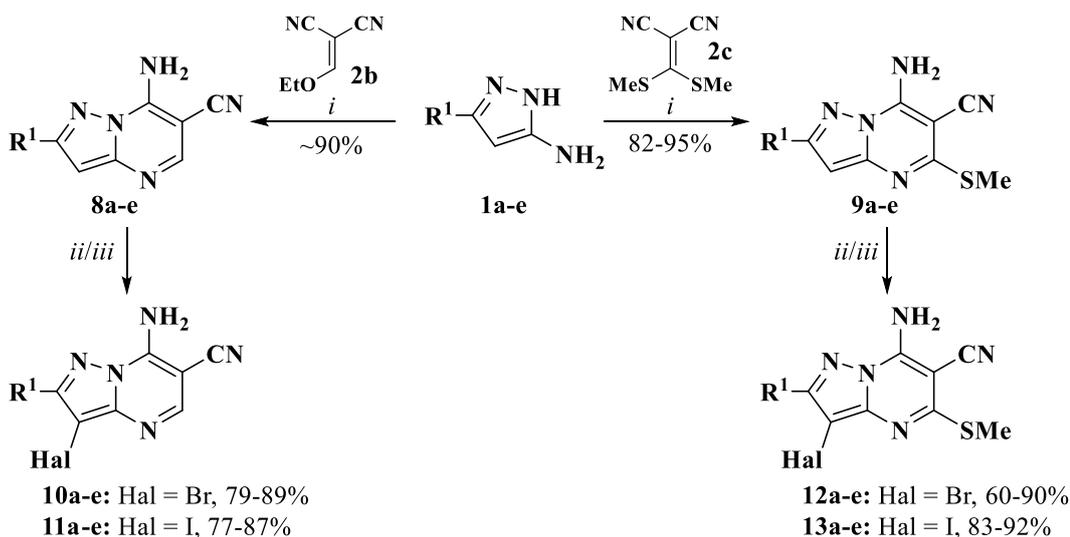
Хороший общий выход целевых продуктов и их химическая индивидуальность стали стимулом для дальнейшей наработки ряда ключевых структур с использованием данного подхода, в результате чего были получены пиразолопиримидины **6b-e** и **7b-e**.

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-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов метод, основанный на введении галогена в предварительно сконструированную бициклическую систему, путём циклоконденсации 5-аминопиразолов с различными биелектрофильными молекулами.

Соединения **8a-e** и **9a-e** получены взаимодействием 3-аминопиразолов **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)пиразоло[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.

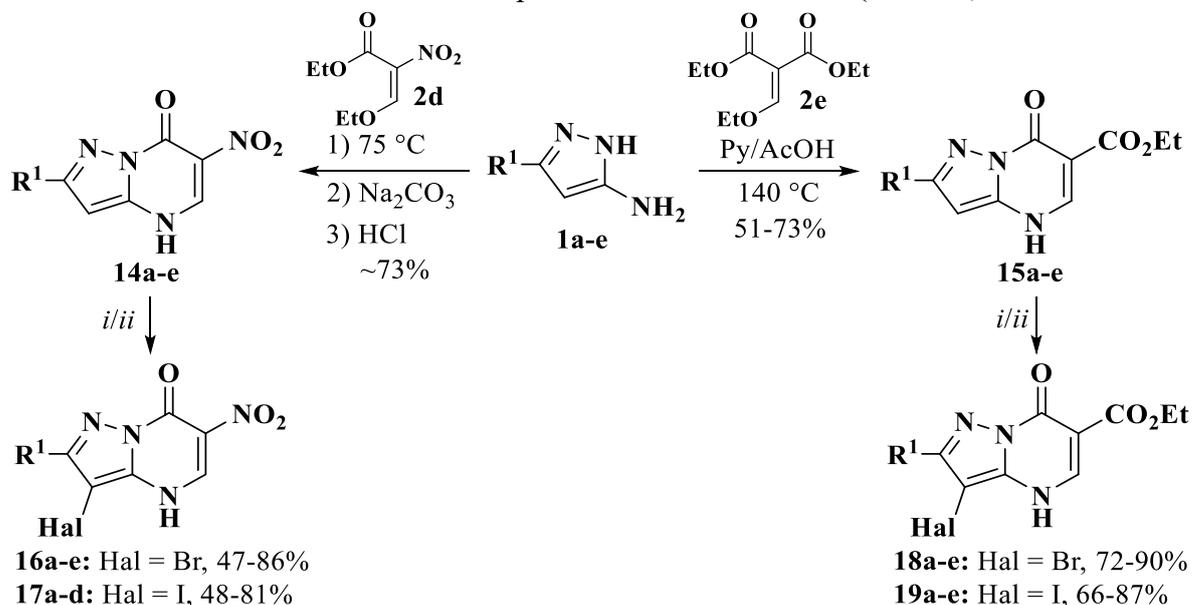


1, 8-13: R¹ = H (a), Me (b); Ph (c); Тиен-2-ил (d); Адамант-1-ил (e)

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)

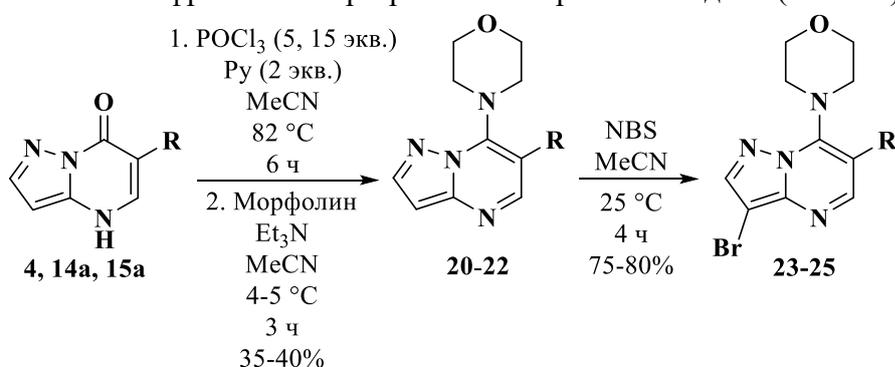
Схема 3. Получение 6-нитро- и 6-этоксикарбонилпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **14a-e**, **15a-e** и их галогенирование

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.

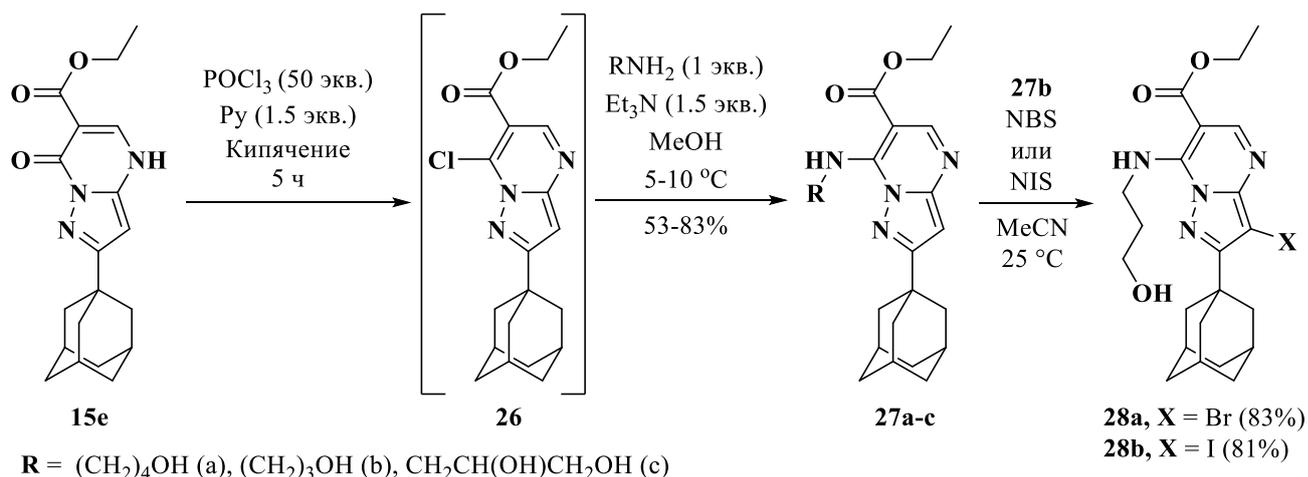


Схема 5. Получение этиловых эфиров 2-(адамант-1-ил)-7-(гидроксиалкиламинов)пиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоновой кислоты **27a-c** и галогенирование соединения **27b**

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

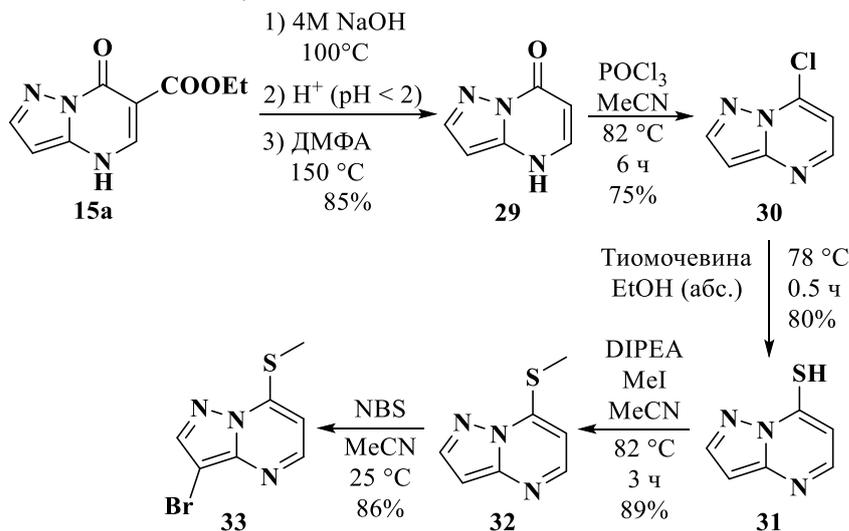


Схема 6. Получение 3-бром-7-(метилсульфанил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидина (**33**)

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 SH-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%.

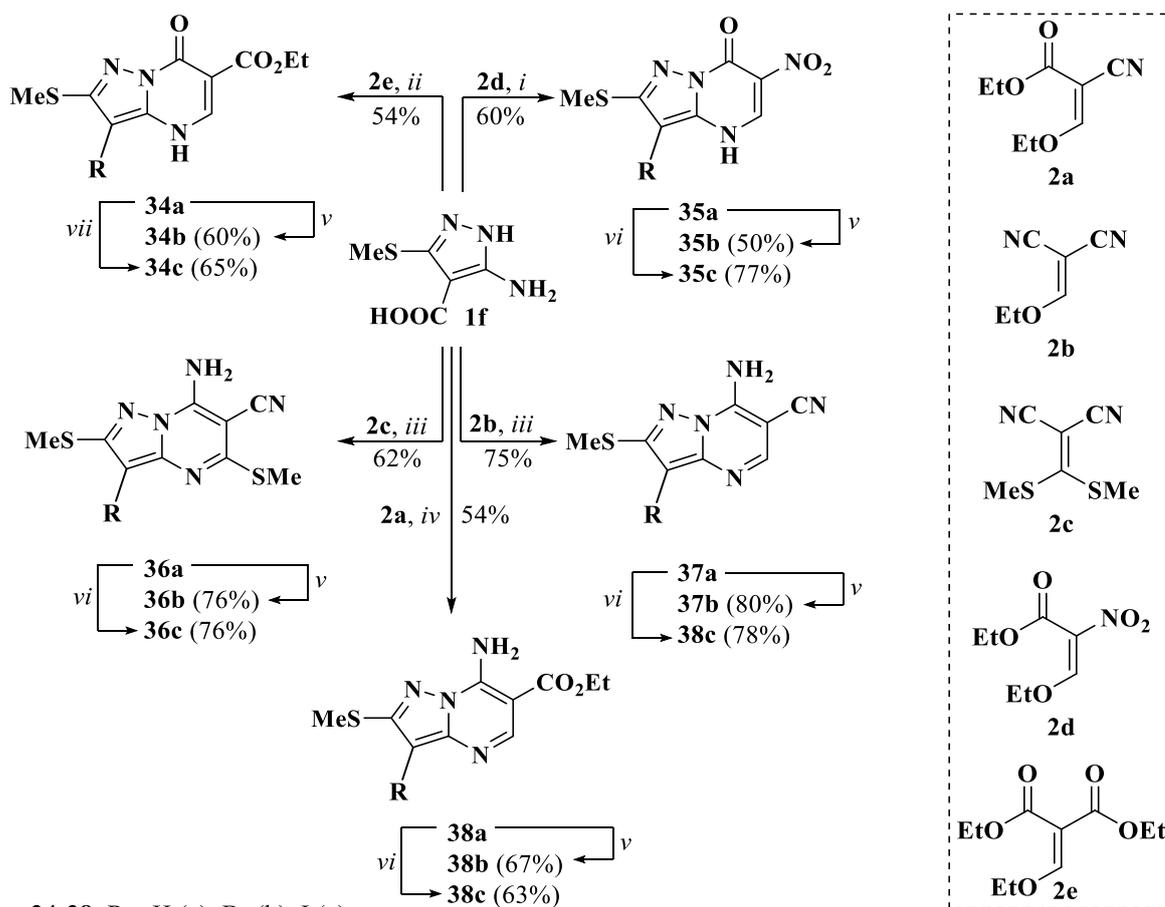


Схема 7. Получение 2-(метилсульфанил)пиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **34a-38a** и их галогенирование

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-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов нами не было обнаружено зависимости легкости галогенирования от заместителей как в пиримидиновом фрагменте, так и от заместителей в С2-положении. В подавляющем большинстве случаев выход продуктов галогенирования варьировался от 60 до 80%, за исключением 3-галоген-2-фенил-6-нитропиразоло[1,5-*a*]пиримидинов – соединения **16c** и **17c** получены с выходами 47% и 48%, соответственно. Продолжительность реакции во всех случаях составила 5 ч.

3-Галогенпиразоло[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-диметилпиразоло[1,5-*a*]пиримидин **39** с выходом 35%.

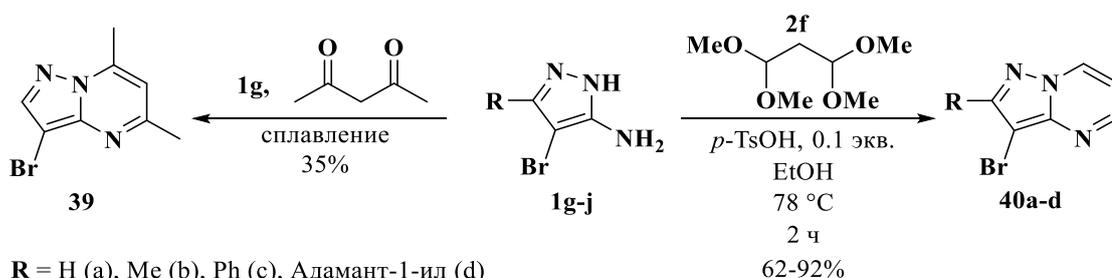


Схема 8. Получение 3-бромпиразоло[1,5-*a*]пиримидинов **39**, **40a-e**

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).

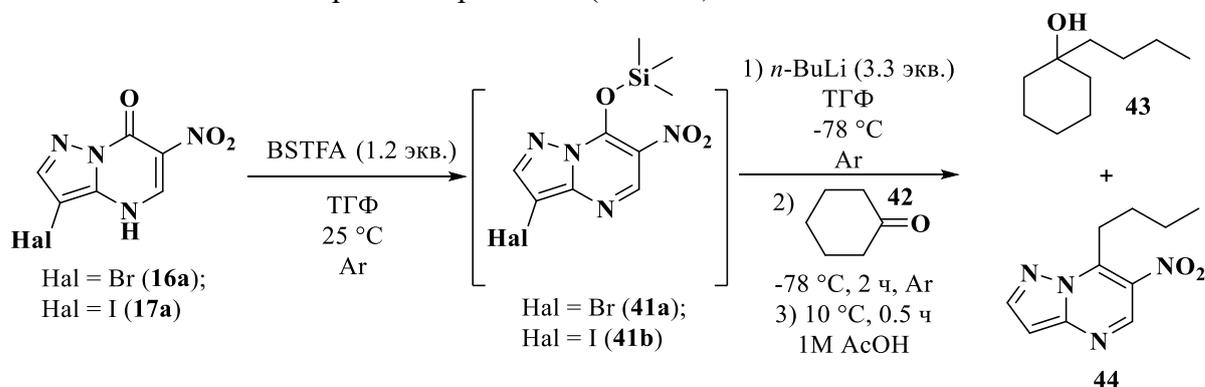


Схема 9. Взаимодействие 3-галоген-6-нитропиразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов **16a** и **17a** с циклогексаноном в присутствии *n*-BuLi

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).

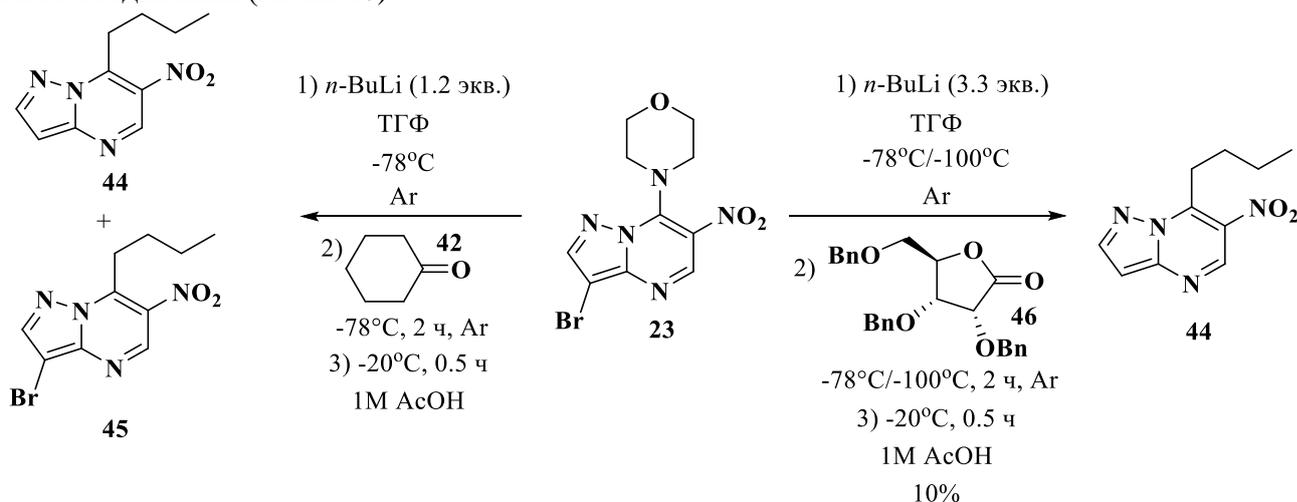


Схема 10. Взаимодействие 3-бром-7-(морфолин-4-ил)-6-нитропиразоло[1,5-*a*]пиримидина **23** с циклогексаноном **42** и рибанолактоном **46** в присутствии *n*-BuLi

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%), бензиловому 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).

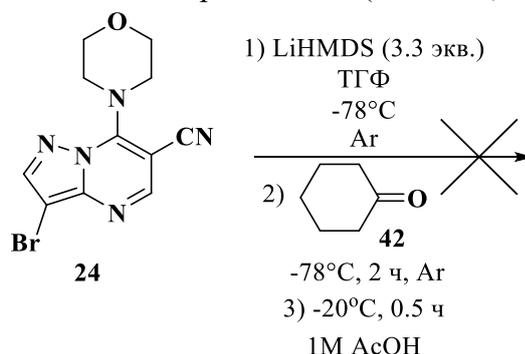


Схема 11. Попытка образования С-С-связи соединения **24** с циклогексаноном **42** в присутствии LiHMDS

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-илпиразоло[1,5-*a*]пиримидин-6-ил)пентан-1-она **47** (схема 12).

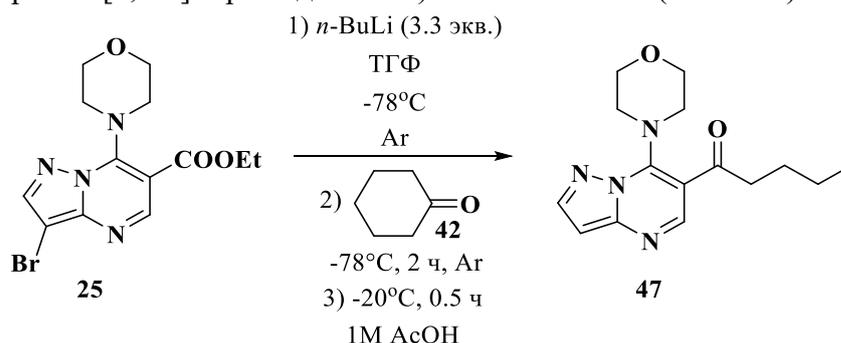


Схема 12. Попытка образования С-С-связи соединения **25** с циклогексаноном в присутствии *n*-BuLi

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).

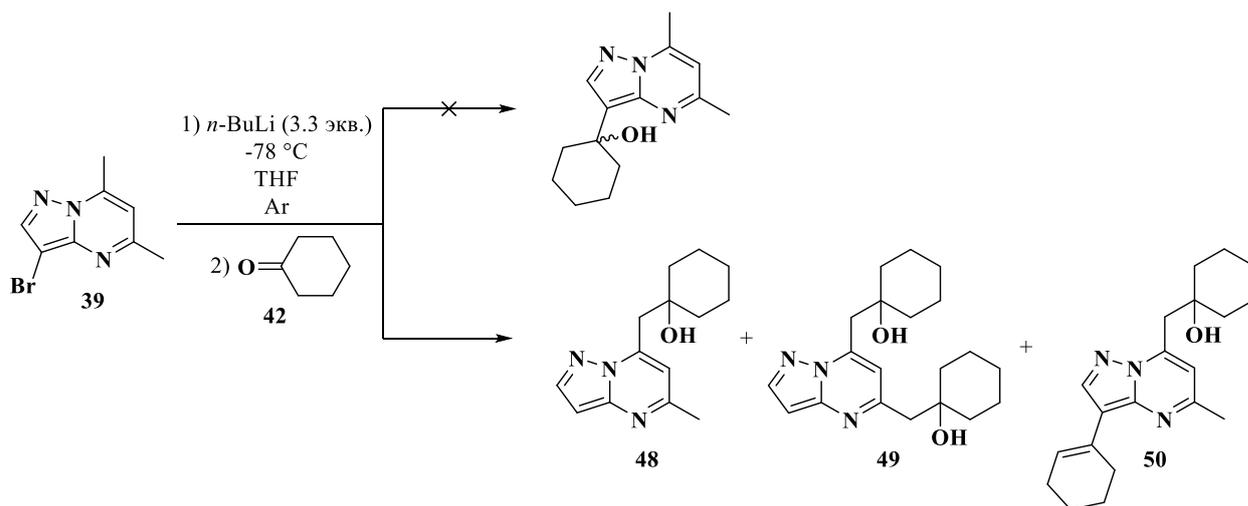


Схема 13. Получение соединений **48-50**

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

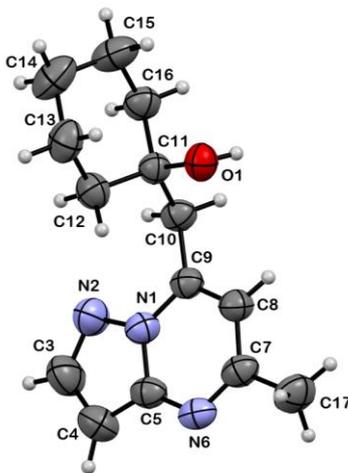


Рисунок 1. Строение молекулы 1-((5-метилпиразоло[1,5-*a*]пиримидин-7-ил)метил)циклогексан-1-ола **48** в тепловых эллипсоидах 50% вероятности

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**.

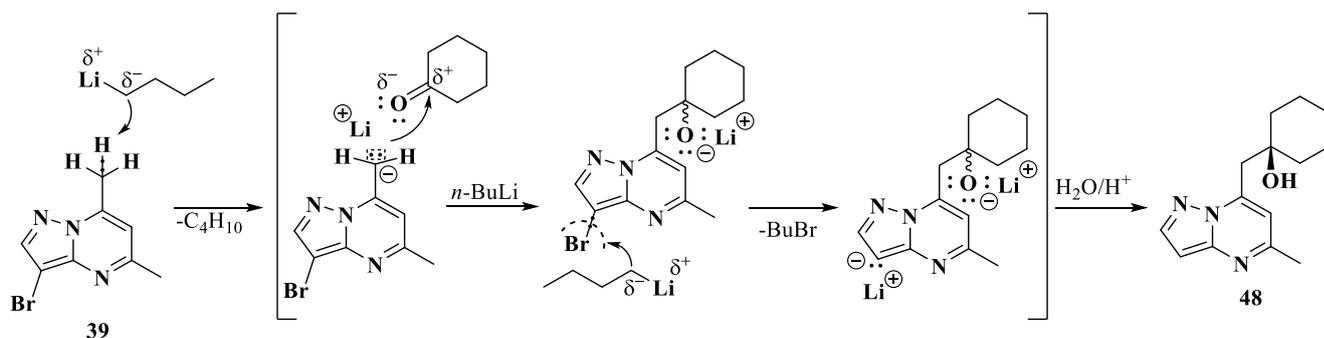


Схема 14. Предполагаемый механизм образования соединения **48**

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	<i>n</i> -BuLi, экв	Время выдержки после добавления <i>n</i> -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).

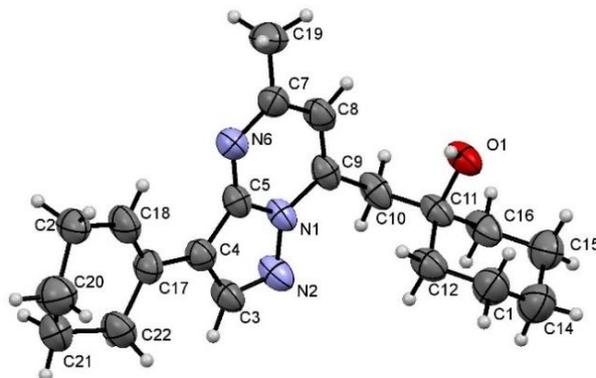


Рисунок 2. Строение молекулы 1-((3-циклогекс-1-ен-1-ил)-5-метилпиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)метил)циклогексан-1-ола **50** в тепловых эллипсоидах 50% вероятности

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).

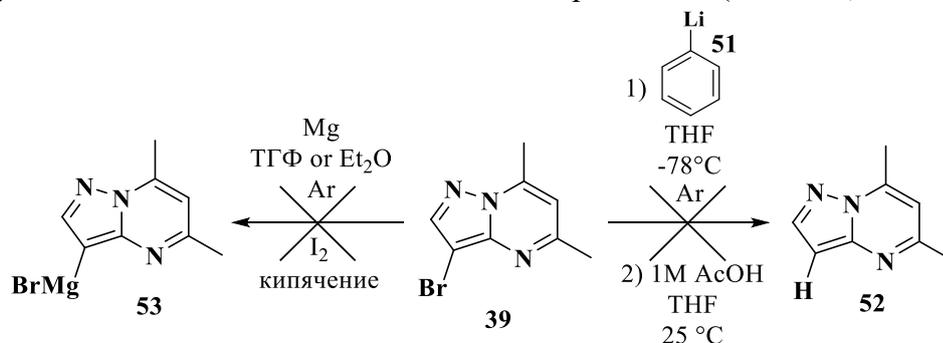


Схема 15. Изучение возможности получения реактива Гриньяра на основе соединения **39**, а также возможности образования карбаниона при обработке фениллитием **51**

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).

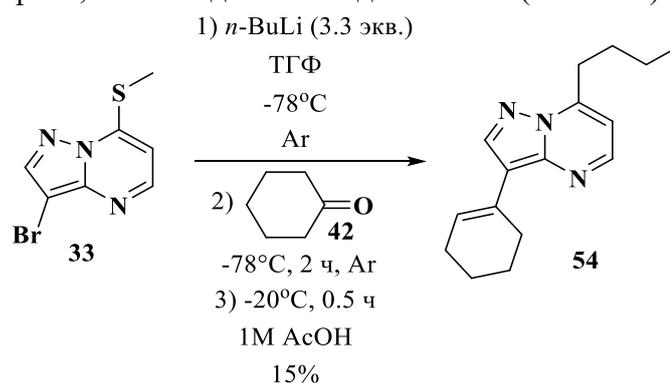


Схема 16. Получение соединения **54**

После такой серии обескураживающих результатов, нами было принято решение использовать в данных превращениях 3-галогенпиразоло[1,5-*a*]пиримидин **40а**, 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).

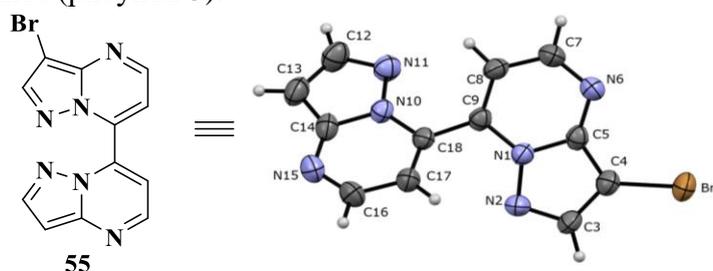


Рисунок 3. Строение молекулы 3-бром-7,7'-бипиразоло[1,5-*a*]пиримидина **55** в тепловых эллипсоидах 50% вероятности

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**.

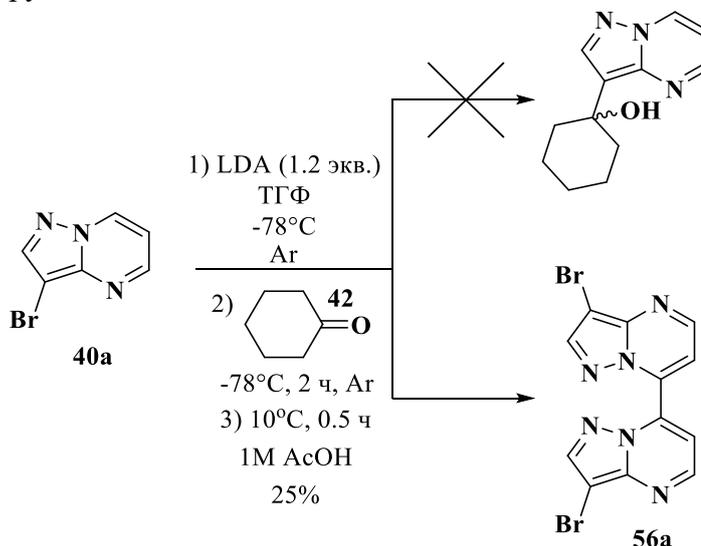


Схема 17. Попытка образования С-С-связи соединения **40a** с циклогексаноном в присутствии LDA

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**.

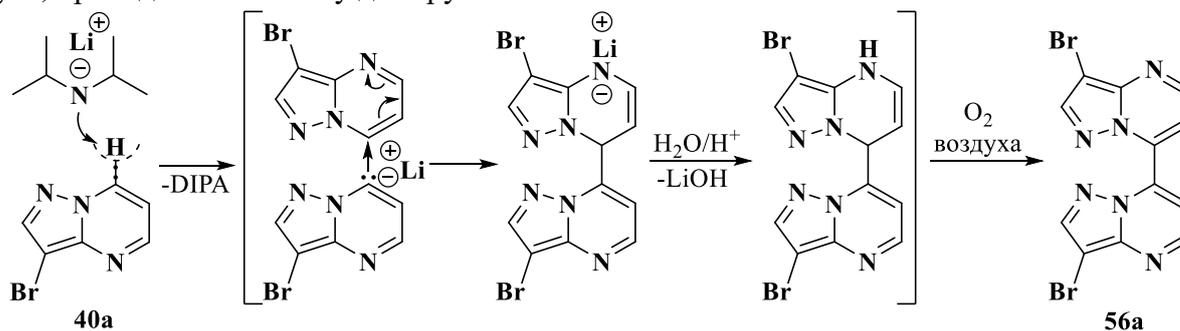
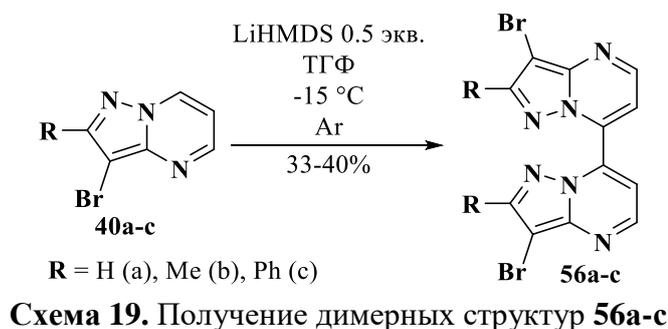


Схема 18. Предполагаемый механизм образованием соединения **56a**

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.)