

На правах рукописи



**Кудрявцев Константин Викторович**

**Новая привилегированная структура  
5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты в мишень-ориентированном  
дизайне и синтезе биологически активных соединений**

02.00.16 – медицинская химия

02.00.03 – органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
доктора химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории органического синтеза кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в лаборатории биомолекулярного скрининга Института физиологически активных веществ РАН

Официальные оппоненты: чл.-корр. РАН, доктор химических наук, профессор  
**Кучин Александр Васильевич**  
заведующий лабораторией органического синтеза и химии  
природных соединений  
(ФГБУН Институт химии Коми НЦ УрО РАН)

доктор химических наук  
**Навроцкий Максим Борисович**  
заведующий кафедрой «Органическая химия»  
(ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный технический  
университет»)

чл.-корр. РАН, доктор химических наук, профессор  
**Терентьев Александр Олегович**  
заведующий лабораторией исследования гомолитических  
реакций  
(ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского  
РАН)

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет", Химический институт им. А.М. Бутлерова

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. на заседании диссертационного совета Д.501.001.69 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.3, химический факультет МГУ, ауд. 446.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте химического факультета МГУ <http://www.chem.msu.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
Д.501.001.69 при МГУ имени М.В.Ломоносова  
доктор химических наук, профессор

Магдесиева Т.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Последние десятилетия ознаменованы интенсивными темпами накопления биологических знаний о молекулярных механизмах и путях функционирования организмов в нормальном и патологическом состояниях. Расшифровка генома человека обеспечила идентификацию большого количества биологических мишеней (ферментов, рецепторов, ионных каналов, ДНК, РНК, белок-белковых взаимодействий), фармакологическая коррекция которых открывает грандиозные возможности для улучшения качества жизни населения. В этой связи получение новых органических соединений, обладающих эффективным терапевтическим действием, основанном на установленном влиянии на биологическую мишень, и достаточной безопасностью применения, представляет собой чрезвычайно востребованную со стороны общества проблему. Несмотря на развитие и внедрение высокопроизводительных скрининговых технологий, позволяющих тестировать миллионы доступных органических соединений на разнообразные виды биологической активности, количество лекарственных кандидатов, успешно прошедших доклинические и клинические исследования, не претерпело пропорционального взрывного увеличения. В связи с этим в медицинской химии развиваются и совершенствуются рациональные направления в дизайне многообещающих низкомолекулярных терапевтических агентов, позволяющие на самых начальных стадиях разработки соединений-лидеров снижать риски и материальные затраты на последующих этапах внедрения кандидата в лекарственное средство. Среди таких направлений выделяются фрагментационные методы, идентифицирующие подходящий молекулярный каркас потенциального кандидата, и методы, направленные на генерирование максимального разнообразия сфокусированных библиотек соединений из должным образом модифицированного молекулярного каркаса.

Одним из фрагментационных подходов, позволяющих на стадии планирования синтетической работы заложить более высокую вероятность получения целевой биологической активности, в том числе по отношению к новым и/или неизвестным биологическим мишеням, по сравнению со стохастическим скринингом, является *концепция привилегированных структур*. Вычленение общего фрагмента из молекулярной структуры известных биологически активных веществ и последующее получение на основе этого структурного фрагмента новых соединений развивается как направление в медицинской химии, обеспечивающее целенаправленное получение соединений с запланированной биологической активностью. Идентификация *привилегированной структуры* в большинстве случаев проводится эмпирически, путём сопоставления химического строения биологически активных соединений и вызываемого ими эффекта при воздействии на биомолекулярные мишени различных типов. На основе анализа большого массива экспериментальных данных в настоящем диссертационном исследовании была выдвинута гипотеза о привилегированности ранее не относимого к *привилегированным структурам* молекулярного фрагмента, имеющего строение 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты. Далее была выбрана синтетическая методология для генерации 5-арилпирролидин-2-карбоновых кислот, имеющих различные заместители; были получены разнообразные производные 5-арилпирролидин-2-карбоновых кислот с установленными относительными и абсолютными конфигурациями стереогенных центров; осуществлены их разнонаправленные синтетические модификации, позволившие ввести заместители различной природы и усложнить родоначальный молекулярный каркас; исследована биологическая активность полученных сфокусированных библиотек соединений, содержащих структурный фрагмент 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты; проведено молекулярное моделирование взаимодействия синтезированных соединений и биомолекулярных мишеней; определены соотношения «*структура–активность*». Таким образом, в настоящей диссертации был впервые спланирован и осуществлён полный цикл взаимосвязанных теоретических и экспериментальных исследований по новой *привилегированной структуре* – 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоте.

**Цель и задачи.** Цель настоящего диссертационного исследования состояла в создании теоретически обоснованной стратегии направленного получения новых органических соединений, обладающих приемлемым профилем физико-химических характеристик и биологической активности, и в последующей экспериментальной разработке на основе указанной стратегии мишень-ориентированных потенциальных кандидатов в лекарства для терапии социально значимых заболеваний.

Для выполнения поставленной цели решались следующие задачи:

- идентификация новой привилегированной структуры для последующего дизайна новых биологически активных веществ;
- разработка синтетических методов получения и модификации молекулярного каркаса привилегированной структуры 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты, позволяющих синтезировать сфокусированные библиотеки органических соединений различного строения, имеющих высокий индекс молекулярного разнообразия и занимающих различные области биологически значимого химического пространства;
- установление соотношений «структура–активность» для синтезированных органических соединений при изучении биологической активности по отношению к релевантным биомакромолекулярным мишеням, участвующим в патогенезе заболеваний бактериального, сердечно-сосудистого, пищеварительного, онкологического профиля.

**Научная новизна.** В диссертационном исследовании впервые проведено теоретическое и экспериментальное изучение влияния представительного набора органических соединений, содержащих структурный фрагмент 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты, на ферменты, клетки, органы и организмы. Определены биологические мишени и сигнальные пути в патогенезе сердечно-сосудистых, онкологических, пищеварительных, бактериальных заболеваний, подвергающиеся воздействию новых низкомолекулярных агентов, содержащих привилегированную структуру 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты, и функциональных аналогов другого строения. С использованием синтетической методологии 1,3-диполярного циклоприсоединения азометиновых илидов разработаны новые методы синтеза коротких  $\beta$ -пролиновых пептидов упорядоченного строения, в том числе энантимерно чистых. Разработаны эффективные методы синтеза новых полициклических насыщенных азаетероциклов, в том числе мостиковых и аннелированных, из производных 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоновых кислот. В представленном исследовании впервые в качестве диполярофилов в 1,3-диполярном циклоприсоединении азометиновых илидов были изучены  $\alpha$ -бромвинилфенилсульфон, рацемические и энантимерно чистые диэферы *N*-акрилоил-5-арилпирролидин-2,4-дикарбоновых кислот. Для дивинилсульфона и малеинового ангидрида, как диполярофилов в 1,3-диполярном циклоприсоединении азометиновых илидов, были разработаны условия эффективного синтеза соответствующих новых пирролидиновых циклоаддуктов.

**Практическая значимость.** В представленном диссертационном исследовании обобщены имеющиеся в литературных источниках данные по биологической активности низкомолекулярных органических соединений, содержащих структурный фрагмент 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты, с акцентированием биомакромолекулярных мишеней, определяющих указанную активность. Построены и оптимизированы компьютерные модели тромбина, трипсина, фактора Ха, сортазы *A. S. aureus*, простагландиновых рецепторов, киназы Аврора А, позволяющие ранжировать известные ингибиторы, антагонисты и агонисты по экспериментальной биологической активности, а также предсказывающие способы взаимодействия новых соединений, в том числе синтезированных в диссертационной работе, с перечисленными белковыми мишенями.

В диссертационном исследовании разработаны экспериментальные методы синтетических модификаций молекулярного каркаса 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты, позволяющие получать новые рацемические и энантимерно чистые гетероциклические соединения, в том числе относящиеся к неизвестным ранее классам 3,5,6,7-замещённых 3,6-

диазабицикло[3.2.1]октанов, 2,5,6а-замещённых октагидропирроло[3,4-*b*]пиррол-3-карбоновых кислот, функционализированных поли-β-пролинов.

В результате проведённых работ получены новые органические соединения, ингибирующие ферментативную активность сортазы *A. S. aureus*, что может быть использовано для снижения вирулентности этого высокопатогенного микроорганизма; синтезированы новые низкомолекулярные ингибиторы прокоагулянтной активности тромбоцитов и сериновых протеаз коагуляционного каскада, тромбина и фактора Ха, для потенциального использования в терапии тромботических явлений; получены новые низкомолекулярные агенты, обладающие доказанным профилактическим и терапевтическим действием *in vivo* по отношению к язвенным поражениям слизистой оболочки желудка различной этиологии; синтезированы новые органические соединения, замедляющие пролиферацию и вызывающие апоптоз клеток гормонорезистентного рака простаты различного происхождения путём воздействия на важные ферменты и сигнальные пути злокачественных клеток.

**Положения, выносимые на защиту.** 5-Арилпирролидин-2-карбоновые кислоты являются класс-ориентированными *привилегированными структурами* для создания эффективных лигандов таких фармакологически важных семейств биомишеней, как цинк-зависимые металлопротеазы, интегрин, вирусные РНК-зависимые РНК полимеразы, ионотропные глутаматные рецепторы, сериновые протеазы; эффекторов сигнальных путей Wnt, Hedgehog, PI3K/Akt/mTOR.

Новые методы синтеза 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанов (3,5,6,7-замещённых) и октагидропирроло[3,4-*b*]пиррол-3-карбоновых кислот (2,5,6а-замещённых), основанные на реакция сочетания функциональных групп в производных 5-арилпирролидин-2-карбоновых кислот.

Методы синтеза новых рацемических и оптически активных β-пролиновых олигомеров альтернированного строения, основанные на 1,3-диполярном циклоприсоединении, в том числе асимметрических вариантах, азометиновых илидов и пространственно затруднённых акриламидов.

Неизвестный ранее метод влияния на стереоселективность 1,3-диполярного циклоприсоединения азометиновых илидов путём введения трифторметильного заместителя в структуры диполярофила и азометинового илида.

Производные 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты, модифицированные 4-винилсульфонильным заместителем, ингибируют функциональную активность биомакромолекул, содержащих цистеиновые аминокислотные остатки в активном центре / функциональном участке (сортаза *A. S. aureus*, рецепторы тромбоцитов).

N-((2-гидроксифенил)тио)ацетильные производные α-аминокислот обладают системным профилактическим и терапевтическим противоязвенным действием *in vivo* по отношению к язвенным поражениям слизистой оболочки желудка различной этиологии.

Функционализированные поли-β-пролины альтернированного строения проявляют системную антипролиферативную активность по отношению к клеточным линиям гормонорезистентного рака простаты различных генных типов.

**Личный вклад автора.** Автором сформулированы ключевые гипотезы и направления развития диссертационного исследования; проведены системный анализ научно-технических источников информации и планирование работ; выполнены некоторые синтетические эксперименты; осуществлена координация работ всех соавторов исследования, в том числе руководство проектами, результаты которых вошли в диссертацию; обобщены все полученные результаты, в том числе подготовлены материалы для публикаций по теме диссертации.

**Апробация работы.** Результаты исследований были представлены и докладывались в 2005-2016 г.г. в виде устных, приглашённых и пленарных докладов на следующих международных и российских конференциях, симпозиумах и съездах: *MedChem Europe "Molecules that Matter: Case Studies in Medicinal Chemistry"*, Berlin (2005); *International Symposium "Advances in Science for Drug Discovery"*, Moscow (2005); *International Conference "New Molecular Targets for Drug*

*Design and Discovery. The Perspectives of Integrating Russian Scientists into International Cooperation*”, Moscow (2006); *1st Turkish–Russian Joint Meeting on Organic and Medicinal Chemistry*, Antalya, Turkey (2009); *7th International Symposium for Chinese Medicinal Chemists (ISCMC-2010)*, Kaohsiung, Taiwan (2010); VIII Всероссийская конференция с международным участием «Химия и Медицина», Уфа (2010); III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010», Москва (2010); международная конференция «Актуальные проблемы химии природных соединений», Ташкент, Узбекистан (2010); III Международная конференция «Химия гетероциклических соединений», Москва (2010); *2011 Taiwanese–Russian Organic, Medicinal and Bio Chemistry Interactions and PST Medicinal Chemistry Symposium*, XITOU, Taiwan (2011); научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», Новый Свет, Украина (2011); *International Congress on Organic Chemistry dedicated to the 150-th anniversary of the Butlerov’s Theory of Chemical Structure of Organic Compounds (the Butlerov’s Congress)*, Kazan, Russia (2011); междисциплинарная научная конференция «Адаптационные стратегии живых систем», Новый Свет, Украина (2012); *10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, Ankara, Turkey (2012); IV съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», Казань (2012); 4th International Scientific Conference “*Advances in Pharmacology and Pathology of the Digestive Tract*”, Kiev, Ukraine (2012); Первая Российская конференция по Медицинской химии, Москва (2013); *9th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium in 2013 (AIMECS13)*, Taipei, Taiwan (2013); Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии (МОБИ-Хим2014), Новый Свет, Крым, РФ (2014); X Всероссийская конференция «Химия и Медицина», Уфа-Абзаково (2015); Вторая Российская конференция по Медицинской химии, Новосибирск (2015); *10th International Symposium for Chinese Medicinal Chemists (ISCMC-2016)*, Sanyi, Taiwan (2016); *5th Symposium on Foldamers*, Bordeaux-Pessac, France (2016).

**Публикации.** Основные результаты диссертационного исследования изложены в 28<sup>ми</sup> статьях в периодических научных изданиях из списка ВАК, 5<sup>ти</sup> статьях в сборниках научных работ и научных журналах, 5<sup>ти</sup> патентах РФ на изобретение, и в 19<sup>ти</sup> тезисах устных докладов на конференциях, симпозиумах и съездах российского и международного уровней.

**Источники финансирования.** Выносимые на защиту результаты получены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) по проектам №№ 08-04-01800-а, 09-03-92011-ННС\_а, 11-03-00630-а, 11-03-91375-СТ\_а, 12-03-92005-ННС\_а, 14-03-00963-а; Министерства образования и науки РФ по государственному контракту (ГК) № 11.519.11.2032; Российской академии наук (РАН) по проектам программ 3 и 9 ОХНМ (2012-2016 г.г.). В указанных проектах РФФИ и ОХНМ-9 РАН автор выполнял функции руководителя проекта, в ГК и проектах ОХНМ-3 РАН – функции ответственного исполнителя.

**Структура и объём работы.** Диссертация изложена на 480 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, девяти глав обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, списка цитированной литературы, содержит 79 таблиц, 37 схем и 114 рисунков.

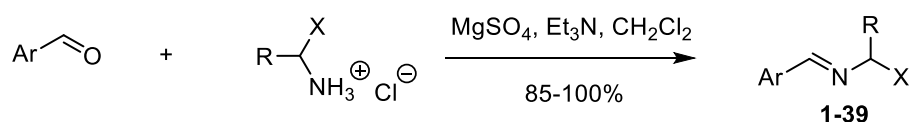
## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Глава 1.** Рассмотрено развитие в медицинской химии концепции *привилегированных структур* (ПС). Сформулированы критерии отбора ПС среди изучаемых соединений-кандидатов: а) небольшой молекулярный вес, позволяющий проводить модификацию/введение функциональных групп (ФГ) и получение библиотеки соединений, характеризующейся достаточным молекулярным разнообразием; б) присутствие циклических фрагментов, определяющих конформационную ограниченность и, следовательно, снижение потери энтропии при взаимодействии с макромолекулой биомишени, большую биодоступность и упорядоченное пространственное расположение периферических заместителей; в) ароматический заместитель и/или ароматический аннелированный фрагмент, обеспечивающие

гидрофобные взаимодействия с мишенью; 2) наличие эндоциклических гетероатомов/ФГ в циклическом фрагменте, позволяющих образовывать дополнительные водородные связи или другие специфические взаимодействия с биологической мишенью и обеспечивающих возможность структурной модификации. Приведены известные данные по биологической активности и биомакромолекулярным мишеням для соединений, содержащих структурный фрагмент 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты (5-Ar-2-ПКК). Сделан вывод о *привилегированности* 5-Ar-2-ПКК.

**Глава 2.** В первой части Главы 2 обоснован выбор реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения (1,3-ДЦ) азометиновых илидов (АИ) для получения функционализированных производных 5-Ar-2-ПКК. Рассмотрены стереохимические особенности данной синтетической методологии и проанализированы известные условия и результаты 1,3-ДЦ АИ, которые были использованы при проведении экспериментальных синтетических работ в диссертации. Во второй и третьей частях Главы 2 рассматриваются полученные в диссертационном исследовании результаты, связанные с применением методологии 1,3-ДЦ АИ для синтеза новых рацемических и энантимерно чистых производных 5-Ar-2-ПКК.

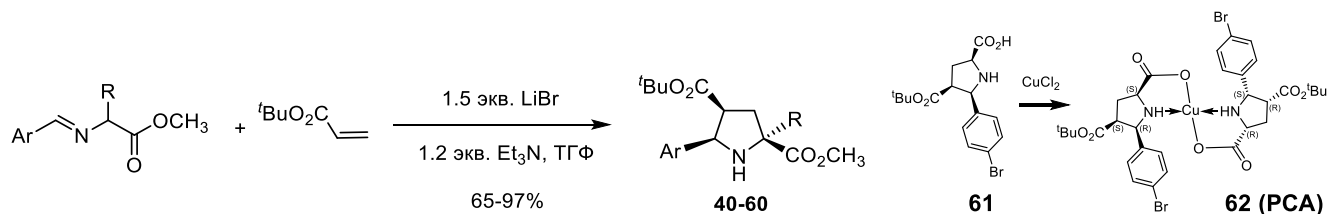
Синтетическими предшественниками АИ служили имины **1-39**, получаемые из ароматических альдегидов и эфиров  $\alpha$ -аминокислот (Схема 2.1).



**Ar:** Ph (**1,17,28,31,34,38,39**); 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**2,18**); 2-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**3**); 3-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**4,21,33**); 4-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**5,22,29**); 2,3-(F)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**6**); 2-CF<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**7,20**); 4-CF<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**8**); 2-F-5-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**9**); 3-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**10**); 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**11,24,35**); 2,4-(Cl)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**12**); 3,5-(Cl)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**13**); 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**14,30**); 3,4,5-(CH<sub>3</sub>O)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub> (**15**); 2-тиенил (**16**); 2-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**19**); 2-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**23**); 2-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**25**); 3,5-(<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-4-OHC<sub>6</sub>H<sub>2</sub> (**26**); 4-CNC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**27**); 3-пиридил (**32,37**); 3,4-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**36**). **R:** H (**1-16**); CH<sub>3</sub> (**17-27**); Et (**28-30**); <sup>t</sup>Bu (**31,32**); Bn (**33**), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**34-37**). **X:** CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**1-37**); CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu (**38**); C(O)NHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**39**).

Схема 2.1

Для получения рацемических производных 5-Ar-2-ПКК **40-60**<sup>\*</sup>, содержащих в 4-ом положении пирролидинового кольца вторую карбоксильную функцию, проводили генерацию АИ из иминоэфиров **1-3**, **5**, **6**, **9**, **10**, **12**, **17-25**, **29-32** при помощи системы LiBr/Et<sub>3</sub>N и последующее циклоприсоединение *трет*-бутилакрилата (Схема 2.2). При долговременной водной обработке 2-метоксикарбонильная группа диэфира 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоновой кислоты **41** подвергается селективному гидролизу с образованием рацемической кислоты **61**, которая с хлоридом меди(II) в метаноле образует комплексное соединение **62**<sup>†</sup>, две энантимерные молекулы **61** обеспечивают плоско-квадратное окружение иона Cu<sup>2+</sup> (Схема 2.2).



**Ar:** Ph (**40,48,59**); 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**41,49**); 2-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**42**); 4-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**43,53,57**); 2,3-(F)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**44**); 2-F-5-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**45**); 3-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**46**); 2,4-(Cl)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**47**); 2-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**50**); 2-CF<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**51**); 3-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**52**); 2-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**54**); 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**55**); 2-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**56**); 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**58**); 3-пиридил (**60**). **R:** H (**40-47**); CH<sub>3</sub> (**48-56**); Et (**57,58**); <sup>t</sup>Bu (**59,60**).

Схема 2.2

\* Здесь и далее при обсуждении результатов диссертационной работы структурные формулы отражают как относительные, так и абсолютные конфигурации стереоцентров в молекуле. Для энантимерно чистых/оптически активных соединений перед их порядковыми номерами обязательно указан знак поляриметрического вращения (+) или (-). В случае рацемических соединений дополнительные символы перед номером соединения не приводятся либо указан знак ( $\pm$ ), и структурная формула отражает относительную конфигурацию стереоцентров.

<sup>†</sup> После номеров соединений, охарактеризованных рентгеноструктурным анализом (РСА), на соответствующих схемах и в таблицах в скобках указано «РСА».

Незамещённый акриламид вступает в реакцию с АИ, генерируемыми под действием LiBr/Et<sub>3</sub>N из иминоэфиров **27** и **32**, с образованием 4-карбамоил-5-Ar-2-ПКК **63** и **64** соответственно (Схема 2.3).

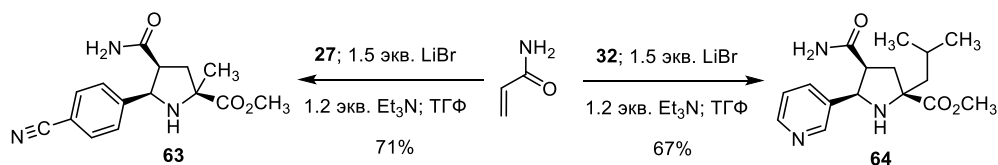
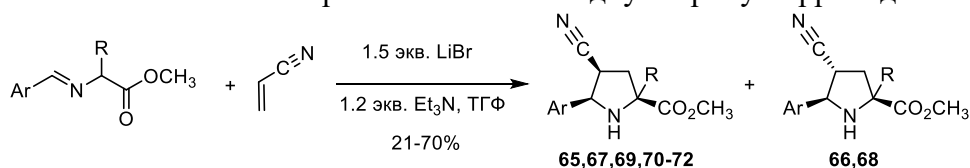


Схема 2.3

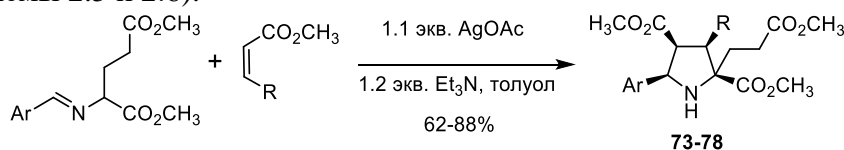
Взаимодействие иминоэфиров **1**, **3**, **10**, **19**, **23**, **24** с акрилонитрилом приводит к образованию двух пирролидиновых циклоаддуктов **65-72** (Схема 2.4). Преобладающие изомеры представляют собой *эндо*-циклоаддукты **65**, **67**, **69**, **70-72**, в которых арильный, циано- и метоксикарбонильный заместители располагаются по одну сторону пирролидинового цикла.



Ar: Ph (**65,66,70**); 2-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**67,68**); 3-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**69**); 2-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**71**); 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**72**). R: H (**65-69**); CH<sub>3</sub> (**70-72**).

Схема 2.4

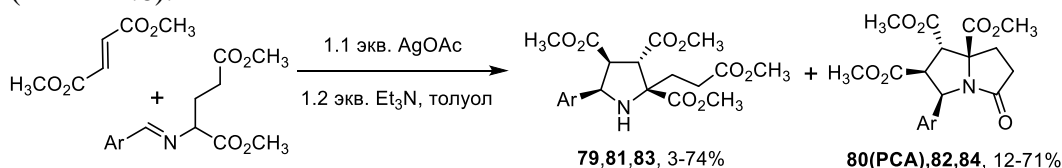
Для получения пирролидинсодержащих аналогов глутаминовой кислоты **73-78**, **79**, **81**, **83** использован метод генерации АИ при помощи системы AgOAc/Et<sub>3</sub>N и последующее циклоприсоединение метилакрилата, диметилмалеата и диметилфумарата, протекающее как *эндо*-процесс (Схемы 2.5 и 2.6).



Ar: Ph (**73,76**); 3,4-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**74,77**); 3-пиридил (**75,78**). R: H (**73-75**); CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**76-78**).

Схема 2.5

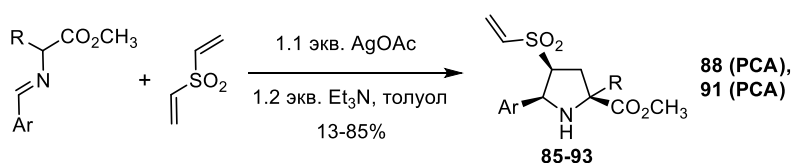
AgOAc/Et<sub>3</sub>N-индуцируемое 1,3-ДЦ иминоэфиров **34**, **36**, **37** и диметилфумарата сопровождается лактамизацией пирролидиновых циклоаддуктов **79**, **81**, **83** и образованием пирролизидинов **80**, **82**, **84** (Схема 2.6).



Ar: Ph (**79,80**); 3,4-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**81,82**); 3-пиридил (**83,84**).

Схема 2.6

Модификация 4-го положения 5-Ar-2-ПКК винилсульфонильным заместителем достигается взаимодействием дивинилсульфона с АИ (Схема 2.7). 1,3-ДЦ иминоглицинатов **1-4** приводит к образованию пирролидинилвинилсульфонов **85-88** с низкими выходами вследствие конкурентного Михаэлевского присоединения дивинилсульфона. Из иминоэфиров замещённых α-аминокислот стереоселективно образуются рацемические эфиры *цис*-4-винилсульфонил-5-Ar-2-ПКК **89-93** с выходами 64-85% (Схема 2.7).



Ar: Ph (**85,89,91**); 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**86**); 2-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**87**); 3-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**88,90**); 3,4-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**92**); 3-пиридил (**93**).

R: H (**85-88**); CH<sub>3</sub> (**89**); Bn (**90**), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**91-93**).

Схема 2.7



Эфир (*S*)-4-оксо-2-фталимидобутановой кислоты **94** использовали для синтеза альдимины **95**, который при 1,3-ДЦ с дивинилсульфоном генерирует хиральный циклоаддукт (*-*)-**96**, представляющий собой смесь двух изомеров в соотношении 3.5:1 (Схема 2.8).

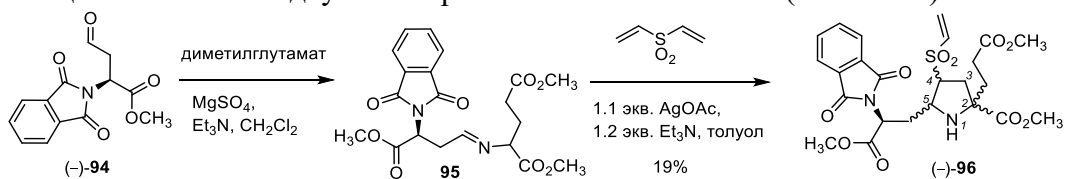


Схема 2.8

$\alpha$ -Бромвинилфенилсульфон (**97**) впервые изучен в качестве диполярфила в (3+2)-циклоприсоединении с АИ (Схема 2.9). При генерации металло-АИ при помощи системы AgOAc/основание из иминоэфиров **1** и **2** в присутствии винилсульфона **97** наблюдалось образование двух пар пирролидиновых циклоаддуктов **98/99** и **100/101**, соответственно (Схема 2.9). Суммарный выход достигает количественных значений, а соотношение *эндо*-/*экзо*-циклоаддуктов зависит от природы основания и изменяется от 4-х ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) до 1-го (DBU).

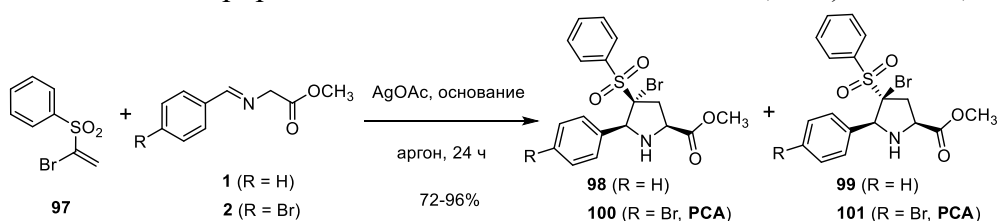
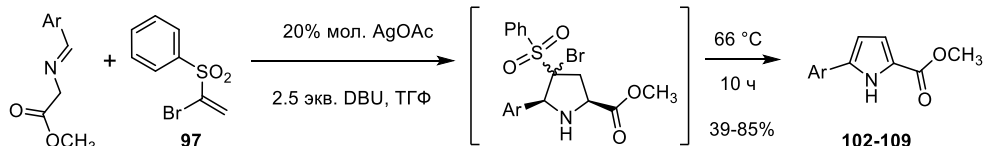


Схема 2.9

При использовании стехиометрических количеств DBU в реакционных смесях фиксировалось образование метиловых эфиров 5-арилпиррол-2-карбоновых кислот. Подбор и оптимизация условий реакции привели к разработке нового однореакторного синтеза эфиров 5-арилпиррол-2-карбоновых кислот **102-109**, исходя из иминоглицинатов (Схема 2.10).



Ar: Ph (**102**); 4- $\text{BrC}_6\text{H}_4$  (**103**); 2- $\text{FC}_6\text{H}_4$  (**104**); 4- $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_4$  (**105**); 4- $\text{ClC}_6\text{H}_4$  (**106**); 3,5-( $\text{Cl}$ ) $_2\text{C}_6\text{H}_3$  (**107**); 3,4,5-( $\text{CH}_3\text{O}$ ) $_3\text{C}_6\text{H}_2$  (**108**, PCA); 2-тиенил (**109**).

Схема 2.10

С использованием рацемического альдегида **94**, диэтиламиноацетата и фенилвинилсульфона реализован трёхкомпонентный синтез полифункционального пирролидинового производного **110**, представляющего собой единственный продукт тандемного превращения, относительная конфигурация трёх стереогенных центров которого установлена при помощи PCA (Схема 2.11).

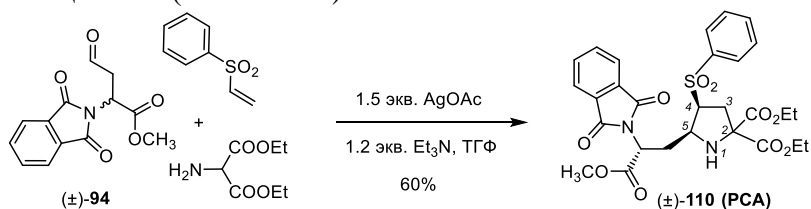


Схема 2.11

Генерация металло-АИ из иминоэфира **39** при помощи AgOAc/ $\text{Et}_3\text{N}$  и последующее 1,3-ДЦ с метилакрилатом приводят к получению рацемического дипептида **111**, миметика структурного фрагмента коллагена – пролилглицина (Схема 2.12).

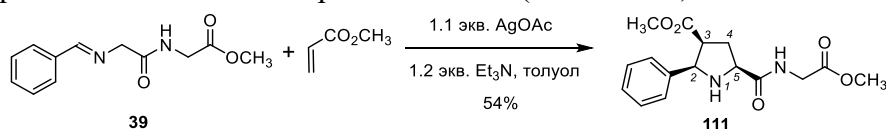


Схема 2.12

В нашей работе сформулирована гипотеза о катализе 1,3-ДЦ АИ  $\alpha$ -аминокислотами путём последовательного N-протонирования иминоэфира **1** и его  $\alpha$ -депротонирования с образованием *син,син*-АИ, находящегося в равновесии с *син,анти*-АИ (Схема 2.13). Кроме того,  $\alpha$ -аминокислота может оказать стабилизирующее влияние на *син,син*-АИ вследствие образования в предельном случае ассоциата, в котором заместители R при хиральном центре и R<sup>1</sup> при аминокислотном атоме азота дифференцируют подход диполярфила и вызывают асимметрическую индукцию (Схема 2.13).

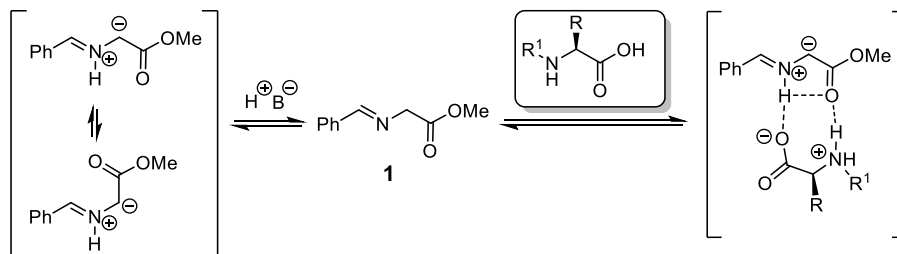


Схема 2.13

Для модельной реакции были выбраны иминоглицинат **1** и *N*-метилмалеимид (NMM), предъявляющие минимальные стерические требования к геометрии переходного состояния 1,3-ДЦ (Схема 2.14). Взаимодействие этих компонентов проводили в различных растворителях в присутствии 20-40% мольных  $\alpha$ -аминокислот: L-пролина (L-Pro), L-глутаминовой кислоты (L-Glu), L-триптофана (L-Trp), *транс*-4-гидрокси-L-пролина (L-Нур), L-пироглутаминовой кислоты (L-Pyr). Наибольшее значение оптической чистоты для соединения **112** составляло 12% при проведении реакции в ТГФ в присутствии L-Pro. Избыточный энантиомер **112** является правовращающим и соответствует абсолютной конфигурации, изображённой на Схеме 2.14. Самые высокие выходы циклоаддукта **112** составляли 60-70% при использовании L-Pro и L-Pyr в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> при незначительных показателях энантиоселективности. Выход изомера **113** достигал 21%, и продукт был оптически неактивным.

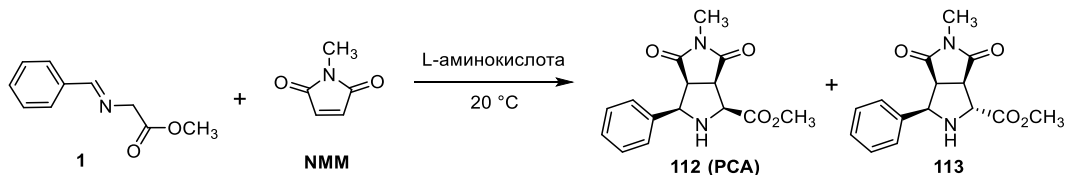


Схема 2.14

Для получения рацемических октагидропирроло[3,4-*c*]пирролов типа **112** нами разработан однореакторный трёхкомпонентный метод, в котором в качестве конденсирующего агента используются только молекулярные сита (МС) с размером пор 4 Å. При одновременном смешении ароматического альдегида, гидрохлорида метилового эфира глицина и NMM в присутствии эквимольных количеств 4 Å МС и Et<sub>3</sub>N происходят последовательные конденсация, генерация АИ и 1,3-ДЦ с образованием бициклических пирролидинов **112**, **114-117** (Схема 2.15).

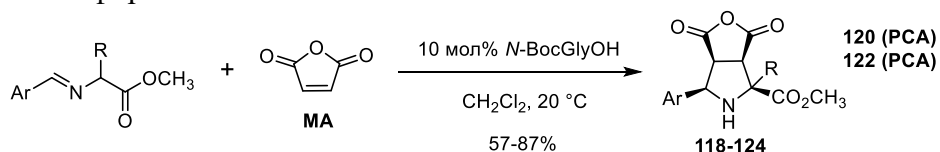


Ar: Ph (**112**, 49%); 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**114**, 89%); 2-CF<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**115**, 41%); 4-CF<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**116**, 95%); 2-тиенил (**117**, 12%).

Схема 2.15

Наряду с NMM в реакцию с АИ, генерируемыми под действием L-Pro или L-Pyr (Схема 2.14), также вводили малеиновый ангидрид (МА). Однако в данном случае возникли две проблемы, препятствующие выделению бициклического ангидрида, образование которого фиксировали в реакционной смеси: неустойчивость глицинового циклоаддукта и совместная кристаллизация аминокислоты-катализатора и продукта 1,3-ДЦ. Для получения целевых многофункциональных соединений мы применили иминоэфиры  $\alpha$ -замещённых  $\alpha$ -аминокислот,

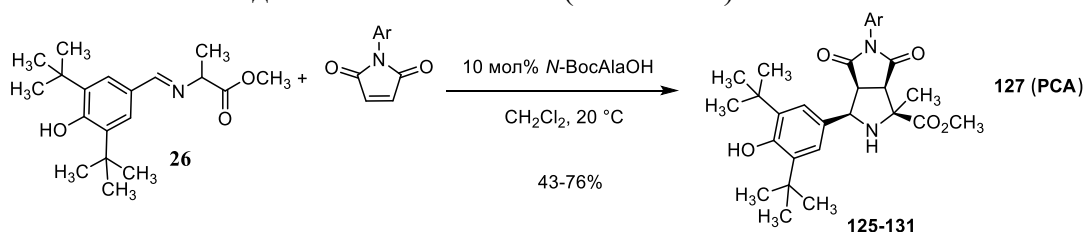
в качестве предшественников АИ, и *N*-Вос-замещённые аминокислоты, в качестве растворимых кислот Брэнстеда (Схема 2.16). При использовании иминоэфиров, полученных из Ala (**17**, **18**, **24**, **26**, **27**), Phe (**33**) и Glu (**35**) и бензальдегидов различной природы, из реакций с МА в присутствии 10% мольных *N*-ВосGlyOH выделяли индивидуальные устойчивые циклоаддукты **118-124**, содержащие три функциональные группы: вторичную аминогруппу, ангидридный фрагмент и сложноэфирный заместитель.



Ar: Ph (**118**); 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**119**); 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**120,124**); 3,5-(<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-4-OHC<sub>6</sub>H<sub>2</sub> (**121**); 4-CNC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**122**); 3-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**123**).  
R: CH<sub>3</sub> (**118-122**); Bn (**123**), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**124**).

Схема 2.16

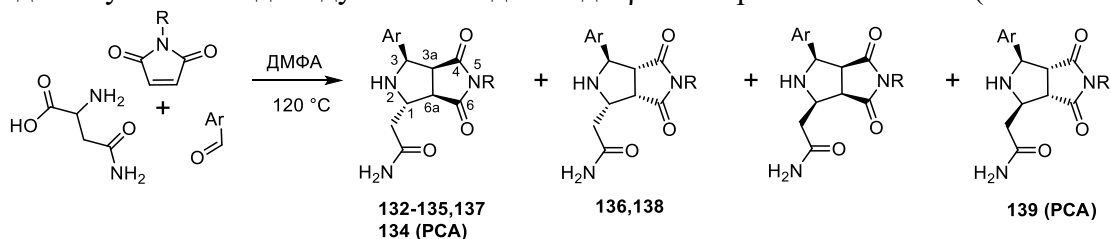
Органокаталитическое 1,3-ДЦ с использованием азометина **26** и *N*-арилмалеимидов позволяет вводить фрагмент экранированного фенола в структуру сложных насыщенных гетероциклов путём одностадийной синтетической операции, что было использовано для получения серии ранее неизвестных пирролидиновых циклоаддуктов **125-131** с потенциальными антиоксидантными свойствами (Схема 2.17).\*



Ar: Ph (**125**); 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**126**); 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**127**); 2,6-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**128**); 2,3,5,6-(F)<sub>4</sub>C<sub>6</sub>H (**129**); 1-нафтил (**130**); 2-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**131**).

Схема 2.17

При исследовании соотношений «структура–активность» в медицинской химии в качестве одной из структурных модификаций активного соединения проводится синтез гомологов. Нами разработан одностадийный метод получения гомологов 5-Ar-2-ПКК из производных аспарагиновой и глутаминовой кислот при помощи декарбоксилиративного разложения соответствующих альдиминов, генерирующего АИ, и последующего 1,3-ДЦ алкенового диполярфила. Взаимодействием аспарагина, бензальдегидов и NMM получены амиды β-гомопролинов **132-136** (Схема 2.18). Вследствие стереомутации первично образующегося АИ и последующего *эндо*- или *экзо*-1,3-ДЦ NMM образуются четыре изомерных пирролидиновых рацемических циклоаддукта в сопоставимых количествах. Из *N*-бензилмалеимида получены в индивидуальном виде амиды β-гомопролинов **137-139** (Схема 2.18).



Ar: Ph (**132**, 21%; **137**, 25%; **138**, 20%; **139**, 22%); 3,4-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**133**, 24%; **136**, 5%); 3-пиридил (**134**, 31%); 5-метилфуран-2-ил (**135**, 27%). R: CH<sub>3</sub> (**132-136**); Bn (**137-139**).

Схема 2.18

Трёхкомпонентная реакция эквимольных количеств Glu, вератрового альдегида или бензальдегида и NMM в ДМФА в атмосфере аргона при нагревании сопровождалась выделением газообразных продуктов и постепенным растворением аминокислоты. Из обеих

\* Выполнено в соавторстве с к.х.н. В.П. Осиповой (Южный научный центр РАН)

реакций было выделено по два продукта, спектрально соответствующих трициклическим лактамам **140-143** с суммарными выходами 33-60% (Схема 2.19).

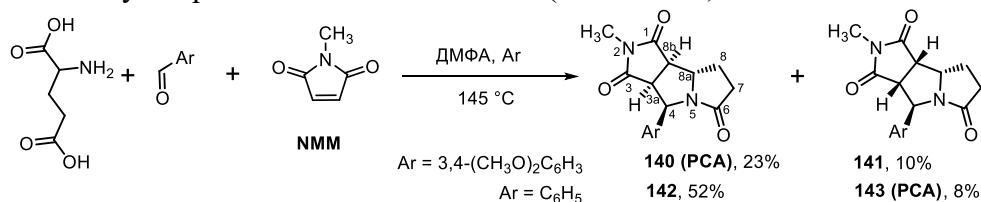
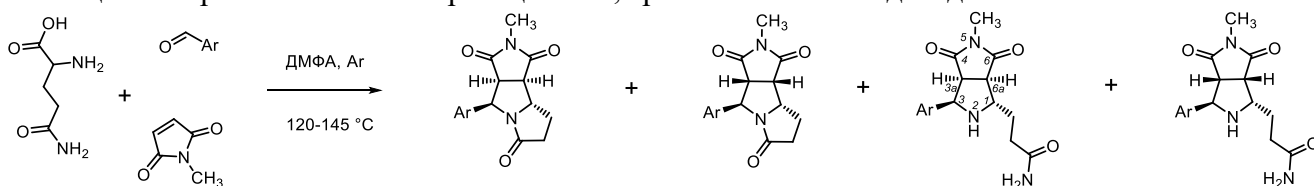


Схема 2.19

Пирролидинилпропионовые кислоты, являющиеся гомологами 5-Ar-2-ПКК, из реакций с Glu выделить не удалось, что может быть связано с относительной высокой ацилирующей способностью свободной  $\gamma$ -карбоксильной группы в условиях реакции. Использование глутамина (Gln) в качестве аминокислотной компоненты в трёхкомпонентной реакции с ароматическими альдегидами и NMM приводит к образованию как трициклических лактамов **140-143**, **146-151**, **154**, **155**, так и гомологов 5-Ar-2-ПКК **144**, **145**, **152**, **153** (Таблица 2.1).

Таблица 2.1. Трёхкомпонентная реакция Gln, ароматических альдегидов и NMM.



Ar	T, °C	эндо-лактамы, выход (%)	экзо-лактамы, выход (%)	эндо-пропионамиды, выход (%)	экзо-пропионамиды, выход (%)
фенил	145	<b>142</b> , 52	<b>143</b> , 24	<b>144+145</b> , 11	
3,4-(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	145	<b>140</b> , 36	<b>141</b> , 15	—*	—*
4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	145	<b>146</b> , 33	<b>147</b> , 17	—*	—*
3-пиридил	145	<b>148</b> , 49	<b>149</b> , 9**	—*	—*
фуран-2-ил	145	<b>150</b> , 33	<b>151</b> , 35	<b>152+153</b> , 20	
фуран-2-ил	120	<b>150</b> , 24	<b>151</b> , 10	<b>152</b> , 34	<b>153</b> , 31
5-метилфуран-2-ил	145	<b>154</b> , 26	<b>155</b> , 32	—*	—*

\* Не выделены в индивидуальном состоянии. \*\* Выделен в смеси со стереоизомером **148**.

Возможность получения пирролидинилпропановых кислот гидролизом лактамного фрагмента изучена на примере пирролизидинона **140** (Схема 2.20). Однако в щелочных условиях раскрытию подвергается только имидный фрагмент и образуется пирролизидинон **156**, сохранение лактамного каркаса в котором подтверждается наличием корреляций C<sup>5</sup> ( $\delta_{\text{C}}$  174.66 м.д.)/H<sup>3</sup> ( $\delta_{\text{H}}$  4.79 м.д.) в НМВС-спектре и N<sup>4</sup> ( $\delta_{\text{N}}$  216 м.д.)/H<sup>3</sup> в <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H-двумерном спектре.

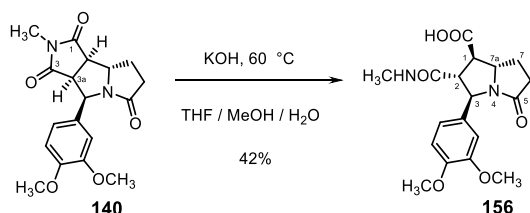
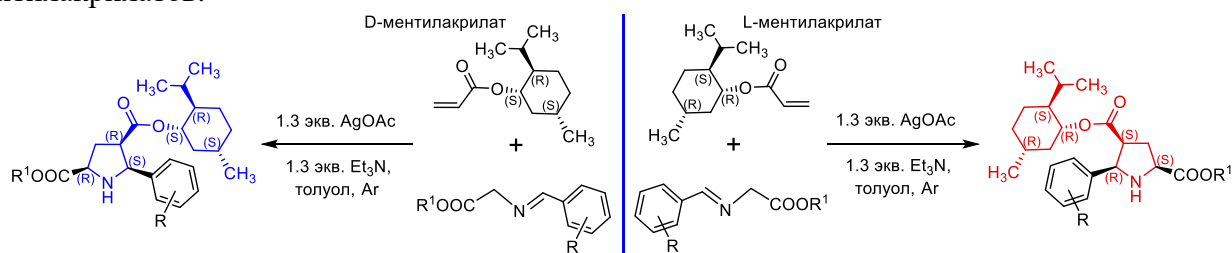


Схема 2.20

Для получения оптически активных производных 5-Ar-2-ПКК нами изучены реакции 1,3-ДЦ АИ с хиральными дипольярофилами, в присутствии хиральных катализаторов, и впервые исследовано кинетическое расщепление рацемического диэфира 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоновой кислоты. Одним из наиболее доступных хиральных вспомогательных элементов, из которого могут быть получены дипольярофилы обоих энантимерно чистых рядов, является ментол, коммерчески доступный в L- и D-формах с известной абсолютной конфигурацией. Ацилирование L- и D-ментолов акрилоилхлоридом приводит к образованию L- и D-ментилакрилатов соответственно, которые были введены в реакции 1,3-ДЦ АИ. Для получения хиральных эфиров 5-Ar-2-ПКК мы использовали эквимольные количества метиловых иминоэфиров глицина **1**, **2**, **7**, **10**, **38** и L- или D-ментилакрилата, и систему AgOAc/Et<sub>3</sub>N в

толуоле (Таблица 2.2). Во всех реакциях наблюдалось образование единственного диастереомерно чистого циклоаддукта, соответствующего продуктам 1,3-ДЦ **157-161** в случае использования в качестве диполярофила L-ментилакрилата и **162-164** в случае использования в качестве диполярофила D-ментилакрилата. Абсолютная конфигурация стереогенных центров пирролидиновых циклоаддуктов **157-164** была приписана на основании известного строения хиральных производных 5-Ар-2-ПКК (+)-**157** и (+)-**161**, а также данных рентгеноструктурных исследований полученных из соединений (+)-**157**, (-)-**162**, (-)-**163** и (-)-**164** олигомерных производных 5-Ар-2-ПКК (см. Главу 3).

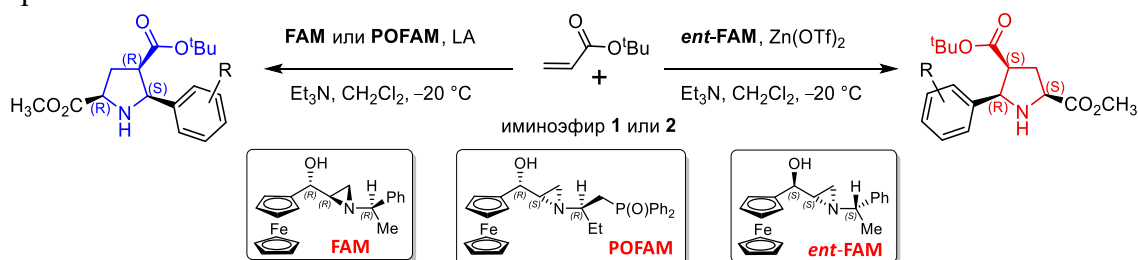
Таблица 2.2. Асимметрическое 1,3-ДЦ иминоглицилатов **1, 2, 7, 10, 38** и оптически активных ментилакрилатов.



Имино эфир	R	R <sup>1</sup>	Ментил-акрилат	Пирролидиновый циклоаддукт, выход, %	Имино эфир	R	R <sup>1</sup>	Ментил-акрилат	Пирролидиновый циклоаддукт, выход, %
<b>1</b>	H	CH <sub>3</sub>	L	(+)- <b>157</b> , 73	<b>38</b>	H	<sup>t</sup> Bu	L	(+)- <b>161</b> , 85
<b>2</b>	4-Br	CH <sub>3</sub>	L	(+)- <b>158</b> , 65	<b>1</b>	H	CH <sub>3</sub>	D	(-)- <b>162</b> , 73
<b>7</b>	2-CF <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	L	(+)- <b>159</b> , 88	<b>7</b>	2-CF <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	D	(-)- <b>163</b> , 71
<b>10</b>	3-Cl	CH <sub>3</sub>	L	(+)- <b>160</b> , 44	<b>10</b>	3-Cl	CH <sub>3</sub>	D	(-)- <b>164</b> , 61

Дальнейшие синтетические модификации хиральных производных 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоновых кислот предполагали хемоселективные трансформации карбоксильных групп во 2-ом и 4-ом положениях пирролидинового кольца, для чего целесообразно в одном из этих положений иметь *трет*-бутиловый эфир карбоновой кислоты, легко гидролизующийся в кислых условиях. Для получения соответствующих энантиомерно чистых производных 5-Ар-2-ПКК мы использовали асимметрическое 1,3-ДЦ АИ и *трет*-бутилакрилата в присутствии катализаторов, состоящих из кислот Льюиса и хиральных лигандов ферроценилазиридирил-карбинольного типа **FAM**, *ent*-**FAM** и **POFAM** (Таблица 2.3). В оптимизированных условиях выходы оптически чистых продуктов реакции с большими нагрузками составляют до 87% и *ee* до 93% (Таблица 2.3, строки 7 и 9).

Таблица 2.3. Каталитическое асимметрическое 1,3-ДЦ иминоглицилатов **1** и **2** и *трет*-бутилакрилата.



Имино эфир	R	Лиганд, количество мольных %	Кислота Льюиса, количество мольных %	Время реакции, ч	Пирролидиновый циклоаддукт	Выход циклоаддукта, %	<i>ee</i> циклоаддукта, *** %
<b>2</b>	4-Br	<b>POFAM</b> , 6	AgOAc, 1.5	48	(-)- <b>41</b>	16	10
<b>2</b>	4-Br	<b>FAM</b> , 11.5	Zn(OTf) <sub>2</sub> , 10	14	(-)- <b>41</b>	76	83
<b>2</b>	4-Br	<b>FAM</b> , 11.5	Zn(OTf) <sub>2</sub> , 10	6	(-)- <b>41</b>	88	88
<b>2</b>	4-Br	<b>FAM</b> , 11.5	Zn(OTf) <sub>2</sub> , 10	10	(-)- <b>41</b>	87	87
<b>2</b>	4-Br	<b>FAM</b> , 20	Zn(OTf) <sub>2</sub> , 10	10	(-)- <b>41</b>	87	87
<b>2</b>	4-Br	<b>FAM</b> , 11.5	Zn(OTf) <sub>2</sub> , 10	48	(-)- <b>41</b>	0*	—
<b>2</b>	4-Br	<b>FAM</b> , 11.5	Zn(OTf) <sub>2</sub> , 10	6	(-)- <b>41</b>	87**	90
<b>2</b>	4-Br	<i>ent</i> - <b>XC</b> , 11.5	Zn(OTf) <sub>2</sub> , 10	6	(+)- <b>41</b>	88	87
<b>2</b>	4-Br	<i>ent</i> - <b>FAM</b> , 11.5	Zn(OTf) <sub>2</sub> , 10	6	(+)- <b>41</b>	87**	93
<b>1</b>	H	<b>FAM</b> , 11.5	Zn(OTf) <sub>2</sub> , 10	6	(-)- <b>40</b>	81	89

\* Реакцию проводили при -40 °С. \*\* В реакцию введено 500 мг иминоэфира **2**. \*\*\* Определён при помощи хиральной ВЭЖХ.

Единственная перекристаллизация из гексана повышает *ee* энантимерно обогащённых образцов 5-Ar-2-ПКК **41** до  $\geq 99\%$ . С использованием оптимизированных условий 1,3-ДЦ был также получен 5-фенилпирролидин-2,4-дикарбоксилат (–)-**40** в количестве нескольких граммов с *ee* > 99% после однократной перекристаллизации из пентана, причём лиганд **FAM** регенерировали хроматографической очисткой до 6-ти раз с последующим введением в указанное в Таблице 2.3 1,3-ДЦ без потери *ee* целевого циклоаддукта (–)-**40**.

Нами исследовано кинетическое расщепление рацемического 5-(4-бромфенил)-пирролидин-2,4-дикарбоксилата **41** при помощи энантимерно чистых хлорангидридов *N*-модифицированных  $\alpha$ -аминокислот.\* Хлорангидрид *N*-метил-*N*-тозил-(*S*)-фенилаланина ((+)-**165**) обеспечивает наибольший из исследованных реагентов энантимерный избыток (*ee* 88.2%) непрореагировавшего (2*R*,4*R*,5*S*)-энантиомера (–)-**41** при диастереомерном избытке (*de*) 42% образовавшегося преимущественно из (+)-**41** амида **166** (Схема 2.21). В данном процессе конверсия *S* рацемического 5-(4-бромфенил)пирролидин-2,4-дикарбоксилата **41** и фактор селективности *s* составляют 68% и 6.5 соответственно. Тем не менее хроматографическое выделение непрореагировавшего (2*R*,4*R*,5*S*)-энантиомера (–)-**41** осложнялось присутствием других компонентов реакции, и выход этой фракции составил 13% в пересчёте на изначально взятый рацемический образец 5-Ar-2-ПКК **41**, что затрудняет препаративное использование данного десимметризирующего метода.

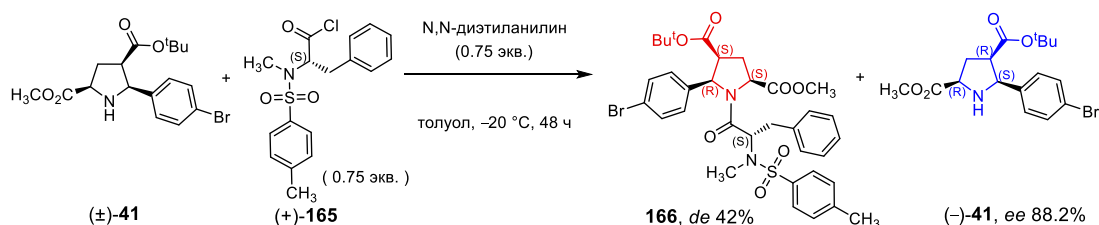
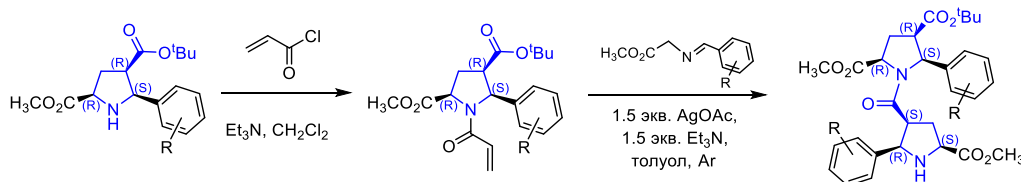


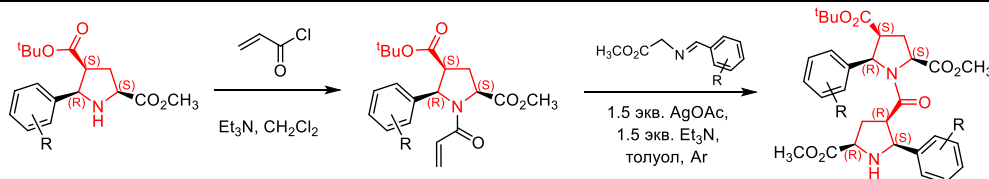
Схема 2.21

**Глава 3.** Концептуализирован и детально рассмотрен метод *циклоприсоединительной олигомеризации*, позволяющей получать рацемические и энантимерно чистые  $\beta$ -пролиновые олигомеры упорядоченного строения. Метод основан на 1,3-ДЦ АИ и эфиров *N*-акрилоил-5-арилпирро-лидин-2,4-дикарбоновых кислот. Акриламиды **167**, (–)-**167**, **168**, (–)-**168** и (+)-**168** были получены из соответствующих рацемических и энантимерно чистых 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоксилатов (Таблица 3.1).

Таблица 3.1. Циклоприсоединительная димеризация.



R	5-Ar-2-ПКК	Акриламид; выход, %	Иминоэфир	$\beta$ -Пролиновый димер, выход, %
H	<b>40</b>	<b>167</b> ; 69	<b>1</b>	<b>169 (PCA)</b> , 70
H	(–)- <b>40</b>	(–)- <b>167</b> ; 73	<b>1</b>	(–)- <b>169</b> , 90, <i>ee</i> 97%
4-Br	<b>41</b>	<b>168</b> ; 65	<b>2</b>	<b>170</b> , 82
4-Br	(–)- <b>41</b>	(–)- <b>168</b> ; 84	<b>2</b>	(–)- <b>170</b> , 74, <i>ee</i> > 99%



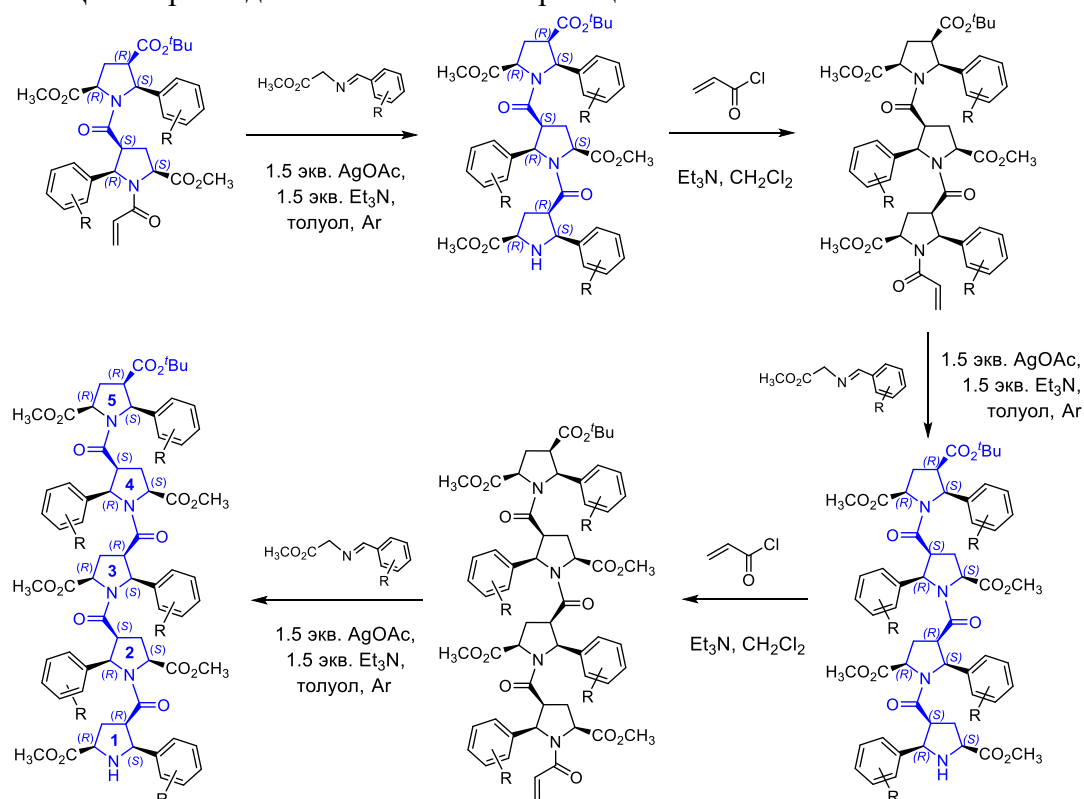
R	5-Ar-2-ПКК	Акриламид; выход, %	Иминоэфир	$\beta$ -Пролиновый димер, выход, %
4-Br	(+)- <b>41</b>	(+)- <b>168</b> ; 68	<b>2</b>	(+)- <b>170</b> , 82, <i>ee</i> > 99%

\* E.N. Chulakov, D.A. Gruzdev, G.L. Levit, K.V. Kudryavtsev, V.P. Krasnov. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, Vol. 23, No 24, pp. 1683-1688.

При генерации металло-АИ при помощи системы AgOAc/Et<sub>3</sub>N из иминоэфиров **1** и **2** в присутствии указанных акриламидов наблюдалось образование димерных пирролидиновых циклоаддуктов **169**, (-)-**169**, **170**, (-)-**170** и (+)-**170** (Таблица 3.1). Соединения **169** и **170** являлись единственными продуктами соответствующих реакций, что подтверждалось <sup>1</sup>H ЯМР-исследованиями реакционных смесей. Рентгеноструктурное исследование рацемического β-пролинового димера **169** установило инверсию конфигураций стереогенных центров во вновь образующемся пирролидиновом цикле по отношению к конфигурациям стереогенных центров родоначального пирролидинового цикла. Таким образом, полученные β-пролиновые димеры имеют альтернированное строение, при котором составляющие молекулу димера мономерные фрагменты 5-Аг-2-ПКК зеркально симметричны. Помимо наблюдаемой стереоспецифичности протекания 1,3-ДЦ полученных из 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоксилатов акриламидов и иминоглицинатов, в случае использования энантимерно обогащённых диполярофилов происходит эффективная асимметрическая индукция, приводящая к хиральным β-пролиновым димерам (-)-**169**, (-)-**170** и (+)-**170**.

Далее мы провели серию экспериментов по получению коротких β-пептидов упорядоченного строения и ввели определение «циклоприсоединительная олигомеризация» для разработанного нового метода синтеза β-пролиновых олигомеров, отражающее получение новых органических соединений с повторяющимся структурным фрагментом и использованную синтетическую методологию (Таблица 3.2). С использованием однотипной последовательности реакций, состоящей из ацилирования вторичных аминогрупп акрилоилхлоридом и 1,3-ДЦ пространственно затруднённых акриламидов и иминоглицинатов, нами получены альтернированные β-Pro олигомеры с числом звеньев до пяти включительно, причём на каждом этапе мы фиксировали образование одного продукта 1,3-ДЦ (Таблица 3.2).

Таблица 3.2. Циклоприсоединительная олигомеризация.



R	Димерный акриламид; выход, %	β-Pro тример; выход, %	Тримерный акриламид; выход, %	β-Pro тетрамер; выход, %	Тетрамерный акриламид; выход, %	β-Pro пентамер; выход, %
H	<b>171</b> ; 76	<b>173</b> ; 94	<b>175</b> ; 77	<b>177</b> ; 83	<b>179</b> ; –**	<b>181</b> ; –**
4-Br	<b>172</b> ; 82	<b>174 (PCA)</b> ; 82	<b>176</b> ; 90	<b>178</b> ; 81	<b>180</b> ; 82	<b>182</b> ; 85
H	(-)- <b>171</b> ; 78	(+)- <b>173 (PCA)</b> ; 87 (ee 95%*)	(+)- <b>175</b> ; 73	(-)- <b>177 (PCA)</b> ; 85	(-)- <b>179</b> ; 73	(-)- <b>181</b> ; 93

\* Определён при помощи хиральной ВЭЖХ. \*\* Эксперимент не проводился.



С увеличением размера олигомерной цепи наблюдалось усложнение  $^1\text{H}$  ЯМР-спектров новых поли- $\beta$ -пролинов **173**, **174**, **177**, **178**, **181**, **182** и соответствующих акриламидов, что обусловлено  $Z/E$ -изомерией  $\beta$ -пептидных связей (см. ниже), в связи с чем рентгеноструктурные исследования послужили весомым доказательством пространственного строения нового класса  $\beta$ -пептидов. Строение новых  $\beta$ -пептидов было детально исследовано при помощи ЯМР-спектроскопии\* как с целью подтверждения их альтернированной структуры, так и для изучения динамических процессов, протекающих в растворах этих соединений. Последовательное отнесение сигналов  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$   $\beta$ -Pro остатков, формирующих олигомерный каркас, проводили с использованием характеристичных корреляций в  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HMBC и NOESY/ROESY экспериментах (Схема 3.1, красные и зелёные стрелки, соответственно).  $Z$ -конфигурация  $\beta$ -пептидной связи определялась интенсивным NOE между протоном  $\text{H}^\alpha$   $\beta$ -Pro остатка  $i$  и протоном  $\text{H}^\beta$   $\beta$ -Pro остатка  $i+1$ . Для  $E$ -конфигурации  $\beta$ -пептидной связи характерен сильный NOE между протоном  $\text{H}^\delta$   $\beta$ -Pro остатка  $i+1$  и протоном  $\text{H}^\beta$   $\beta$ -Pro остатка  $i$  (Схема 3.1). При существовании  $\beta$ -пептидной связи между  $\beta$ -Pro остатками  $i$  и  $i+1$  в  $E$ -конфигурации резонанс протона  $\text{H}^\delta$   $\beta$ -Pro остатка  $i+1$  претерпевает существенный слабopольный сдвиг (1-1.5 м.д.) по сравнению с  $\text{H}^\delta$  протонами  $\beta$ -Pro остатков, соединённых  $Z$ - $\beta$ -пептидной связью. Применяв установленные критерии для конформационного анализа, мы определили структурные характеристики фенилзамещённых  $\beta$ -Pro олигомеров в  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  и  $\text{DMCO-d}_6$  растворах (Схема 3.1, на примере тетрамера **177**) и сделали отнесения ЯМР-спектральных характеристик к индивидуальным конформационным изомерам тетрамера **177** и пентамера (-)-**181**, детектируемым в  $\text{DMCO-d}_6$  растворах при комнатной температуре.

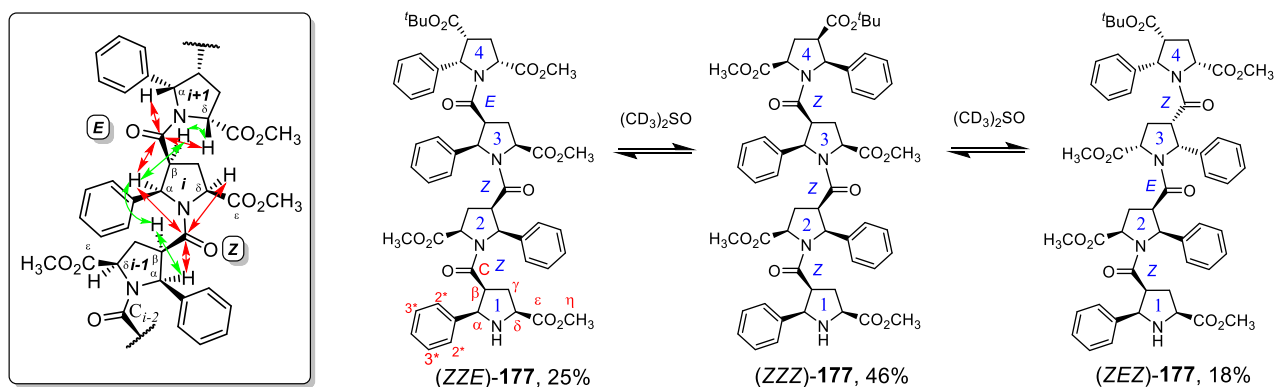


Схема 3.1

Из полученных данных следует, что для синтезированных функционализированных  $\beta$ -пептидов вплоть до тетрамера включительно наиболее устойчивой в растворе является конформация со всеми  $Z$ - $\beta$ -пептидными связями, причём зависимость конформационного равновесия от полярности растворителя невелика. Многочисленные ROESY взаимодействия в тетрамере **177** и пентамере (-)-**181** позволили рассчитать межпротонные расстояния для всех конформаций этих  $\beta$ -пептидов в растворе, что было использовано для определения вторичных структур указанных олигомеров, а также полученные структурные параметры были оптимизированы при помощи квантово-механических расчётов.

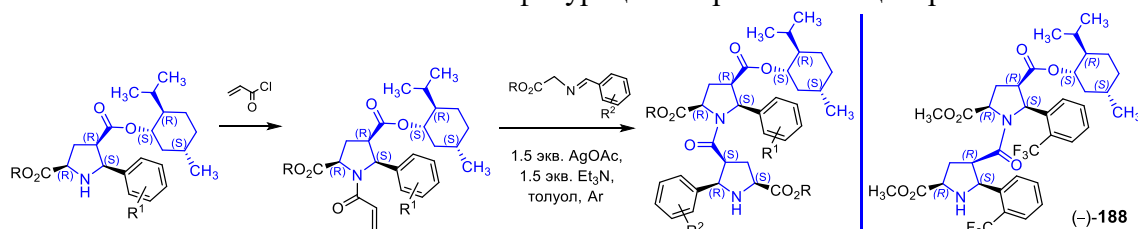
Дополнительная асимметрическая модификация разработанного нами нового метода синтеза функционализированных  $\beta$ -пролиновых олигомеров заключается в применении диастереомерно чистых 4-ментил-5-арилпирролидин-2,4-дикарбоксилатов (Таблица 2.2) в качестве родоначальных соединений для наращивания  $\beta$ -пептидной цепи. После ацилирования акрилоилхлоридом 4-ментил-5-арилпирролидин-2,4-дикарбоксилаты трансформируются в хиральные диполярофилы с шестью стереогенными центрами (Таблица 3.3). При взаимодействии полученных из D-ментилзамещённых 5-Ar-2-ПКК акриламидов (+)-**183**, (+)-**184** и (-)-**185** и металло-АИ, генерируемых из иминоглицилатов при помощи системы  $\text{AgOAc}/\text{Et}_3\text{N}$ , происходило образование димерных пирролидиновых циклоаддуктов (Таблица 3.3). ЯМР-спектральные характеристики соединений (+)-**186**, (-)-**187** и (-)-**189** свидетельство-

\* Выполнено в соавторстве с д.х.н. В.И. Польшаковым (ФФМ МГУ имени М.В.Ломоносова)

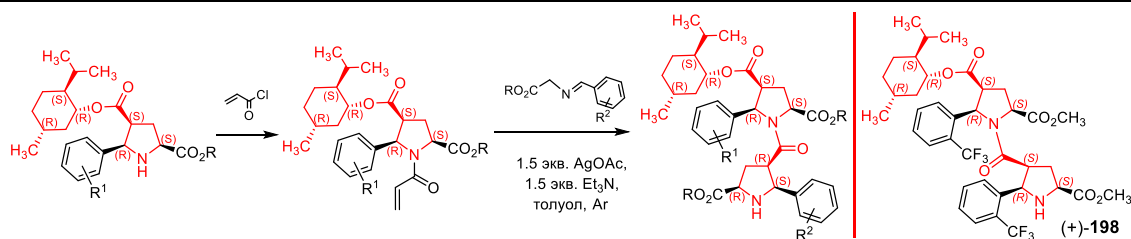


вали о формировании альтернированного димерного  $\beta$ -Pro молекулярного каркаса. Рентгеноструктурное исследование  $\beta$ -Pro димера (-)-**189** подтвердило абсолютную конфигурацию его девяти стереогенных центров и альтернированное строение  $\beta$ -пептидного каркаса. При взаимодействии  $\text{CF}_3$ -замещённого акриламида (+)-**184** с  $\text{CF}_3$ -замещённым иминоэфиром **7** в условиях 1,3-ДЦ в реакционной смеси фиксировался второй продукт реакции (-)-**188** (Таблица 3.3, строка 2), что не наблюдалось в случае других исследованных заместителей в реагирующих компонентах в предыдущей (Таблица 3.1) и данной (Таблица 3.3) сериях экспериментов. Такой же результат был получен в экспериментах с L-ментилзамещёнными 5-Ar-2-ПКК акриламидами: циклоприсоединение хиральных диполярофилов (-)-**190**, (-)-**191**, (+)-**193**, и (-)-**194** к металло-АИ приводит к образованию единственных продуктов соответствующих реакций, являющихся альтернированными  $\beta$ -пролиновыми димерами, в то время как  $\text{CF}_3$ -замещённый акриламид (-)-**192** и  $\text{CF}_3$ -замещённый иминоэфир **7** в этих же условиях формируют альтернированный димер (+)-**197** и циклоаддукт (+)-**198** (Таблица 3.3). Пары альтернированных димеров (+)-**186** и (-)-**195**, (-)-**187** и (+)-**197**, (-)-**189** и (+)-**199**, а также необычных циклоаддуктов (-)-**188** и (+)-**198**, являются зеркально симметричными и имеют близкие или совпадающие физико-химические и ЯМР-спектральные характеристики.

Таблица 3.3. Циклоприсоединительная димеризация 4-D/L-ментил-5-арилпирролидин-2,4-дикарбоксилатов. Указаны абсолютные конфигурации стереогенных центров.



R, R <sup>1</sup>	5-Ar-2-ПКК	Акриламид; выход, %	Иминоэфир, R <sup>2</sup>	$\beta$ -Pro димер, выход, %
CH <sub>3</sub> , H	(-)- <b>162</b>	(+)- <b>183</b> ; 91	<b>1</b> , H	(+)- <b>186</b> , 80
CH <sub>3</sub> , 2-CF <sub>3</sub>	(-)- <b>163</b>	(+)- <b>184</b> ; 90	<b>7</b> , 2-CF <sub>3</sub>	(-)- <b>187</b> , 53; (-)- <b>188</b> , 42
CH <sub>3</sub> , 3-Cl	(-)- <b>164</b>	(-)- <b>185</b> ; 76	<b>14</b> , 4-CH <sub>3</sub> O	(-)- <b>189</b> (PCA), 78



R, R <sup>1</sup>	5-Ar-2-ПКК	Акриламид; выход, %	Иминоэфир, R <sup>2</sup>	$\beta$ -Pro димер, выход, %
CH <sub>3</sub> , H	(+)- <b>157</b>	(-)- <b>190</b> ; 89	<b>1</b> , H	(-)- <b>195</b> , 76
CH <sub>3</sub> , 4-Br	(+)- <b>158</b>	(-)- <b>191</b> ; 90	<b>2</b> , Br	(+)- <b>196</b> , 79
CH <sub>3</sub> , 2-CF <sub>3</sub>	(+)- <b>159</b>	(-)- <b>192</b> ; 92	<b>7</b> , 2-CF <sub>3</sub>	(+)- <b>197</b> , 47; (+)- <b>198</b> , 38
CH <sub>3</sub> , 3-Cl	(+)- <b>160</b>	(+)- <b>193</b> ; 82	<b>14</b> , 4-CH <sub>3</sub> O	(+)- <b>199</b> , 60
<sup>t</sup> Bu, H	(+)- <b>161</b>	(-)- <b>194</b> ; 95	<b>38</b> , H	(-)- <b>200</b> , 80

Первичное изучение NOE-взаимодействий в циклоаддукте (-)-**188**, который образовывался наряду с альтернированным димером (-)-**187** при 1,3-ДЦ  $\text{CF}_3$ -акриламида (+)-**184** к  $\text{CF}_3$ -замещённому АИ, указывало на присутствие в этом продукте двух соединённых пирролидиновых колец, содержащих по три заместителя при C<sup>2</sup>, C<sup>4</sup> и C<sup>5</sup> атомах, расположенных с одной стороны каждого из двух гетероциклических фрагментов. Эта структурная информация позволила предположить пространственное строение  $\beta$ -Pro димера (-)-**188**, в котором соединены два фрагмента 5-Ar-2-ПКК одинаковой хиральности (Таблица 3.3). При помощи корреляционных экспериментов было проведено полное отнесение <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C сигналов в соответствующих спектрах D-ментиловой пары  $\text{CF}_3$ -замещённых  $\beta$ -Pro димеров (-)-**187** и (-)-**188**. Далее были рассчитаны межпротонные расстояния для каждого из конформеров  $\text{CF}_3$ -замещённых  $\beta$ -Pro димеров (-)-**187** и (-)-**188**. Для получения координат протонов в каждом из конформационных изомеров  $\text{CF}_3$ -замещённых  $\beta$ -Pro димеров интегрировались и калибровались

кросс-пики в спектрах ROESY. На основании этих данных при помощи расчётов методом молекулярной динамики были получены 3D структуры для каждого из двух конформеров CF<sub>3</sub>-замещённых β-Pro димеров (–)-**187** и (–)-**188** в CDCl<sub>3</sub> растворе.\* Полученные данные подтверждают образование альтернированного и гомохирального изомерных β-пролиновых димеров при проведении циклоприсоединительной олигомеризации с CF<sub>3</sub>-замещёнными акриламидами (+)-**184** и (–)-**192** и иминоглицинатом **7** (Таблица 3.3). Кроме того, возможны два различных положения β-пептидной связи, соединяющей два фрагмента 5-(*o*-CF<sub>3</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)-2-ПКК в димерах (–)-**187** и (–)-**188**, что приводит к существованию в растворе *Z/E*-изомеров. Интегрирование сигналов соответствующих изомерных форм в <sup>1</sup>H ЯМР-спектрах соединений (–)-**187** и (–)-**188** также позволило определить соотношение *Z/E*-изомеров, которое в случае альтернированного димера (–)-**187** характеризуется значительным преобладанием *Z*-формы (> 10:1), а для гомохирального димера (–)-**188** преобладающим является *E*-конформер (> 2:1).

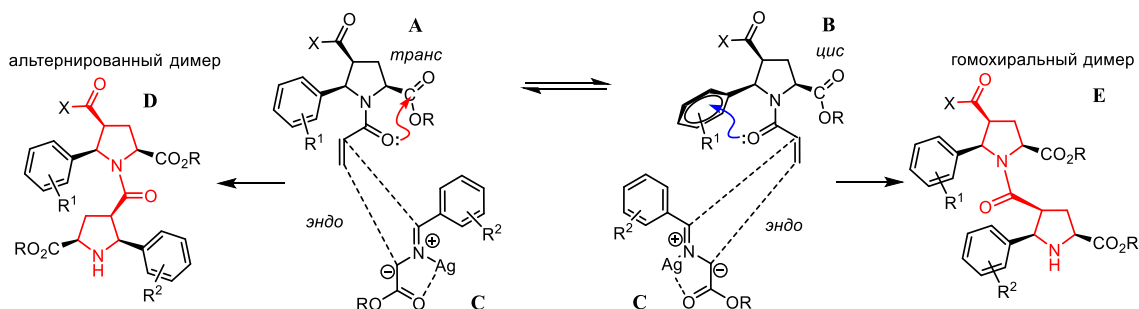


Схема 3.2

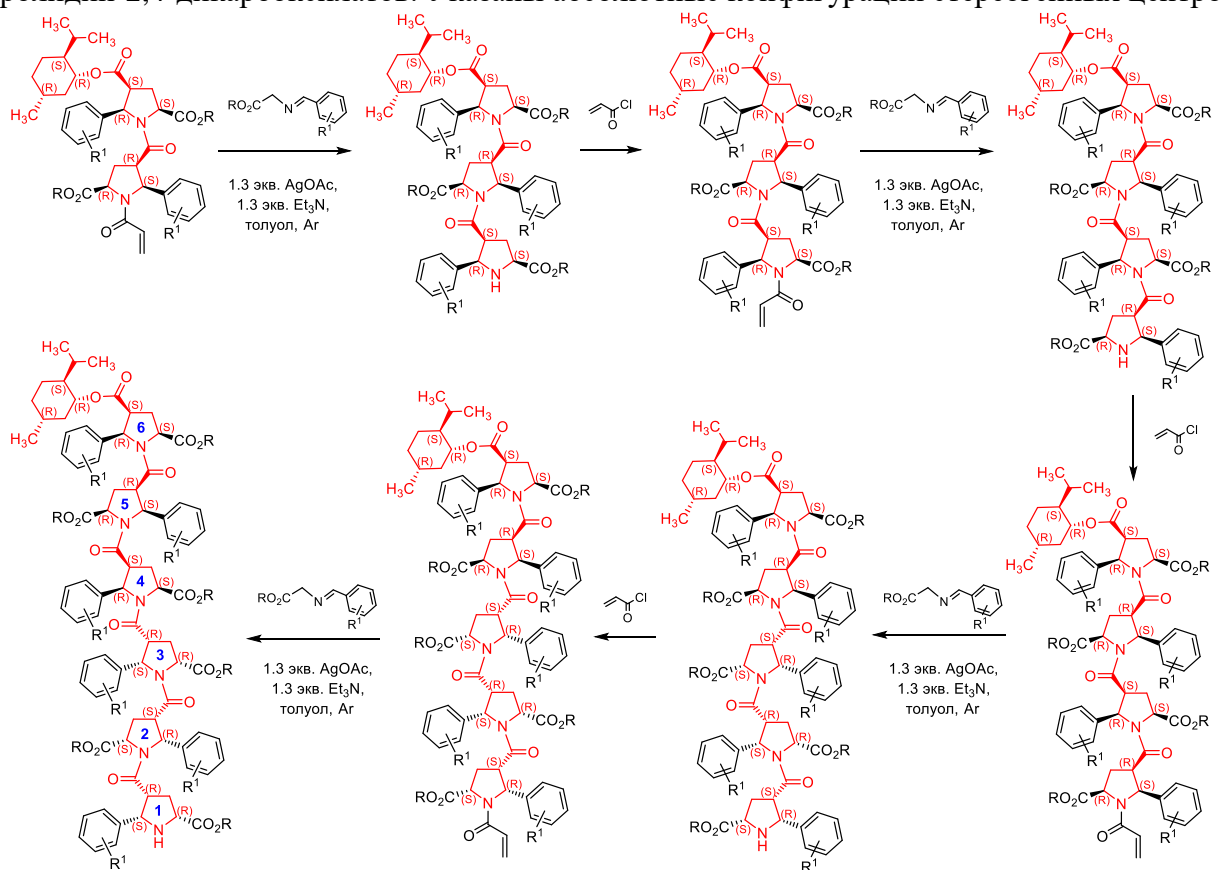
Уникальный эффект влияния CF<sub>3</sub>-заместителя на стереоселективность 1,3-ДЦ АИ, ранее неизвестный в литературе и не наблюдавшийся для других изученных в настоящей работе азометинов и акриламидов 5-Ar-2-ПКК, по-видимому, обусловлен электроноакцепторными свойствами и пространственным расположением CF<sub>3</sub>-группы. Хиральные N-акрилоил-5-Ar-2-ПКК, как и любые другие N-ацилпролины, могут существовать в виде двух конформеров: *транс*-А и *цис*-В (Схема 3.2). *Транс*-изомер N-ацилпролинов, как правило, термодинамически более стабилен, что связывают в том числе и с делокализацией неподелённых электронов (n) атома кислорода N-ацильной группы на разрыхляющей π\*-орбитали α-карбонильного фрагмента (n→π<sub>C=O</sub>\* стабилизация), что может реализовываться и в случае *транс*-акриламида А. Далее, при *эндо*-циклоприсоединении *транс*-акриламида А к металло-АИ С будет образовываться циклоаддукт D, в котором оба фрагмента 5-Ar-2-ПКК имеют противоположные конфигурации стереогенных центров пирролидиновых колец (Схема 3.2). Именно такая ситуация реализуется на каждой стадии получения альтернированных олигомеров (Таблица 3.2), при этом заместитель X на Схеме 3.2 представляет собой алкоксильную группу или остаток, состоящий из звеньев 5-Ar-2-ПКК. Равновесие между *транс*-А и *цис*-В может смещаться в сторону последнего конформационного изомера в случае взаимодействия неподелённых электронов (n) атома кислорода N-ацильной группы с π\*-разрыхляющей орбиталью близкорасположенного ароматического кольца (n→π<sub>Ar</sub>\* стабилизация). *Эндо*-циклоприсоединение *цис*-акриламида В и металло-АИ С должно приводить к образованию гомохирального димерного циклоаддукта E, в котором оба фрагмента 5-Ar-2-ПКК имеют идентичную абсолютную конфигурацию структурно-подобных стереогенных центров (Схема 3.2). Квантово-механические расчёты разности энергий образования ΔE = E<sub>транс</sub> – E<sub>цис</sub> методом функционала плотности для незамещённого в бензольном кольце акриламида (–)-**190** приводят к величине ΔE = –11.7 кДж/моль, в то время как у *o*-CF<sub>3</sub>-замещённого акриламида (–)-**192** эта величина составляет –5.4 кДж/ммоль. Исследование растворов акриламидов (–)-**190** и (–)-**192** методом ЯМР в толуоле-d<sub>8</sub> при комнатной температуре установило существование незамещённого производного (–)-**190** в единственной *транс*-форме, в то время как в толуольном растворе *o*-CF<sub>3</sub>-замещённого акриламида (–)-**192** присутствует 26% *цис*-изомера.

\* Выполнено в соавторстве с д.х.н. В.И. Польшаковым (ФФМ МГУ имени М.В.Ломоносова)

Таким образом, CF<sub>3</sub>-группа оказывает эффект конформационной фиксации *cis*-состояния **V** акриламидного диполярофила, что наряду с другими факторами, такими как реакционная способность азометина, природа кислоты Льюиса, полярность растворителя, влияет на стереоселективность реакции 1,3-ДЦ хиральных акриламидных диполярофилов и АИ и обеспечивает получение функционализированных β-Pro дипептидов как с альтернированным, так и с однородным по абсолютной конфигурации строением мономерных звеньев 5-Ar-2-ПКК, формирующих β-пептидный каркас.

Ментилсодержащие альтернированные β-пролиновые димеры обоих зеркальных рядов были введены в циклоприсоединительную олигомеризацию, в результате чего получены альтернированные поли-β-пролины с длиной цепи до *шести* пирролидиновых звеньев включительно (Таблица 3.4, Схема 3.3). Генерацию металло-АИ при получении оптически активных β-пролиновых олигомеров осуществляли при помощи системы AgOAc/Et<sub>3</sub>N, а последующее 1,3-ДЦ с хиральными акриламидами, содержащими от 9-ти до 18-ти стереогенных центров, приводило к наращиванию одного звена 5-Ar-2-ПКК в β-пептидной цепи. Синтезированы три серии функционализированных β-пролиновых олигомеров с L-ментилловым фрагментом на C-конце пептидной цепи (Таблица 3.4) и одна серия функционализированных β-пролиновых олигомеров с D-ментилловым фрагментом на C-конце пептидной цепи (Схема 3.3).

Таблица 3.4. Асимметрическая циклоприсоединительная олигомеризация 4-L-ментил-5-арил-пирролидин-2,4-дикарбоксилатов. Указаны абсолютные конфигурации стереогенных центров.



R; R <sup>1</sup>	Димерный акриламид; выход, %	β-Pro тример; выход, %	Тримерный акриламид; выход, %	β-Pro тетрамер; выход, %	Тетрамерный акриламид; выход, %	β-Pro пентамер; выход, %	Пентамерный акриламид; выход, %	β-Pro гексамер; выход, %
CH <sub>3</sub> , H	(+)- <b>201</b> ; 94	(-)- <b>204</b> (PCA); 89	(-)- <b>207</b> ; 85	(-)- <b>210</b> ; 85	(+)- <b>213</b> ; 82	(-)- <b>216</b> ; 85	(-)- <b>219</b> ; 76	(-)- <b>222</b> ; 75
CH <sub>3</sub> , 4-Br	(+)- <b>202</b> ; 80	(-)- <b>205</b> ; 89	(-)- <b>208</b> ; 86	(+)- <b>211</b> ; 86	(-)- <b>214</b> ; 80	(-)- <b>217</b> ; 78	(-)- <b>220</b> ; 78	(+)- <b>223</b> ; 71
<sup>t</sup> Bu, H	(+)- <b>203</b> ; 83	(-)- <b>206</b> ; 89	(-)- <b>209</b> ; 85	(-)- <b>212</b> ; 81	(-)- <b>215</b> ; 75	(-)- <b>218</b> ; 81	(-)- <b>221</b> ; 78	(-)- <b>224</b> ; 83

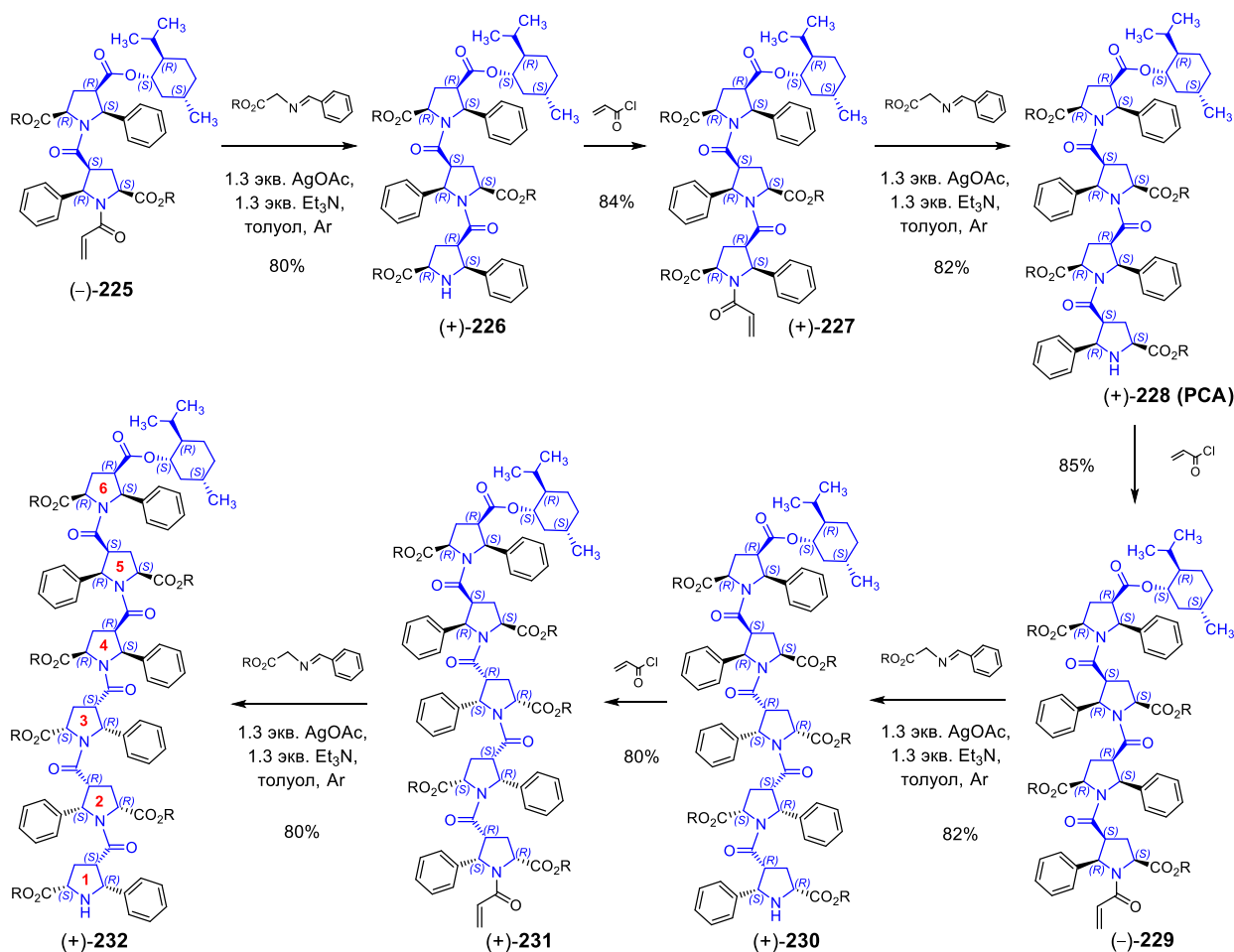


Схема 3.3

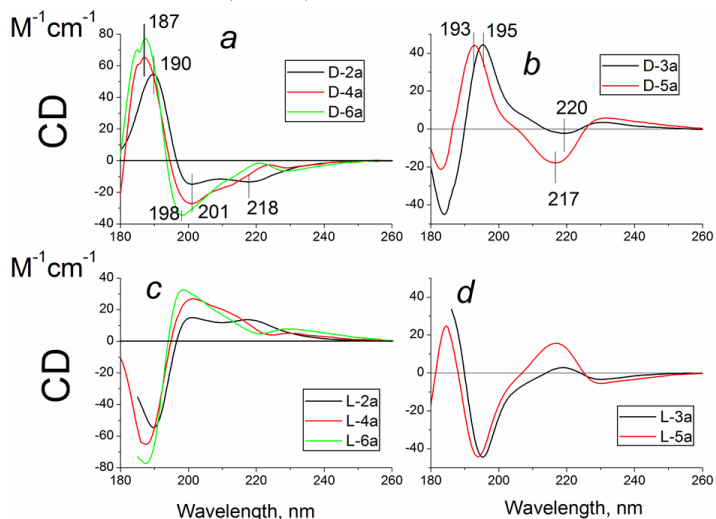
Пары олигомерных акриламидов и поли- $\beta$ -пролинов (+)-201 и (-)-225, (-)-204 и (+)-226, (-)-207 и (+)-227, (-)-210 и (+)-228, (+)-213 и (-)-229, (-)-216 и (+)-230, (-)-219 и (+)-231, (-)-222 и (+)-232 являются зеркально симметричными и имеют близкие или совпадающие физико-химические и ЯМР-спектральные характеристики. Пространственное строение полученных упорядоченных  $\beta$ -пептидов определяли с помощью установленных ранее для олигомерных соединений **169-181** (Схема 3.1) закономерностей. Кроме этого, молекулярные структуры L-ментилтримера (-)-204 и D-ментилтетрамера (+)-228 изучены методом PCA, что продемонстрировало полное структурное соответствие этих и полученных на основе ЯМР-экспериментов данных.

Исследование ментилзамещённых  $\beta$ -пролиновых олигомеров при помощи спектроскопии кругового дихроизма (КД) позволило выявить определённые закономерности взаимодействия нового класса  $\beta$ -пептидов с поляризованным УФ-излучением. Прежде всего, КД-спектры  $\beta$ -пролиновых олигомеров, полученных из D- и L-ментолов (D- и L-ряды), симметричны относительно оси длин волн, что обосновывает зеркальную структурную симметрию рассматриваемых рядов (Таблица 3.5). Для удобства обсуждения использована нумерация, приведённая в Таблице 3.5, которая отражает количество пирролидиновых звеньев в олигомерной цепи и L- или D-ментильный фрагмент на C-конце пептидной цепи. Индекс «a» обозначает незамещённые фенильные заместители и метоксикарбонильные группы на периферии  $\beta$ -пептидного молекулярного каркаса (Таблица 3.5). Характерной особенностью рассматриваемых КД-спектров является различие форм спектральных линий чётных (Таблица 3.5, область рисунка a,c) и нечётных (Таблица 3.5 область рисунка b,d) рядов  $\beta$ -Pro олигомеров. Для чётных олигомеров D-a-ряда наблюдается положительная полоса поглощения при 187–190 нм, пересечение нулевой линии при 193–196 нм и отрицательная полоса поглощения при 198–201 нм. Для тримера D-3a и пентамера D-5a соответствующие параметры сдвинуты в длинноволновую область и составляют 193–195 нм для максимума положительной полосы

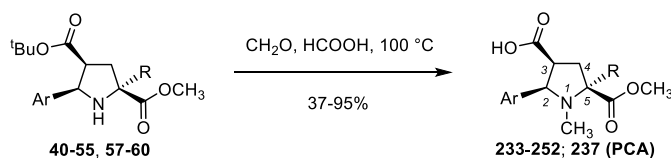
поглощения, 205–214 нм и 224–225 нм для пересечения нулевой линии и 217–220 нм для максимума отрицательной полосы поглощения. Также у нечётных олигомеров **D-a**-ряда проявляется сильное отрицательное поглощение при 183–185 нм и дополнительное пересечение нулевой линии при 186–190 нм. Расположение и интенсивности полос поглощения  $\beta$ -Pro олигомеров **L-a**-ряда инвертированы относительно приведённых характеристик для **D-a**-ряда.

Таблица 3.5. КД-спектры ментилзамещённых альтернированных  $\beta$ -Pro олигомеров в  $\text{CH}_3\text{CN}$ , нормированные по концентрациям образцов (справа), и нумерация  $\beta$ -Pro олигомеров, используемая при обсуждении КД-спектральных данных (слева).

	Номер соединения	L/D код
мономер	(-)-162	<b>D-1a</b>
димер	(+)-186	<b>D-2a</b>
тример	(+)-226	<b>D-3a</b>
тетрамер	(+)-228	<b>D-4a</b>
пентамер	(+)-230	<b>D-5a</b>
гексамер	(+)-232	<b>D-6a</b>
мономер	(+)-157	<b>L-1a</b>
димер	(-)-195	<b>L-2a</b>
тример	(-)-204	<b>L-3a</b>
тетрамер	(-)-210	<b>L-4a</b>
пентамер	(-)-216	<b>L-5a</b>
гексамер	(-)-222	<b>L-6a</b>



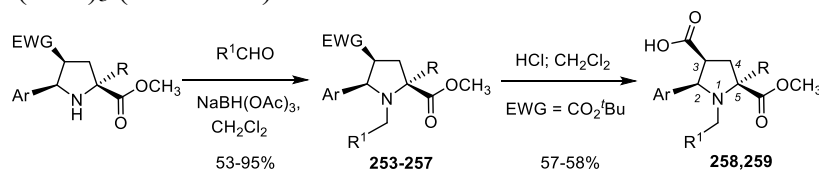
**Глава 4.** Последовательно рассмотрены в порядке нумерации атомов в пирролидиновом кольце 5-Ar-2-ПКК реакции алкилирования/ацилирования вторичной аминогруппы (*1*-ое положение), восстановления и последующей модификации сложноэфирной группы при 2-ом углеродном атоме и трансформации электроноакцепторной группы при 4-ом стереогенном центре, в результате проведения которых получены разнообразные органические соединения, содержащие структурный фрагмент ПС 5-Ar-2-ПКК. При проведении *N*-метилирования рацемических 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоксилатов **40-55**, **57-60** в условиях реакции Эшвейлера-Кларка получены *N*-метил-2-арилпирролидин-3-карбоновые кислоты **233-252** (Схема 4.1).



Ar: Ph (**233,241,251**); 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**234,242**); 2-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**235**); 4-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**236,246,249**); 2,3-(F)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**237**); 2-F-5-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**238**); 3-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**239**); 2,4-(Cl)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**240**); 2-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**243**); 2-CF<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**244**); 3-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**245**); 2-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**247**); 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**248**); 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**250**); 3-пиридил (**252**). R: H (**233-240**); CH<sub>3</sub> (**241-248**); Et (**249,250**); <sup>t</sup>Bu (**251,252**).

Схема 4.1

Введение более сложных алкильных заместителей в *1*-е положение производных 5-Ar-2-ПКК, содержащих электроноакцепторный заместитель в 4-ом положении пирролидинового цикла, осуществлено при помощи восстановительного алкилирования альдегидами в присутствии NaBH(OAc)<sub>3</sub> (Схема 4.2).



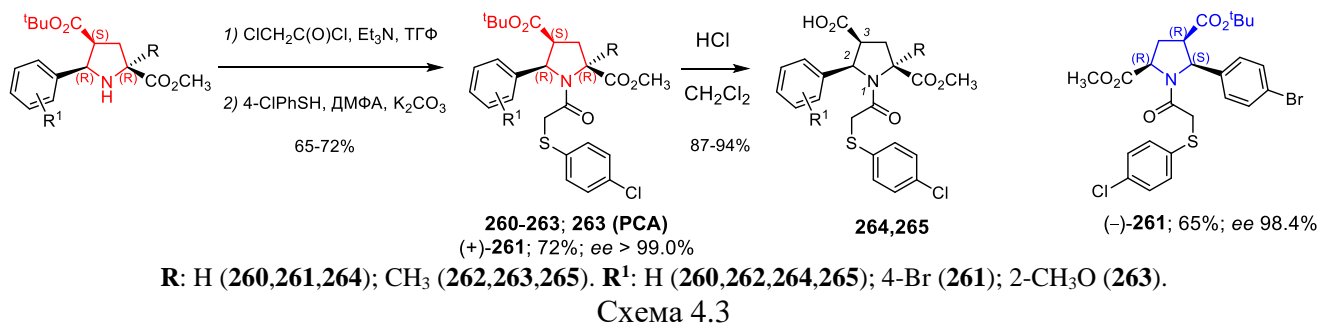
Ar: Ph (**253,258**); 2-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**254,259**); 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**255,256**); 2-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**257**). R: H (**253,255-258**); CH<sub>3</sub> (**254,259**). R<sup>1</sup>: 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**253,258**); PhCH=CH (**254,256,257,259**); Et (**255**). EWG: CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu (**253,254,258,259**); SO<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub> (**255-257**).

Схема 4.2

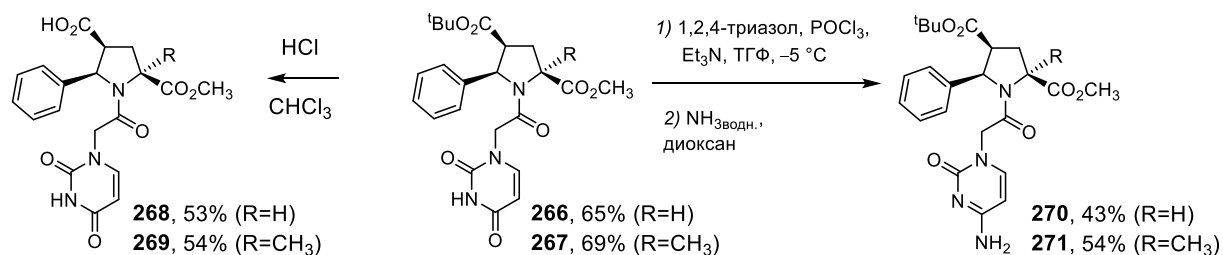


5-Арилпирролидин-2,4-дикарбоксилаты **40** и **56** и винилсульфоны **86** и **87** при взаимодействии с альдегидами различной природы в присутствии  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  образуют N-алкилированные продукты **253-257**. Последующий гидролиз соединений **253** и **254** в кислых условиях приводит к получению N-алкил-2-арилпирролидин-3-карбоновых кислот **258** и **259** (Схема 4.2).

В качестве ацилирующего агента использован бифункциональный хлорацетилхлорид, позволяющий в дальнейшем проводить реакции нуклеофильного замещения в алифатической цепи. При ацилировании диэфиров 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоновых кислот **40**, **41**, **48**, **56** с высокими выходами образовывались соответствующие хлорацетамиды, которые оказались чувствительными к внешним условиям соединениями, вследствие чего вводились в дальнейшие реакции без дополнительной очистки. В качестве нуклеофильного агента для введения дополнительного структурного элемента в ацетамидный фрагмент N-ацилированных производных 5-Ar-2-ПКК был использован *n*-хлортиофенол, что привело к получению (арилтио)ацетамидов **260-263** в результате двухстадийного синтеза (Схема 4.3). При использовании энантимерно чистых производных 5-Ar-2-ПКК (+)-**41** и (-)-**41** получены хиральные (арилтио)ацетамиды (+)-**261** и (-)-**261**, характеризующиеся высокой степенью энантиомерной чистоты (Схема 4.3). Гидролиз *трет*-бутиловых эфиров в соединениях **260** и **262** приводит с высокими выходами к образованию карбоновых кислот **264** и **265**.



Далее было проведено введение урацильного фрагмента в N-ацил-5-Ar-2-ПКК и его трансформация в цитозиновый остаток. Обработка хлорацетамидов, полученных из 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоксилатов **40** и **48**, урацилом в присутствии  $\text{K}_2\text{CO}_3$  в ДМФА приводит к региоселективному алкилированию азотистого основания по атому  $\text{N}^1$  и образованию соединений **266** и **267**, гидролиз которых в кислых условиях вызывает образование карбоновых кислот **268** и **269** соответственно (Схема 4.4). По методу Риза через промежуточное образование триазолильных интермедиатов урацилзамещённые 5-Ar-2-ПКК **266** и **267** были преобразованы в цитозинзамещённые N-ацил-5-Ar-2-ПКК **270** и **271** (Схема 4.4).



Для модификации пиримидиновых и пуриновых азотистых оснований были использованы реакции алкилирования по Мицунобу спиртами, полученными восстановлением карбоксильных функций во 2-м или 4-м положении пирролидинового цикла синтезированных ранее производных 4-замещённых 5-Ar-2-ПКК. Полученные из рацемических *цис*-4-цианозамещённых 5-арилпролинолатов **65** и **70** N-метилпроизводные **272** и **273** селективно восстанавливали избытком  $\text{LiBH}_4$  до замещённых арилпролинолов **274** и **275** (Схема 4.5). Далее с использованием окислительно-восстановительной системы  $\text{PPh}_3/\text{DEAD}$  указанными аминспиртами были проалкилированы  $\text{N}^3$ -бензоилурацил и  $\text{N}^3$ -бензоилтимин (Схема 4.5). Под действием аммиака в мягких условиях происходит дебензоилирование соединений **276-278** и образуются  $\text{N}^1$ -алкилированные пиримидиновые азотистые основания **279-281** (Схема 4.5).

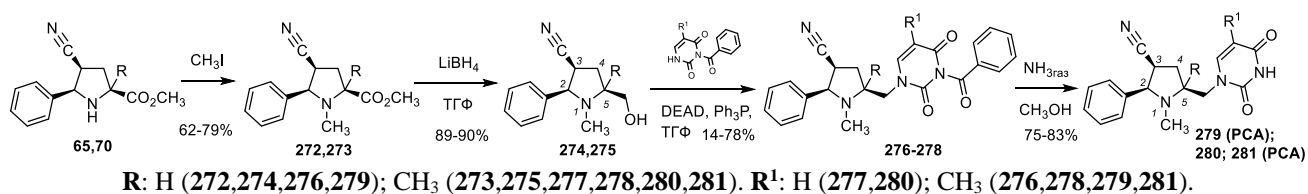


Схема 4.5

Введение гидроксиметильного фрагмента в 4-е положение молекулярного каркаса 5-Ar-2-ПКК осуществляли селективным восстановлением карбоксильной группы в *N*-метил-2-арилпирролидин-3-карбоновых кислотах **233**, **240**, **243**, **244**, **246** (Схема 4.6). Свободную карбоксильную группу в указанных кислотах активировали конвертацией в смешанный ангидрид при помощи изобутилхлорформиата при охлаждении, после чего осуществляли восстановление 2-3 эквивалентами NaBH<sub>4</sub>. В данных условиях 2-метоксикарбонильная группа не затрагивается, что позволяет синтезировать соединения **282-286** в препаративных количествах. Полученные производные 5-Ar-2-ПКК, содержащие первичную спиртовую группу, были использованы в качестве алкилирующих агентов в реакциях Мицунобу с пиридиновыми и пуриновыми азотистыми основаниями (Схема 4.6). Как и в ранее представленных экспериментах (Схема 4.5), алкилированию функционализированным спиртом **282** были подвергнуты *N*<sup>3</sup>-бензоилурацил и *N*<sup>3</sup>-бензоилтимин. В полученных аминоспиртах **282-286** <sup>13</sup>C химический сдвиг метиленового атома углерода при гидроксильной группе находится в диапазоне 63-64 м.д., что характеризует его как «мягкий» центр и предсказывает алкилирование «мягкого» *N*<sup>1</sup>-центра в *N*<sup>3</sup>-бензоилтимине (Схема 4.6). <sup>13</sup>C химический сдвиг рассматриваемого метиленового атома углерода в продуктах реакции Мицунобу **287** и **288** и их дебензоилированных производных **289** и **290** находится в области 51-52 м.д., что также свидетельствует о замещении *N*<sup>1</sup>-атома в пиридиновых азотистых основаниях (Схема 4.6).

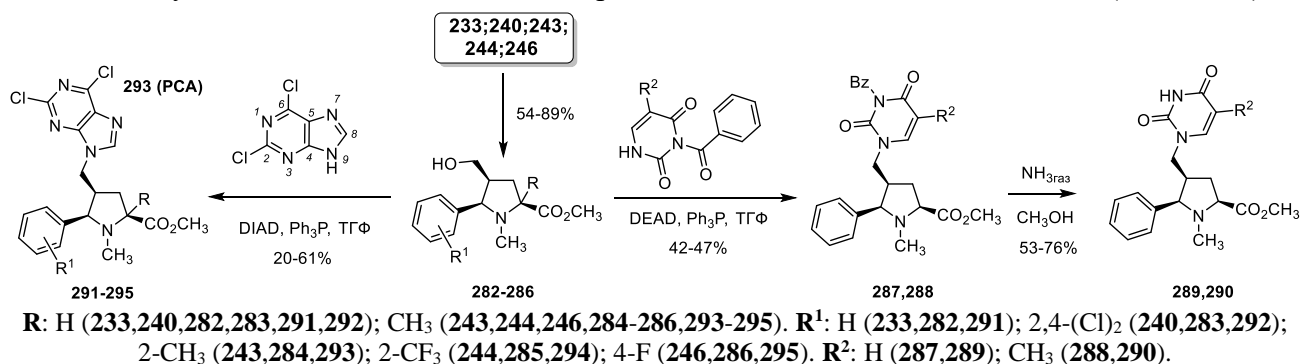
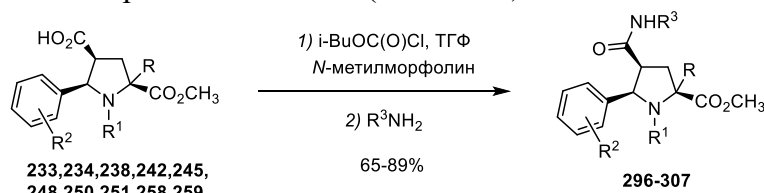


Схема 4.6

Для введения пуринового фрагмента в содержащие 5-Ar-2-ПКК молекулы был использован 2,6-дихлорпурин, обладающий более высокой растворимостью в органических растворителях по сравнению с аминами и окси-аналогами. Взаимодействие аминоспиртов **282-286** с 2,6-дихлорпурин проводили с использованием окислительно-восстановительной системы PPh<sub>3</sub>/DIAD (Схема 4.6). Хроматографическое разделение соответствующих реакционных смесей осложнялось компонентами окисления/восстановления конденсирующей системы, и в некоторых случаях дополнительную очистку целевых продуктов от примесей неосновной природы осуществляли получением гидрохлоридов пирролидиновых соединений. В результате с умеренными выходами синтезированы 4-((пурин-9-ил)метил)-5-Ar-2-ПКК **291-295**, относительное расположение заместителей в которых установлено изучением эффекта Оверхаузера для протонов пирролидинового кольца нуклеозидного аналога **292**. *N*<sup>9</sup>-алкилирование 2,6-дихлорпурина аминоспиртами **282-286** подтверждается рентгеноструктурным исследованием соединения **293**.

Из рацемических *N*-алкилпирролидин-3-карбоновых кислот **233**, **234**, **238**, **242**, **245**, **248**, **250**, **251**, **258** и **259** были также получены амидные производные (Схема 4.7). Активацию карбоксильной группы осуществляли по ранее отработанному методу при помощи изобутилхлорформиата, и образующиеся *in situ* смешанные ангидриды обрабатывали

газообразным аммиаком или бензиламином, в результате чего выделены рацемические амиды **296-307** соответствующих карбоновых кислот (Схема 4.7).



**R:** H (233,234,238,242,245,248,250,251,258,259); CH<sub>3</sub> (242,245,248,259,299-303,307); Et (250,304); <sup>t</sup>Bu (251,305).  
**R<sup>1</sup>:** CH<sub>3</sub> (233,234,238,242,245,248,250,251,296-305); 4-ClPhCH<sub>2</sub> (258,306); PhCH=CHCH<sub>2</sub> (259,307).  
**R<sup>2</sup>:** H (233,251,258,296,305,306); 4-Br (234,242,297,299); 2-F-5-CH<sub>3</sub>O (238,298); 3-F (245,300); 4-Cl (248,301-303); 4-CH<sub>3</sub>O (250,304); 2-CH<sub>3</sub>O (259,307). **R<sup>3</sup>:** H (296,298,300,301,304-307); 4-FBn (297,303); Bn (299,302).

Схема 4.7

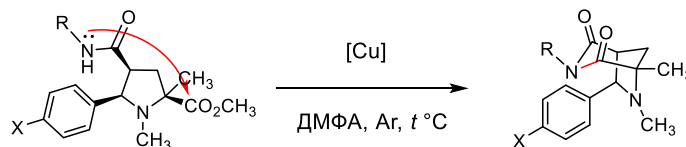
**Глава 5.** Рассмотрены методы усложнения молекулярного каркаса 5-Ar-2-ПКК, основанные на реакциях внутримолекулярного сочетания входящих в его состав функциональных групп (ФГ), что приводит к образованию новых мостиковых и аннелированных гетероциклических соединений. *Диверсифицированно-ориентированный синтез* (ДОС) (Diversity-Oriented Synthesis\* (DOS)) представляет собой интенсивно развивающуюся инновационную стратегию по получению и идентификации перспективных биологически активных соединений. В качестве одного из эффективных направлений реализации ДОС-стратегии Стюарт Шрейбер рассматривает концепцию «build/couple/pair».† «Build»-этап (этап построения) заключается в асимметрическом синтезе хиральных структурных блоков, содержащих независимо трансформируемые ФГ. На этапе «couple» (этап связывания) осуществляются межмолекулярные реакции структурных блоков, которые должны происходить без изменения конфигураций или с полным стереохимическим контролем этих изменений стереогенных центров. Заключительный «pair»-этап (этап сочетания) характеризуется внутримолекулярными реакциями, попарно соединяющими комбинации ФГ, введённых на начальном этапе построения. Этап сочетания обеспечивает каркасное («скелетное») разнообразие получаемой библиотеки соединений. При помощи несложных сопоставлений представленные в Главе 2 результаты экспериментальных работ могут быть классифицированы как «build»-этап, в Главе 4 приведены «couple»-методы преобразования полученных структурных блоков 5-Ar-2-ПКК, а в настоящей главе будут рассмотрены примеры «pair»-этапа, что в совокупности является *первым примером* полного цикла ДОС-подхода «build/couple/pair» для синтетических исследований, базирующихся на 1,3-ДЦ АИ. Далее последовательно рассмотрены сочетания метокси-карбонильной группы во 2-ом положении пирроллидинового кольца с ФГ в 4-ом и 3-ем положениях 5-Ar-2-ПКК, а также реакции аннелирования пирроллидинового цикла по связи N<sup>1</sup>-C<sup>2</sup>.

Сочетание 4-карбамоильной и 2-метоксикарбонильной групп в производных 5-Ar-2-ПКК, которое одновременно является новым методом синтеза 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанов, было зафиксировано при нагревании эфира 4-карбамоил-5-(4-бромфенил)пирролидин-2-карбоновой кислоты **297** в ДМФА в присутствии CuCN (Таблица 5.1). После полной конверсии соединения **297** был выделен индивидуальный по данным ТСХ продукт реакции, в спектре <sup>1</sup>H ЯМР которого отсутствовали сигналы протонов карбоксиметильной группы, а количество сигналов в алифатической части спектра было удвоено. В спектре <sup>13</sup>C ЯМР этого соединения присутствовали четыре сигнала в области 171-173 м.д., соответствующие карбонильным атомам углерода. Для подтверждения гипотезы о произошедшей внутримолекулярной циклизации было проведено рентгеноструктурное исследование, установившее, что полученный продукт является сокристаллизатом 3,6-диазабицикло[3.2.1]октановых имидов **308** и **309** в соотношении 1:1. Условия новой внутримолекулярной циклизации, приводящей к образованию бициклического диазаоктанового скелета, в присутствии солей меди и без их добавления были дополнительно исследованы на хлорфенилзамещённых амидах **301** и **302** (Таблица 5.1).

\* S.L. Schreiber. *Science*, **2000**, Vol. 287, No 5460, pp. 1964-1969.

† T.E. Nielsen, S.L. Schreiber. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, Vol. 47, No 1, pp. 48-56.

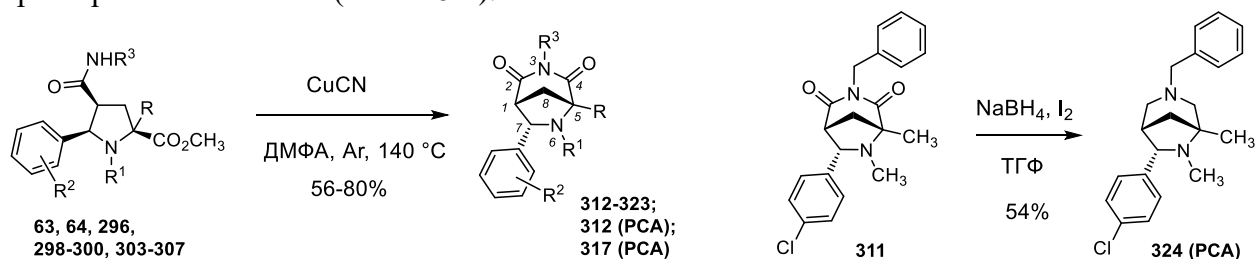


Таблица 5.1. Изучение циклизации *цис*-5-арил-4-карбамоилпирролидин-2-карбоксилатов в присутствии солей меди.

<i>N</i> -CH <sub>3</sub> -4-карбамоил-5-Аг-2-ПКК	Катализатор, мольных %	<i>T</i> , °С (время реакции, ч)	Конверсия <i>N</i> -CH <sub>3</sub> -4-карбамоил-5-Аг-2-ПКК, %	3,6-Диазабицикло[3.2.1]-октан (выход, %)
<b>297</b> , R=4-FBn, X=Br	CuCN, 500	150 (30)	100	<b>308</b> (PCA, X=Br, 43) <b>309</b> (PCA, X=CN, 43)
<b>301</b> , R=H, X=Cl	—	150 (50)	65	<b>310</b> (10)
<b>301</b> , R=H, X=Cl	CuCN, 500	150 (23)	100	<b>310</b> (78)
<b>302</b> , R=Bn, X=Cl	—	150 (64)	70	<b>311</b> (37)
<b>302</b> , R=Bn, X=Cl	CuI, 500	150 (51)	93	<b>311</b> (29)
<b>302</b> , R=Bn, X=Cl	Cu(OTf) <sub>2</sub> , 350	150 (35)	94	<b>311</b> (29)
<b>302</b> , R=Bn, X=Cl	CuCN, 500	150 (24)	100	<b>311</b> (83)
<b>302</b> , R=Bn, X=Cl	CuCN, 20	140 (53)	100	<b>311</b> (90)

Нагревание соединений **301** и **302** с пятикратным количеством CuCN приводило к полной конверсии исходных соединений и образованию 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанов **310** и **311** с хорошими выходами (Таблица 5.1, строки №№ 3 и 7). В отсутствие каких-либо добавок конверсия амидов **301** и **302** при нагревании до 150 °С достигала 70%, а выходы соединений **310** и **311** не превышали 40% (Таблица 5.1, строки №№ 2 и 4). Использование CuI и Cu(OTf)<sub>2</sub> в качестве катализаторов циклизации приводило практически к полной конверсии бензиламида **302**, но выход 3,6-диазабицикло[3.2.1]октана **311** составлял менее 30% (Таблица 5.1, строки №№ 5 и 6). Уменьшение количества CuCN с 500 до 20% мольных и снижение температуры реакции до 140 °С также явились приемлемыми условиями для проведения сочетания двух карбоксильных функций в бензиламиде **302** и образования мостикового бициклического имида **311** с выходом 90% (Таблица 5.1, строка № 8).

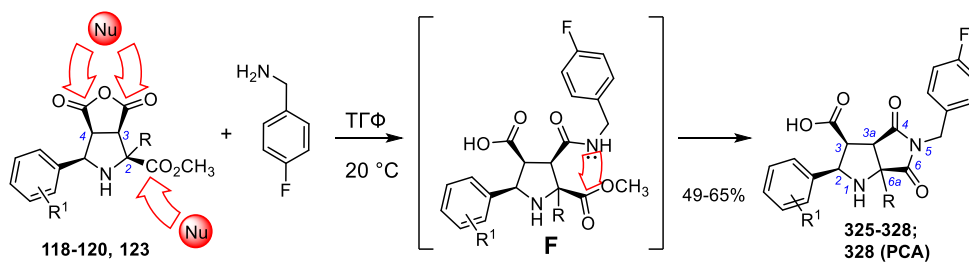
Разработанные условия циклизации были использованы для трансформации 4-карбамоил-5-Аг-2-ПКК **63**, **64**, **296**, **298-300**, **303-307** (Схема 5.1). Для сокращения времени реакции в некоторых случаях добавляли 1 эквивалент CuCN. При восстановлении имида **311** при помощи сгенерированного *in situ* диборана образуется бициклический диамин **324**, охарактеризованный PCA (Схема 5.1).



**R**: H (**314,315,322**); CH<sub>3</sub> (**312,316-319,323**); Et (**320**); <sup>t</sup>Bu (**313,321**). **R**<sup>1</sup>: H (**312,313**); CH<sub>3</sub> (**314-321**); 4-ClPhCH<sub>2</sub> (**322**); PhCH=CHCH<sub>2</sub> (**323**). **R**<sup>2</sup>: H (**314,321,322**); 4-CN (**312,317**); 3-пиридил (**313**); 2-F-5-CH<sub>3</sub>O (**315**); 4-Br (**316**); 3-F (**318**); 4-Cl (**319**); 4-CH<sub>3</sub>O (**320**); 2-CH<sub>3</sub>O (**323**). **R**<sup>3</sup>: H (**312-315,318,320-323**); 4-FBn (**319**); Bn (**316,317**).

Схема 5.1

Эффективное сочетание карбоксильных функциональных групп, расположенных во 2-ом и 3-ем положениях пирролидинового кольца 5-Аг-2-ПКК, происходит с участием ангидридов пирролидин-2,3,4-трикарбоновых кислот **118-120**, **123** (Схема 5.2), получение которых рассмотрено в Главе 2 (Схема 2.16). В рассматриваемых гетероциклических ангидридах атака нуклеофильного агента (Nu) может проходить по трём карбонильным группам с очевидным преобладанием реакционной способности двух ангидридных положений. В случае, если Nu представляет собой первичный амин, например 4-фторбензиламин, то образующийся при взаимодействии с карбонильной группой в 3-ем положении пирролидинового кольца амид **F** может подвергаться дальнейшей внутримолекулярной реакции с 2-метоксикарбонильной группой с образованием бициклической системы октагидропирроло[3,4-*b*]пиррола (Схема 5.2).

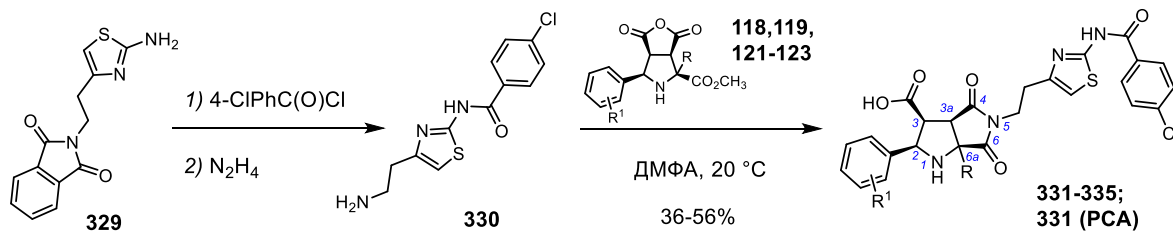


R: CH<sub>3</sub> (118-120,325-327); Bn (123,328). R<sup>1</sup>: H (118,325); 4-Br (119,326); 4-Cl (120,327); 3-F (123,328).

Схема 5.2

Так как химические свойства гетероциклических ангидридов **118-120**, **123** не исследованы, мы провели экспериментальные работы по изучению представленного на Схеме 5.2 взаимодействия. Простое перемешивание при комнатной температуре ангидридов пирролидин-2,3,4-трикарбоновых кислот **118-120**, **123** и 4-фторбензиламина приводило к хорошему выходу к образованию кристаллических продуктов реакции, в <sup>1</sup>H ЯМР спектрах которых отсутствовали сигналы протонов метоксикарбонильной группы и фиксировался сигнал протона свободной карбоксильной группы при 12 м.д., что соответствует продуктам тандемного превращения **325-328** (Схема 5.2). После 72 часов взаимодействия гетероциклического ангидрида **120** и 4-фторбензиламина в спектре <sup>1</sup>H ЯМР реакционной смеси отсутствовали сигналы исходных реагентов и фиксировались три продукта реакции в молярном соотношении 13:4:1, среди которых преобладала октагидропирроло[3,4-*b*]пиррол-3-карбоновая кислота **327**. Данные факты указывают на региселективную атаку аминного нуклеофильного агента по ангидридной карбонильной группе в 3-ем положении пирролидинового кольца гетероциклического соединения **120**. Рентгеноструктурное исследование соединения **328** полностью подтвердило формирование молекулярного каркаса октагидропирроло[3,4-*b*]пиррола и сохранение относительной конфигурации четырёх стереогенных центров пирролидинового цикла в полученном аннелированном соединении.

Полученный из аминотиазола **329** гетероциклический амин **330** был также введён во взаимодействие с ангидридами пирролидин-2,3,4-трикарбоновых кислот **118**, **119**, **121-123** (Схема 5.3). В результате были получены соединения **331-335**, соответствующие по спектральным характеристикам 2-арил-октагидропирроло-[3,4-*b*]пирролам с (4-хлорбензоил)-аминотиазольным заместителем в 5-ом положении бициклического молекулярного каркаса, что подтверждается рентгеноструктурным исследованием продукта каскадной рециклизации **331**.



R: CH<sub>3</sub> (118,119,121,122,331-334); Bn (123,335).

R<sup>1</sup>: H (118,331); 4-Br (119,332); 3,5-(<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-4-OH (121,333); 4-CN (122,334); 3-F (123,335).

Схема 5.3

Рассмотренные выше реакции [2,4-сочетания] и [2,3-сочетания] ФГ в молекулярном каркасе 5-Ar-2-ПКК представляют собой новый тип реакций *aza*-аннелирования. Дополнительное усложнение молекулярного каркаса получаемых соединений может быть достигнуто при использовании возможности взаимодействия вторичной аминогруппы в октагидропирроло[3,4-*b*]пирроле **G** с метоксикарбонильной группой, расположенной на периферии *ба*-заместителя (Схема 5.4). Мы осуществили одnoreакторный вариант представленных на Схеме 5.5 превращений. После 72-х часового взаимодействия ангидрида **124** и 4-фторбензиламина в спектре <sup>1</sup>H ЯМР реакционной смеси преобладали сигналы октагидропирроло[3,4-*b*]пиррол-3-карбоновой кислоты **G** (Схема 5.4). Реакционная смесь была сконцентрирована, перерастворена в ацетонитриле и нагревалась при 82 °C в течение последующих 24 часов.

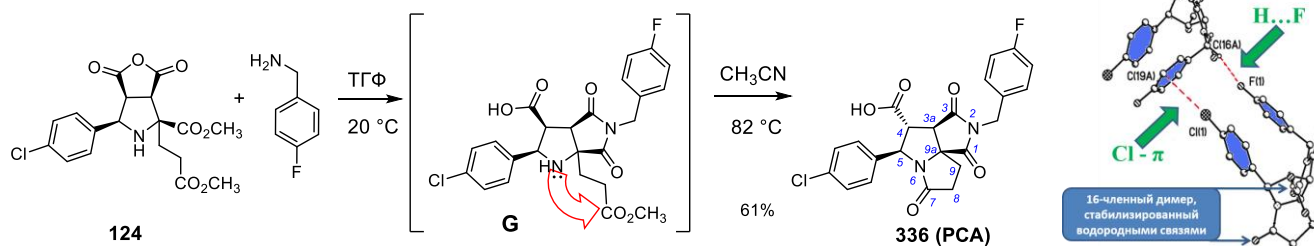
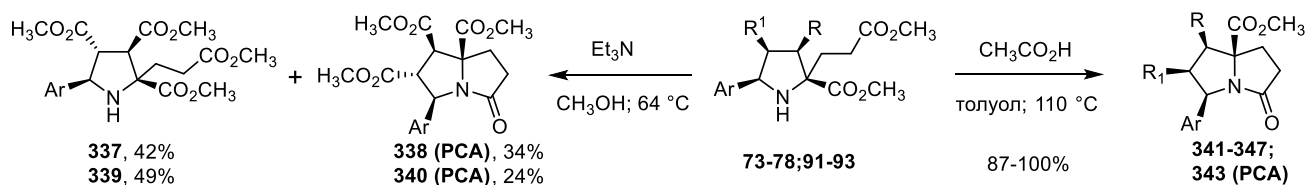


Схема 5.4

Выделенный основной продукт реакции представлял собой соединение **336** с трициклическим аннелированным молекулярным каркасом октагидро-2,5*a*-диазапентациклопента[с]пенталена, в котором стереогенный центр при  $C^4$  эпимеризовался относительно соответствующего центра в исходном производном 5-Ar-2-ПКК **124**. Молекулярная структура диазапентациклопента[с]пенталена **336** установлена при помощи PCA и подтвердила произошедшие тандемные превращения {нуклеофильное раскрытие ангидридного фрагмента по 3-ему положению пирролидинового кольца / аннелирование 3-карбамоильной и 2-метоксикарбонильной ФГ / лактамизация вторичного амина в положении 1 и периферийной метоксикарбонильной группы}. Кроме этого, для молекулярной упаковки соединения **336** характерны несколько специфических взаимодействий (Схема 5.4).

Лактамизация, подобная проведённой на последнем этапе синтеза полициклического соединения **336**, приводит к дополнительному аннелированию пирролидинового циклоаддукта по связи  $N^1-C^2$  и в некоторых случаях протекает спонтанно (Схема 2.6). Возможность проведения данной структурной модификации молекулярного каркаса 5-Ar-2-ПКК была изучена нами для ранее синтезированных соединений **73-78** (Схема 2.5) и **91-93** (Схема 2.7), содержащих структурный фрагмент диметилглутамата. При нагревании в метаноле в присутствии  $Et_3N$  пирролидиновые циклоаддукты **73** и **75** с незамещённым  $C^3$ -атомом пирролидинового кольца не подвергаются конверсии и могут быть выделены в неизменном состоянии с количественным выходом (Схема 5.5). Пирролидиновые циклоаддукты **76** и **78**, у которых при  $C^3$ -атоме расположен *цис*-метоксикарбонильный заместитель, при нагревании в присутствии  $Et_3N$  трансформируются в два продукта реакции – производные 5-Ar-2-ПКК **337** и **339** с эпимеризованным  $C^4$ -стереогенным центром и продукты их последующей лактамизации **338** и **340** (Схема 5.5). Все типы пирролидиновых циклоаддуктов, полученных из иминоэфиров на основе диметилглутамата, при нагревании в присутствии эквимольных количеств  $CH_3CO_2H$  в толуоле подвергаются внутримолекулярной конденсации с образованием пирролизидинов **341-347**, у которых конфигурация стереогенных центров не изменяется по сравнению с предшественниками **73-75**, **77**, **91-93** (Схема 5.5).



Ar: Ph (**73,76,337,338,341,345**); 3,4- $(CH_3O)_2C_6H_3$  (**74,77,342,344,346**); 3-пиридил (**75,78,339,340,343,347**). R: H (**73-75,341-343,345-347**);  $CO_2CH_3$  (**76-78,344**). R<sup>1</sup>:  $CO_2CH_3$  (**341-344**);  $SO_2CH=CH_2$  (**345-347**).

Схема 5.5

**Глава 6.** Рассмотрены биологические функции и строение бактериального фермента – сортазной транспептидазы SrtA *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* SrtA, Сортаза А), определяющие его участие в вирулентности (инфицирующей способности) грамположительных микроорганизмов и патогенезе бактериальных инфекций. Сортаза А перехватывает поверхностные белки после их транслокации через цитоплазматическую мембрану, расщепляет С-терминальную LPXTG-последовательность между треониновым (Т) и глициновым (G) остатками и переносит N-терминальный домен поверхностного белка на аминогруппу пентаглицинового ( $Gly_5$ ) соединительного спейсера, расположенного на биосинтетическом предшественнике пептидогликана. Затем модифицированный поверхностными белками пептид

полимеризуется с гликановыми и пептидными компонентами, формирующими бактериальную стенку грамположительных микроорганизмов. Закреплённые Сортазой А на бактериальной стенке поверхностные протеиновые вирулентные факторы (поверхностные белки), такие как MSCRAMMs (микробные поверхностные компоненты, распознающие адгезивные межклеточные молекулы), комплементарны протеинам и иммуноглобулинам организма хозяина и определяют адгезию бактерий к тканям организма хозяина. Мутантные штаммы *S. aureus*, у которых отсутствует ген, производящий Сортазу А, характеризуются увеличенной на несколько порядков летальной дозой LD<sub>50</sub>, по сравнению с патогенными штаммами.

Для достижения профилактических и терапевтических целей в лечении инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, представляется целесообразным прерывать перенос поверхностных белков на бактериальную стенку путём ингибирования сортаз соответствующими низкомолекулярными ингибиторами. Соединения, влияющие на вирулентность, создают *in vivo* сценарий, подобный вакцинации живым ослабленным штаммом. В качестве мишеней антивирулентных ингибиторов рассматриваются функциональность бактериального токсина, доставка бактериального токсина, регуляция экспрессии вирулентности (образование токсина, *quorum sensing* и т.п.) и *бактериальная адгезия*.<sup>\*</sup> Поскольку ингибиторы Сортазы А предотвращают экспрессию поверхностных белков на клеточной стенке бактерий, ответственных за адгезию к тканям человека, тем самым они должны предотвращать и саму адгезию микробных клеток на тканях организма или поверхности имплантированных медицинских устройств. Данное предположение подтверждается позапрошлогодним исследованием Шнивинда (O. Schneewind) с соавторами, в котором показано, что низкомолекулярный ингибитор *S. aureus* SrtA защищает мышей от летальной стафилококковой бактериемии.<sup>†</sup>

*S. aureus* SrtA представляет собой цистеиновую транспептидазу, состоящую из 206-ти аминокислотных остатков с N-концевым трансмембранным якорем. Периферийные заместители аминокислотных остатков His120, Cys184 и Arg197 формируют активный сайт фермента. Нуклеофильная атака Cys184 запускает реакцию переноса или гидролиза LPXTG сортировочного сигнала поверхностного белка, распознаваемого активным сайтом фермента. Одним из способов ингибирования ферментов, содержащих цистеиновый остаток в активном сайте, является ковалентная модификация сульфгидрильной группы. На начало проведения наших исследований по данной тематике были известны единичные примеры синтетических ингибиторов сортаз и их влияния на вирулентность грамположительных организмов, среди которых указывалось на простейший фенилвинилсульфон, необратимо ингибирующий сортазу *S. aureus* SrtA (IC<sub>50</sub> 736 µM) и существенно снижающий адгезию *S. aureus* к пластинам, покрытым фибронектином.<sup>‡</sup>

Влияние производных 5-Ar-2-ПКК, содержащих потенциальные акцепторы Михаэля, и их структурных аналогов на ферментативную реакцию *S. aureus* SrtA было изучено с использованием ВЭЖХ аналитического метода, позволяющего определять кинетические параметры образования как продукта гидролиза, так и продукта транспептидации.<sup>§</sup> Как следует из приведённых в Таблице 6.1 данных, наиболее активными ингибиторами *S. aureus* SrtA являются рацемические пирролидинилвинилсульфоны **85**, **87** и **88**, ингибирующие фермент при низких миллимолярных концентрациях. Замещение во 2-ом положении пирролидинового фрагмента 5-Ar-2-ПКК (соединения **92** и **93**), как и аннелирование изучаемого молекулярного каркаса (соединения **345-347**) приводят к снижению ингибирующей активности по сравнению со структурными аналогами **85**, **87** и **88** (Таблица 6.1). Соединения **65-68**, содержащие карбонитрильную группу в 4-ом положении молекулярного каркаса 5-Ar-2-ПКК, частично ингибируют изучаемый фермент в миллимолярных концентрациях (Таблица 6.1).

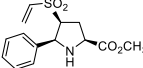
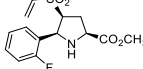
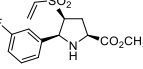
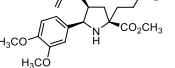
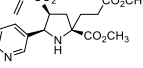
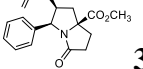
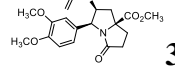
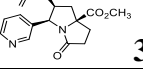
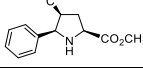
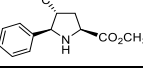
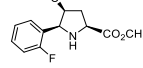
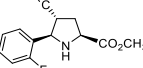
\* A.E. Clatworthy, E. Pierson, D.T. Hung. *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, Vol. 3, No 9, pp. 541-548.

† J. Zhang, H. Liu, K. Zhu, S. Gong, S. Dramsi, Y.T. Wang, J. Li, F. Chen, R. Zhang, L. Zhou, L. Lan, H. Jiang, O. Schneewind, C. Luo, C.G. Yang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, Vol. 111, No 37, pp. 13517-13522.

‡ B.A. Frankel, M. Bentley, R.G. Kruger, D.G. McCafferty. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, Vol. 126, No 11, pp. 3404-3405.

§ Выполнено в соавторстве с Prof. Dewey G. McCafferty (Department of Chemistry, Duke University, USA) по методу, изложенному в работе: R.G. Kruger, P. Dostal, D.G. McCafferty. *Anal. Biochem.*, **2004**, Vol. 326, No 1, pp. 42-48.

Таблица 6.1. Ингибирование *S. aureus* SrtA производными 5-Аг-2-ПКК.

Соединение	IC <sub>50</sub> (mM)	Коэфф. Хилла	Max % I, (с, mM) <sup>a</sup>	$k_{\text{inact}}^{\text{app}}/K_1^{\text{app}}$ (M <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$k_{\text{inact}}/K_1$ (M <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
 <b>85</b>	0.85 ± 0.05	1.23 ± 0.07	100 (5)	12.73 ± 0.71	(2.12 ± 0.12) × 10 <sup>4</sup>
 <b>87</b>	1.32 ± 0.27	1.32 ± 0.27	100 (5)	9.18 ± 1.55	(1.53 ± 0.26) × 10 <sup>4</sup>
 <b>88</b>	1.04 ± 0.27	1.04 ± 0.12	100 (5)	10.67 ± 1.28	(1.78 ± 0.21) × 10 <sup>4</sup>
 <b>92</b>	> 5.0	н.о.	60.0 ± 0.7 (5)	н.о.	н.о.
 <b>93</b>	1.86 ± 0.42	1.40 ± 0.33	86.9 ± 0.1 (5)	н.о.	н.о.
 <b>345</b>	2.20 ± 0.17	1.90 ± 0.23	92.7 ± 0.7 (5)	н.о.	н.о.
 <b>346</b>	2.68 ± 0.59	1.39 ± 0.28	78.8 ± 1.0 (5)	н.о.	н.о.
 <b>347</b>	2.47 ± 0.27	1.42 ± 0.14	65.3 ± 1.3 (5)	н.о.	н.о.
 <b>65</b>	–	–	10.9 ± 5.7 (5)	–	–
 <b>66</b>	–	–	25.9 ± 0.5 (5)	–	–
 <b>67</b>	–	–	26.7 ± 0.6 (5)	–	–
 <b>68</b>	–	–	22.9 ± 0.5 (5)	–	–

<sup>a</sup> Максимальный процент ингибирования при указанной в скобках концентрации соединения. <sup>b</sup> Скорректировано на фракцию фермента в противоположно-протонированном состоянии (0.06%). н.о. – не определяли.

Несмотря на относительно высокие активные концентрации, пирролидинилвинилсульфоны **85**, **87** и **88** были изучены более подробно, так как обладая низкой молекулярной массой (~ 300 Da), могут быть применены в качестве фрагментов для основанных на *фрагментарном подходе к открытию лекарств* (ФПОЛ) (Fragment-Based Drug Discovery\* (FBDD)) методов разработки соединений с увеличенной активностью. Кинетические исследования продемонстрировали, что пирролидинилвинилсульфоны **85**, **87** и **88** необратимо ингибируют *S. aureus* SrtA. Из этих данных определены кажущиеся константы скорости второго порядка  $k_{\text{inact}}^{\text{app}}/K_1^{\text{app}}$ , более корректно характеризующие эффективность ковалентных ингибиторов по сравнению с величинами IC<sub>50</sub>. Истинные величины  $k_{\text{inact}}/K_1$  были получены с учётом 0.06% содержания реакционноспособной тиолят-имидазолиевой фракции фермента. Необратимый характер дезактивации *S. aureus* SrtA рацемическими пирролидинилвинилсульфонами **85**, **87** и **88** включает ковалентную модификацию сульфгидрильной группы аминокислотного остатка Cys184 в активном сайте фермента, что подтверждено масс-спектрометрическим исследованием аддукта {**88**-SrtA} (Схема 6.1). После инкубирования сортазы SrtA с раствором соединения **88**, SrtA-содержащая фракция была гидролизована трипсином и проанализирована при помощи ESI-MS. Фрагмент пептида <sup>178</sup>QLTLITCDDYNEKTGVWEK<sup>196</sup> с молекулярной массой 2256.1 Da после инкубирования имел

\* C.W. Murray, D.C. Rees. *Nat. Chem.*, **2009**, Vol. 1, No 3, pp. 187-192.



массу 2569.4 Da, прирост массы 313.3 Da соответствует молекулярному весу винилсульфона **88**. ESI-MS/MS секвенирование локализовало модификацию аминокислотного остатка Cys184.

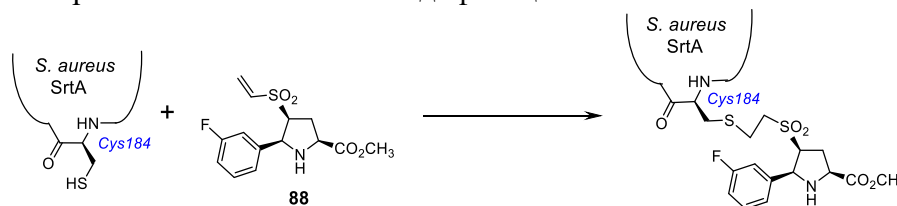


Схема 6.1

Для получения структурной информации о взаимодействии *S. aureus* SrtA и базирующихся на молекулярном каркасе 5-Ar-2-ПКК ингибиторов нами проведён молекулярный докинг (DOCK 6.4) низкомолекулярных лигандов в структуру фермента.\* Поскольку все изученные соединения представляли собой рацематы, моделирование проводилось для каждого из энантиомеров винилсульфонов **85**, **87**, **88**, **92**, **93**, **345-347**. Для построения модели *S. aureus* SrtA были использованы известные кристаллографические данные с PDB ID 1T2P и 1T2W. По данным расчётов молекулы всех указанных соединений располагаются в одной и той же полости субъединицы А белковой молекулы SrtA, сформированной аминокислотными остатками Thr93, Trp94, Glu105, Ser116, Ala118, His120, Ile182, Cys184, Tyr187, Val193, Trp194, Arg197. Наиболее интересные результаты моделирования получены для самых активных по данным проведённых биологических исследований пирролидинилвинилсульфонов **85**, **87** и **88** (Рисунок 6.1). (2*S*,4*S*,5*S*)-Энантиомеры соединений **85**, **87** и **88** располагаются в активном сайте *S. aureus* SrtA таким образом, что винилсульфонильный фрагмент этих молекул сближен с аминокислотным остатком Cys184, обеспечивающим каталитическую активность фермента и ковалентно модифицируемым рассматриваемыми соединениями при ингибировании (Рисунок 6.1). Данный тип расположения винилсульфонильного фрагмента не наблюдается для (2*R*,4*R*,5*R*)-изомеров соединений **85**, **87** и **88** и других винилсульфонов и может вносить существенный вклад в величину  $K_i$ , представляющую собой константу образования первичного нековалентного комплекса с *S. aureus* SrtA. Расстояния между S-атомом остатка Cys184 и C-атомами винильного фрагмента молекулы (2*S*,4*S*,5*S*)-**88** составляют 3.662 и 3.596 Å для  $\alpha$ - и  $\beta$ -атомов углерода соответственно, что при сумме ван-дер-ваальсовых радиусов S–C 3.55 Å должно обеспечивать дальнейшее протекание алкилирования с константой скорости  $k_{inact}$ . Кроме того, (2*S*,4*S*,5*S*)-энантиомеры соединений **85**, **87** и **88** образуют две водородные связи между атомом кислорода сульфонильной группы и Trp194 и между NH-фрагментом пирролидинового цикла и Ala104.

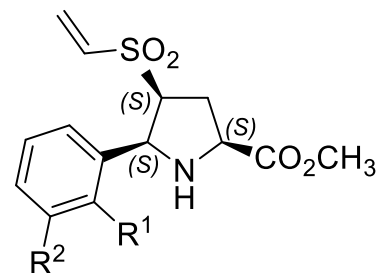
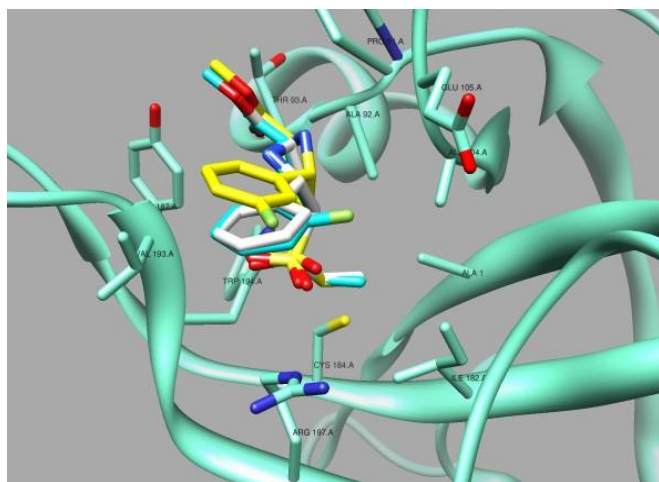


Рисунок 6.1. Расположение (2*S*,4*S*,5*S*)-энантиомеров пирролидинилвинилсульфонов **85** ( $R^1, R^2=H$ ; белый), **87** ( $R^1=F, R^2=H$ ; голубой) и **88** ( $R^1=H, R^2=F$ ; жёлтый) в активном сайте *S. aureus* SrtA по данным молекулярного моделирования.

\* Выполнено в соавторстве с проф., д.х.н. В.А. Васиным и к.х.н. П.С. Петровым (Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева)

Для других винилсульфонов подобных способов расположения в активном сайте не предсказывается, что может являться косвенным обоснованием экспериментально наблюдаемых соотношений «структура–активность», а также указывает на молекулярный каркас (2*S*,4*S*,5*S*)-4-винилсульфонил-5-*Ar*-2-ПКК как возможный начальный структурный фрагмент для дизайна новых ингибиторов *S. aureus* SrtA.

**Глава 7.** Обсуждены ферменты и рецепторы, функциональная активность которых определяется цистеиновыми аминокислотными фрагментами. Рассмотрена концепция ковалентных модификаторов\* в разработке лекарственных средств. Одной из биологических мишеней, содержащей определяющие функциональную активность Cys-остатки, является P2Y<sub>12</sub> пуриноцептор. P2Y<sub>12</sub> рецептор представляет собой GPCR, состоящий из 342-х аминокислотных остатков, в положениях 17, 97, 175 и 270 которого находятся цистеины, и располагается в цитоплазматической мембране тромбоцитов. Ковалентная модификация этих цистеиновых остатков метаболитами антитромбоцитарного препарата клопидогрела путём образования дисульфидной связи приводит к блокировке взаимодействия P2Y<sub>12</sub> и аденозиндифосфата (АДФ), что снижает адгезию и агрегацию тромбоцитов и производит терапевтический эффект, выражающийся в пониженном риске тромбообразования в артериальных сосудах (Схема 7.1). Изучение механизма действия клопидогрела установило сокращение фосфатидилсерин-положительной субпопуляции тромбоцитов в образцах крови принимающих препарат пациентов, что является ещё одним фактором, снижающим прокоагулянтное действие тромбоцитов.

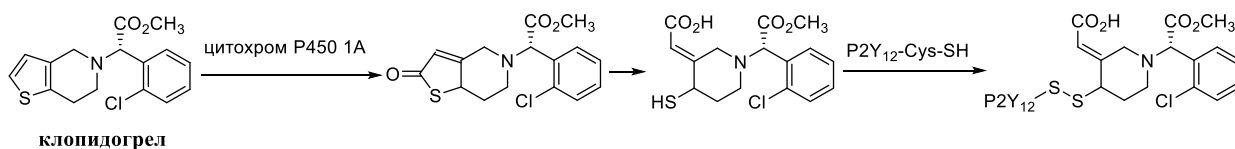


Схема 7.1

Экспонирование фосфатидилсерина при активации, как правило, сосредоточенное в одной тромбоцитарной субпопуляции,<sup>†</sup> представляет собой важнейшую часть прокоагулянтной активности тромбоцитов, приводящее к появлению сайтов связывания для белков системы свёртывания и драматическому (на несколько порядков) ускорению реакций системы гемостаза. По литературным данным, ингибиторы цистеиновых протеаз вызывают снижение экспонирования фосфатидилсерина тромбоцитами, что моделирует похожее действие клопидогрела в организме. Эффективными ингибиторами цистеиновых протеаз являются акцепторы Михаэля, в частности винилсульфоны, что вместе с рассмотренными в Главе 6 результатами обусловило изучение влияния синтезированных в настоящей работе пирролидинилвинилсульфонов **86**, **87**, **89-91**, **255-257**, **346** и **348** на экспонирование фосфатидилсерина тромбоцитами (Схема 7.2).<sup>‡</sup> Рацемическое соединение **348** было получено бензоилированием пирролидинового циклоаддукта **89** (Схема 7.2). Для установления специфичности взаимодействия гетероциклических винилсульфонов с тромбоцитами в качестве функционального аналога был также изучен фенилвинилсульфон (ФВС). Экспонирование фосфатидилсерина тромбоцитами приводит к образованию популяции так называемых «укутанных» тромбоцитов (coated platelets), характеризующихся высоким содержанием фосфатидилсерина на поверхности клеток. Эти клетки эффективно связывают флуоресцентно меченный аннексин V, что позволяет количественно оценить содержание «укутанных» тромбоцитов в популяции с помощью проточной цитометрии. После активации отмытых тромбоцитов тромбином винилсульфоны **86**, **87**, **89-91**, **255-257**, **346**, **348** и ФВС в различной степени снижают количество «укутанных» тромбоцитов (Таблица 7.1).

\* M.H. Potashman, M.E. Duggan. *J. Med. Chem.*, **2009**, Vol. 52, No 5, pp. 1231-1246; J. Singh, R.C. Petter, T.A. Baillie, A. Whitty. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, Vol. 10, No 4, pp. 307-317.

<sup>†</sup> M.A. Panteleev, N.M. Ananyeva, N.J. Greco, F.I. Ataullakhanov, E.L. Saenko. *J. Thromb. Haemost.*, **2005**, Vol. 3, No 11, pp. 2545-2553.

<sup>‡</sup> Выполнено в соавторстве с проф., д.ф.-м.н. М.А. Пантелеевым (ФГБУ «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН)

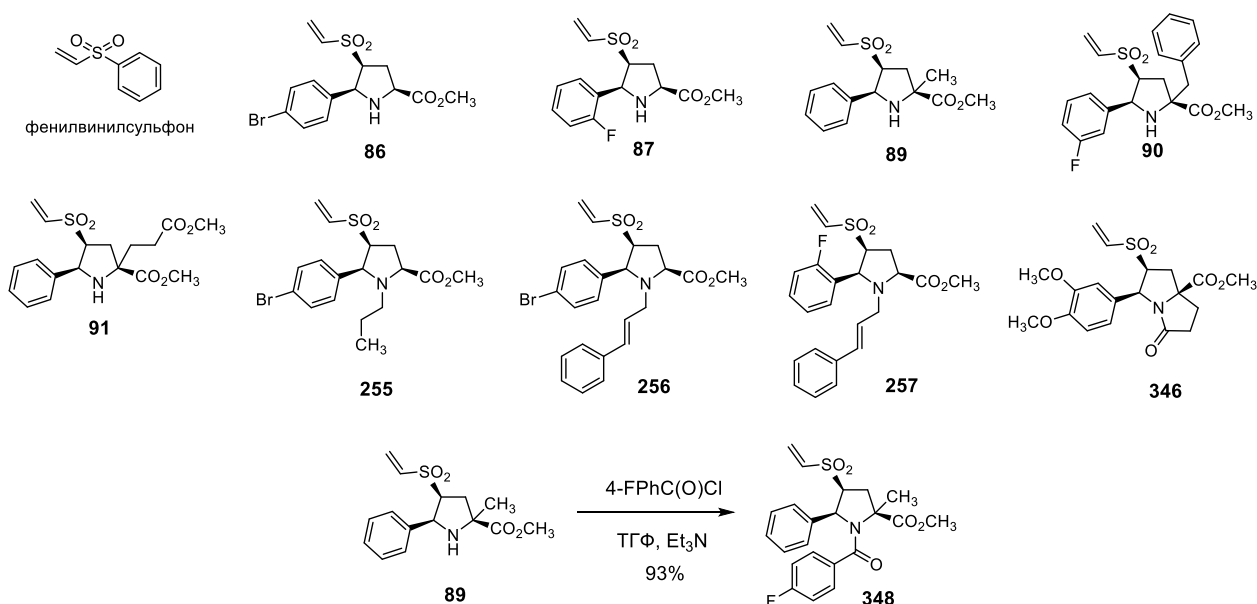
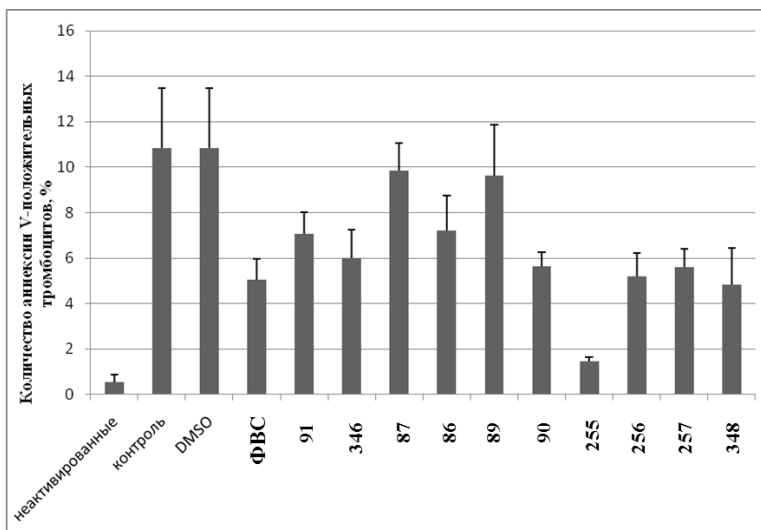


Схема 7.2

Исследованные ингибиторы добавлялись в концентрации, указанной в Таблице 7.1. Максимальным эффектом, при котором происходило уменьшение количества «укутанных» тромбоцитов в 10 раз по сравнению с контролем, обладает пирролидинилвинилсульфон **255**, который практически полностью нивелирует активирующее действие тромбина на тромбоциты. Биологическая активность исследованных винилсульфонов не связана или слабо связана с ингибированием тромбина, что показано исследованием ингибирования гидролиза тромбином специфического субстрата в присутствии изученных соединений (Таблица 7.1). На основании полученных результатов могут быть сделаны заключения о взаимосвязи «структура–активность» для данного нового класса соединений, сокращающих популяцию фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов. Во-первых, все соединения, содержащие винилсульфоновый фрагмент, обладают влиянием на экспонирование фосфатидилсерина тромбоцитами и данная активность, по-видимому, обусловлена именно этим структурным фрагментом. Во-вторых, гетероциклические рацемические винилсульфоны проявляют сопоставимую или пониженную активность по сравнению с фенилвинилсульфоном, за исключением соединения **255**.

Таблица 7.1. Слева: Концентрации соединений **86**, **87**, **89-91**, **255-257**, **346**, **348** и ФВС при тестировании и данные по ингибированию тромбина в буферном растворе. Справа: Влияние винилсульфонов на формирование «укутанных» тромбоцитов при активации 100 нМ тромбина. Представлены средние величины ± стандартная ошибка среднего (n=3).

Соединение	MW	c, ммоль/л <sup>a</sup>	c, мг/мл <sup>a</sup>	% I fIIa <sup>b</sup>
ФВС	168.22	0.594	0.100	15.2
<b>91</b>	381.45	0.163	0.062	9.1
<b>346</b>	409.46	0.049	0.020	-3.1
<b>87</b>	313.35	0.172	0.054	-3.9
<b>86</b>	374.26	0.096	0.036	-10
<b>89</b>	309.39	0.149	0.046	-0.9
<b>90</b>	403.48	0.099	0.040	-1.3
<b>255</b>	416.34	0.086	0.036	-6.5
<b>256</b>	490.42	0.159	0.078	20.4
<b>257</b>	429.51	0.112	0.048	7.5
<b>348</b>	431.49	0.102	0.044	-



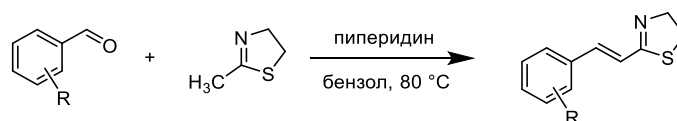
<sup>a</sup> Конечная концентрация соединения в пробе. <sup>b</sup> Ингибирование тромбина в буферном растворе при указанной концентрации соединения, %.



Присутствие небольшого по объему алкильного заместителя при эндоциклическом атоме азота в пирролидинилвинилсульфоне **255**, по-видимому, является необходимым структурным элементом для эффективного ингибирования активации тромбоцитов, так как незамещенный (**86**) и замещенный более объемным заместителем (**256**) структурные аналоги демонстрируют пониженную активность (Схема 7.2, Таблица 7.1). Для 4-винилсульфонил-5-Ar-2-ПКК **255**, **257** и **348** далее была изучена концентрационная зависимость биологической активности. Эффективные величины ингибирования прокоагулянтной активности тромбоцитов для наиболее активного пирролидинилвинилсульфона **255** находятся в микромолярном диапазоне концентраций ( $IC_{50}$  23  $\mu$ M;  $IC_{100}$  90  $\mu$ M). Принимая во внимание проведение обсуждаемых экспериментов по тестированию в буферном растворе, имитирующему плазму по ряду показателей, включая наличие альбумина, можно предполагать, что такие же эффекты в сопоставимых концентрациях соединений будут проявляться и в цельной крови.

Для проверки гипотезы о необходимости присутствия ненасыщенного электронодефицитного структурного фрагмента в потенциальных ингибиторах образования фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов были получены структурно отличающиеся от 5-Ar-2-ПКК пятичленные гетероциклические соединения, содержащие интернальную C=C связь – стирилтиазолины **349-357** (Таблица 7.2). Транс-замещенная олефиновая связь в полученных тиазолинах диагностируется большим значением КССВ (16 Гц) алкенильных протонов в области 6.5–7.5 м.д. в  $^1H$  ЯМР-спектрах. Наиболее активными ингибиторами прокоагулянтной активности тромбоцитов оказались 2- и 3-метилзамещенные стирилтиазолины **349** ( $IC_{50}$  28  $\mu$ M) и **350** ( $IC_{50}$  35  $\mu$ M), что сопоставимо с соответствующим значением для **255**.

Таблица 7.2. Синтез стирилтиазолинов **349-357** и их влияние на формирование «кутаных» тромбоцитов при активации 100 нМ тромбина и ферментативную активность тромбина.



R	Стирилтиазолин; выход, %	c, ммоль/л <sup>a</sup>	Аннексинположительные тромбоциты (в % от всех тромбоцитов) <sup>b</sup>	% I тромбина <sup>c</sup>
2-CH <sub>3</sub>	<b>349</b> ; 39	0.167	1.37	36.0±1.0
3-CH <sub>3</sub>	<b>350</b> ; 56	0.285	1.22	49.0±0.6
4-CH <sub>3</sub>	<b>351</b> ; 41	0.187	3.02	26.3±1.2
2,3-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>352</b> ; 43	0.230	1.65	33.0±1.0
2,6-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>353</b> ; 53	0.212	3.05	39.0±0.5
2-Cl	<b>354</b> ; 43	0.179	1.60	34.9±0.6
4-Cl	<b>355</b> ; 55	0.143	1.68	39.9±1.0
2,3-(Cl) <sub>2</sub>	<b>356</b> ; 53	0.217	1.82	3.2±1.0
2,4-(Cl) <sub>2</sub>	<b>357</b> ; 55	0.139	2.19	35.7±0.7

<sup>a</sup> Конечная концентрация соединения в пробе. <sup>b</sup> Содержание аннексинположительных тромбоцитов составляло: для неактивированных – 0.5%; в контроле – 3.8%. <sup>c</sup> Ингибирование тромбина в буферном растворе при указанной концентрации соединения, %.

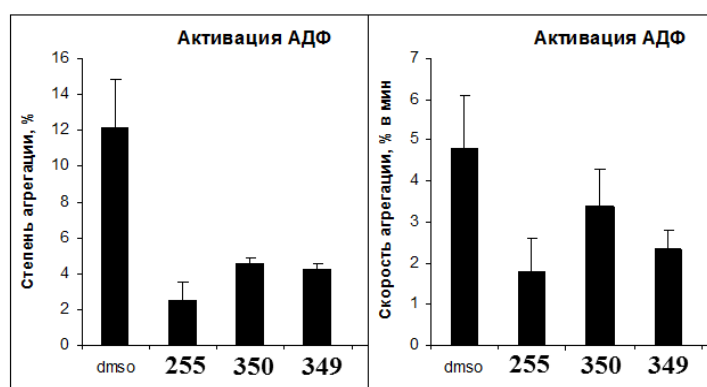
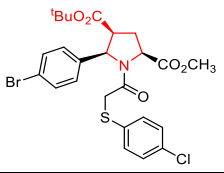
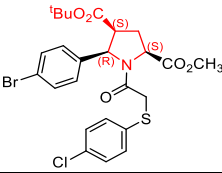
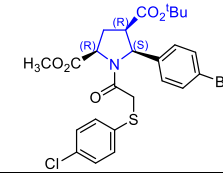
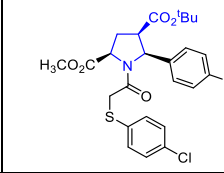


Рисунок 7.1. Степень и скорость агрегации тромбоцитов в присутствии соединений **255** (с 86  $\mu$ M), **349** (с 167  $\mu$ M) и **350** (с 285  $\mu$ M) при активации АДФ.

Однако в отличие от 4-винилсульфонил-5-Аг-2-ПКК **255**, стирилтиазолины **349** и **350** ингибируют тромбин, что может оказывать влияние на наблюдаемое снижение активации тромбоцитов (Таблица 7.2, колонка 5). Для всех трёх наиболее активных соединений проведено исследование влияния на агрегацию тромбоцитов при активации АДФ, которое установило наибольшую эффективность пирролидинилвинилсульфона **255**, снижающего степень агрегации в 6 раз и скорость агрегации в 3 раза по сравнению с контрольным экспериментом (Рисунок 7.1).

**Глава 8.** Приведены сведения об антитромботической терапии, рассмотрены сериновые протеазы коагуляционного каскада как валидированные биологические мишени для создания антикоагулянтных препаратов. Проанализированы физиологическая роль тромбина (фактора IIa, fIIa) и фактора Ха (fXa) и пространственное строение активных сайтов этих ферментов, сформулирована целесообразность разработки новых низкоосновных ингибиторов тромбина и фактора Ха. В качестве стабилизирующего и селективирующего взаимодействия потенциальных ингибиторов с активными сайтами сериновых протеаз изучено Cl–π взаимодействие между атомом хлора, входящим в состав низкомолекулярного лиганда, и Tyr228 в S1-кармане активных сайтов fIIa и fXa. На примере рацемических соединений **262**, **264** и **265**, продемонстрировавших ингибиторную активность по отношению к тромбину *in vitro*, показана применимость молекулярного каркаса 5-Аг-2-ПКК для конструирования новых ингибиторов fIIa. При помощи молекулярного моделирования с использованием различных протоколов докинга (AutoDock, AutoDock Vina, Fred) нами проведено теоретическое исследование соответствия структурных характеристик тромбина и трипсина, сериновой протеазы пищеварительной системы, и потенциальных ингибиторов сериновых протеаз, представляющих собой эфиры *N*-(2-(4-хлорфенилтио)ацетил)-5-арилпирролидин-2,4-дикарбоновых кислот.\* В качестве лигандов были исследованы энантиомеры (+)-**261** и (–)-**261** (Таблица 8.1).

Таблица 8.1. Значения параметров взаимодействия *N*-(2-(4-хлорфенилтио)ацетил)-5-арилпирролидин-2,4-дикарбоксилатов (+)-**261** и (–)-**261** с тромбином (PDB ID 2ZC9) и трипсином (PDB ID 1K1L), рассчитанные оценочными функциями AutoDock4.2 (AD), AutoDock Vina (ADV) и Fred Chemgauss3 (ChG3).

				
Соединение	<i>транс</i> -(+)- <b>261</b>	<i>цис</i> -(+)- <b>261</b>	<i>транс</i> -(–)- <b>261</b>	<i>цис</i> -(–)- <b>261</b>
	<i>E</i> , ккал/моль ( $K_i$ , $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	<i>E</i> , ккал/моль ( $K_i$ , $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	<i>E</i> , ккал/моль ( $K_i$ , $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	<i>E</i> , ккал/моль ( $K_i$ , $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>
AD <sub>тромбин</sub>	–6.31 (23.9)	–6.47 (18.0)	–6.34 (22.5)	–6.09 (34.6)
ADV <sub>тромбин</sub>	–7.50 (3.7)	–8.20 (1.0)	–8.10 (1.4)	–7.10 (7.3)
ChG3 <sub>тромбин</sub>	–65.56	–62.09	–70.82	–75.31
AD <sub>трипсин</sub>	–6.17 (30.1)	–6.29 (24.4)	–6.43 (19.3)	–6.86 (9.4)
ADV <sub>трипсин</sub>	–6.80 (12.0)	–6.40 (23.3)	–7.00 (8.6)	–6.80 (12.0)
ChG3 <sub>трипсин</sub>	–53.94	–38.19	–40.85	–39.63
AD <sub>селективность</sub> <sup>b</sup>	1.02 (1.27)	1.03 (1.36)	0.99 (0.86)	0.89 (0.27)
ADV <sub>селективность</sub> <sup>b</sup>	1.10 (3.24)	1.3 (23.3)	1.16 (6.14)	1.04 (1.64)
ChG3 <sub>селективность</sub> <sup>b</sup>	1.22	1.63	1.73	1.90

<sup>a</sup> Оценка  $K_i$  доступна для AutoDock и AutoDock Vina. Для Chemgauss3 энергия связывания безразмерна. <sup>b</sup> Селективность приведена как отношение энергий связывания (оценочных функций) тромбин/трипсин и в скобках, где это применимо,  $K_i(\text{трипсин})/K_i(\text{тромбин})$ .

При расчётах при помощи AutoDock и AutoDock Vina наиболее энергетически выгодное положение в активном сайте тромбина занимает конформер *цис*-(+)-**261** (Рисунок 8.1). Ключевыми лиганд-белковыми взаимодействиями являются: погружение 4-хлорфенилсульфанильного фрагмента в S1-карман тромбина, при котором расстояние между атомом хлора и плоскостью ароматического кольца Tyr228 составляет 4 Å, что должно обеспечивать Cl–π

\* Работы по молекулярному моделированию в Главе 8 выполнены в соавторстве с к.х.н. Д.А. Шульгой и к.х.н. В.И. Чупахиним (МГУ имени М.В.Ломоносова)

взаимодействие, и комплементарное заполнение S3/S4-кармана тромбина 5-(4-бромфенильным) заместителем пирролидинового кольца (AutoDock; Рисунок 8.1, *слева*); расположение *трет*-бутоксикарбонильной группы в S3/S4-кармане тромбина с возможным образованием водородной связи с ОН-группой Tyr60A и метоксикарбонильного заместителя в S2-кармане, что также может сопровождаться образованием водородной связи с Gly219 (AutoDock Vina; Рисунок 8.1, *справа*). Оба протокола докинга предсказывают энергетическое предпочтение взаимодействия лиганда *цис*-(+)-**261** с тромбином по сравнению с трипсином (Таблица 8.1). Рассчитанный посредством программного пакета Fred (Chemgauss3) и характеризующийся наибольшей устойчивостью комплекс *цис*-(–)-**261**/тромбин является в 1.5-2 раза более стабильным по сравнению с возможными комплексами трипсин/**261** (Таблица 8.1). Таким образом, *N*-(2-(4-хлорфенилтио)ацетил)-5-арилпирролидин-2,4-дикарбоксилаты **260-265** могут быть использованы в качестве стартовой точки для создания селективных низкоосновных ингибиторов фактора Па с дополнительной стабилизацией комплекса с тромбином до 2 ккал/моль благодаря С1–π взаимодействию в специфичном S1-кармане тромбина.

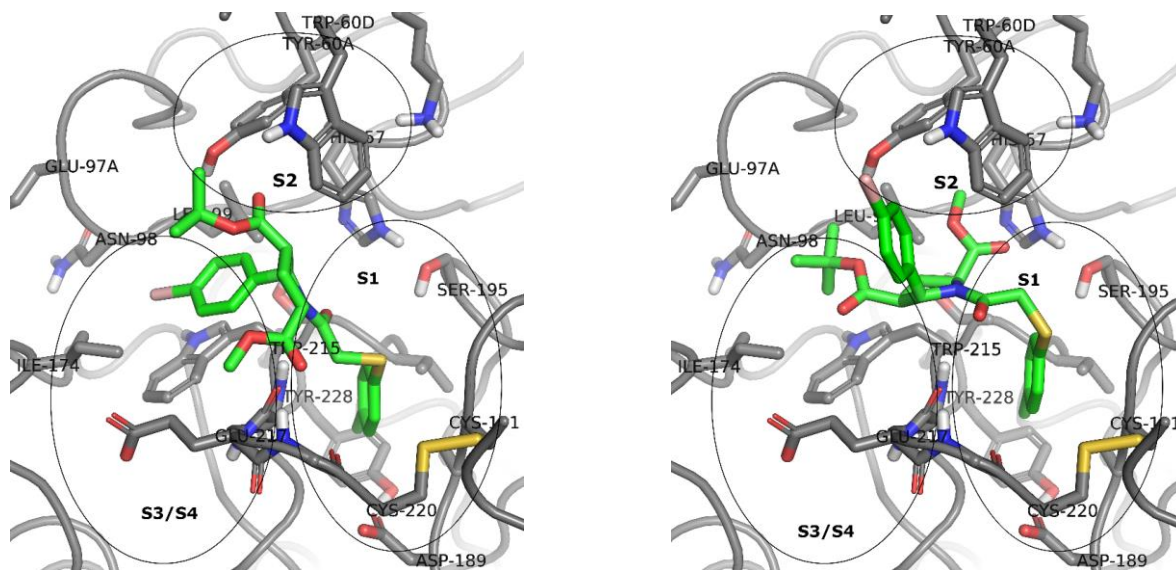
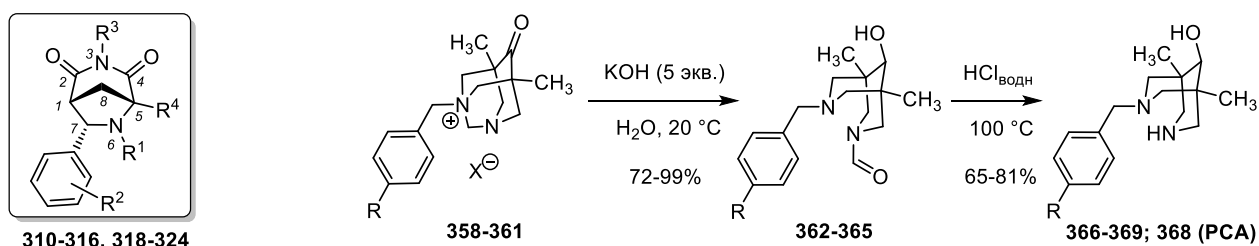


Рисунок 8.1. Наиболее энергетически выгодные расположения энантиомера *цис*-(+)-**261** (обозначен зелёным цветом) в активном сайте тромбина по данным докинга с использованием AutoDock4.2 (*слева*) и AutoDock Vina (*справа*).

Полученные для содержащих молекулярный каркас 5-Аг-2-ПКК соединений соотношения «структура/ингибирование сериновых протеаз» были дополнены исследованием 3,6-диазабицикло[3.2.1]октан-2,4-дионов, структура которых также включает фрагмент 5-арилпирролидин-2,4-дикарбоновой кислоты с зафиксированными имидной связкой карбоксильными функциями (Глава 5, Схема 5.1; Схема 8.1). Также были синтезированы диазаадамантоны и 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаны **358-369** с различными атомами галогена в бензильном фрагменте для изучения возможных галоген–π взаимодействий и сопоставления активности соединений с различными мостиковыми молекулярными каркасами (Схема 8.1).\*



R: H (358,362,366); F (359,363,367); Cl (360,364,368); Br (361,365,369).  
X: Cl (358,359,362,363,366,367); Br (360,361,364,365,368,369).

Схема 8.1

\* Выполнено в соавторстве с проф., д.х.н. С.З. Вацадзе и к.х.н. В.С. Семашко (МГУ имени М.В.Ломоносова)

Для молекулярного моделирования взаимодействия бициклических диазаоктанов и диазанонанов с сериновыми протеазами были использованы построенные ранее модели тромбина (PDB ID 2ZC9) и трипсина (PDB ID 1K1L) и протоколы докинга программных пакетов AutoDock и Fred. В случае 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанов **310-316**, **318-324**, содержащих три стереогенных центра, докировали оба энантиомера (1*R*,5*R*,7*S*) и (1*S*,5*S*,7*R*) (Таблица 8.2). Исследованные 3,6-диазабицикло[3.2.1]октаны характеризуются разнообразными величинами липофильности (сLogP 0.76 ÷ 4.56), молекулярных весов (230 ÷ 413 Da) и количеством неводородных атомов ( $N_{\text{heavy}}$ , 17 ÷ 28). Рассчитанные AutoDock свободные энергии связывания с тромбином для 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанов **310-316**, **318-324** лежат в диапазоне  $-4.5 \div -7.3$  ккал/моль (Таблица 8.2), со средним значением  $-5.8 \pm 0.8$  ккал/моль. Рассчитанные константы ингибирования тромбина  $K_i$  ( $AD_{\text{calc}}$ ) для изученных 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанов лежат в диапазоне 4–550  $\mu\text{M}$ , перекрывающимся с границами 1–20  $\mu\text{M}$  для соединений-хитов по ФПОЛ критериям, и взаимосвязаны с экспериментальными значениями  $IC_{50}(\text{fIIa})^*$  (Таблица 8.2, колонка 3) уравнением  $IC_{50} = 7.8 \cdot K_i (AD_{\text{calc}}) + 150$  ( $R^2 = 0.995$ ,  $s=130$ ). Введение атома галогена в 7-арильный заместитель 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанового молекулярного каркаса согласно результатам AutoDock докинга увеличивает устойчивость комплексов с тромбином, наиболее стабильный из которых формируется соединением **316** (Таблица 8.2).

Таблица 8.2. Рассчитанные значения параметров взаимодействия 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанов **310-316**, **318-324** с тромбином и трипсином и экспериментальное ингибирование тромбина в буферном растворе.

№ соединения	Max %I (с, $\mu\text{M}$ ); сLogP <sup>a</sup>	$IC_{50}$ (fIIa), $\mu\text{M} \setminus LE^b$	E ( $AD_{\text{calc}}$ ) <sup>c</sup> , ккал/моль (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ) \ (1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ) fIIa; трипсин	$K_i$ ( $AD_{\text{calc}}$ ) <sup>c</sup> , $\mu\text{M}$ (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ) \ (1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ) fIIa; трипсин	ChG3 <sub>calc</sub> <sup>d</sup> , (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ) \ (1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ) fIIa; трипсин
<b>310</b>	14 (2870); 1.891	–	–5.48 \ –5.44 –5.66 \ –6.13	97 \ 103 71 \ 32	–52.8 \ –66.1 –39.0 \ –41.9
<b>311</b>	80 (632); 3.839	300 \ 0.19	–6.79 \ –6.94 –6.12 \ –6.29	11 \ 8 32 \ 25	–53.5 \ –60.7 –44.5 \ –50.7
<b>312</b>	18 (8618); 0.760	–	–5.42 \ –5.72 –5.25 \ –6.18	107 \ 64 143 \ 30	–68.5 \ –62.6 –48.2 \ –40.9
<b>313</b>	93 (3032); 0.940	975 \ 0.21	–5.30 \ –5.31 –5.36 \ –5.43	131 \ 129 118 \ 105	–67.3 \ –63.8 –42.2 \ –50.1
<b>314</b>	7 (4777); 0.854	–	–5.54 \ –5.13 –5.24 \ –5.62	87 \ 173 143 \ 75	–56.2 \ –52.9 –41.8 \ –45.1
<b>315</b>	13 (5390); 1.272	–	–5.07 \ –4.98 –5.28 \ –5.80	192 \ 222 134 \ 56	–50.4 \ –58.0 –41.3 \ –40.6
<b>316</b>	37 (346); 4.003	–	–6.92 \ –7.22 –6.33 \ –6.49	9 \ 5 23 \ 18	–65.6 \ –58.8 –41.3 \ –50.0
<b>318</b>	6 (7244); 1.429	–	–6.07 \ –5.86 –5.71 \ –5.91	36 \ 51 65 \ 46	–57.8 \ –62.1 –45.2 \ –51.4
<b>319</b>	67 (406); 3.981	313 \ 0.18	–6.78 \ –6.43 –6.12 \ –6.38	11 \ 20 33 \ 21	–68.6 \ –53.4 –44.0 \ –51.8
<b>320</b>	75 (5549); 1.651	4358 \ 0.15	–4.47 \ –4.56 –4.69 \ –5.05	532 \ 453 363 \ 199	–44.4 \ –64.1 –46.7 \ –40.8
<b>321</b>	11 (4015); 2.541	–	–5.75 \ –5.20 –5.37 \ –5.31	61 \ 155 117 \ 129	–45.2 \ –54.2 –39.3 \ –42.6
<b>322</b>	14 (749); 3.615	–	–6.31 \ –6.46 –6.55 \ –6.36	24 \ 18 16 \ 22	–55.5 \ –58.4 –30.7 \ –36.4
<b>323</b>	37 (239); 3.463	–	–6.83 \ –5.97 –5.91 \ –6.01	10 \ 42 47 \ 39	–52.7 \ –59.8 –37.8 \ –43.0
<b>324</b>	38 (2934); 4.556	–	–7.32 \ –7.16 –6.55 \ –6.26	4 \ 6 16 \ 26	–74.3 \ –70.0 –43.7 \ –45.1

<sup>a</sup> рассчитано Instant JChem 5.9, 2012, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). <sup>b</sup> LE (ligand efficiency) =  $-RT \cdot \ln(IC_{50}) / N_{\text{heavy}}$ , T=300 K, R=1.986•10<sup>-3</sup> kcal/(mol•K). <sup>c</sup>  $AD_{\text{calc}}$  – рассчитано AutoDock. <sup>d</sup> ChG3<sub>calc</sub> – рассчитано ChemGauss3 (Fred).

\* Значения Max %I и  $IC_{50}$ (fIIa) в Таблицах 8.2 и 8.3 получены в соавторстве с проф., д.б.н. Ф.И. Атауллахановым и д.б.н. Е.И. Синаурдзе (ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава РФ)



Атомы брома в обоих энантиомерах 3,6-диазабицикло[3.2.1]октана **316** при наиболее низкоэнергетических способах связывания направлены на центр ароматического кольца Tyr228 и расположены на расстоянии 3.9-4.1 Å от соответствующей плоскости. Хлорзамещенный аналог **311** располагается в активном сайте похожим образом. Рассмотренные предположения хорошо соотносятся с субмиллимолярной ингибирующей активностью рацемических соединений **311** и **316** (Таблица 8.2).

Молекулярные веса изученных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов и их предшественников находятся в диапазоне от 260 до 367 Da, а количество неводородных атомов ( $N_{\text{heavy}}$ ) составляет от 19 до 22. Свободные энергии связывания с тромбином, рассчитанные AutoDock для мостиковых диазанонанов **358-369**, составляют  $-5.2 \div -6.4$  ккал/моль (Таблица 8.3), со средним значением  $-5.7 \pm 0.4$  ккал/моль. Рассчитанные константы ингибирования тромбина  $K_i$  ( $AD_{\text{calc}}$ ) для изученных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов лежат в диапазоне 20–166  $\mu\text{M}$ . Предпочтительные способы связывания 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-олов **363-365**, **367-369** характеризуются входением  $N^3$ -галогенбензильного фрагмента лигандов в S1-карман активного сайта тромбина. Атомы галогенов в *para*-положении  $W_p$ -заместителя в этих способах связывания расположены на расстоянии  $\sim 4$  Å над плоскостью ароматического кольца Tyr228, что указывает на возможность галоген- $\pi$  взаимодействия. Величины рассчитанных AutoDock энергий связывания возрастают в ряду  $F \ll Cl < Br$  (Таблица 8.3), что характерно для типичного галогенового взаимодействия.\* Экспериментально измеренные значения  $IC_{50}$ (fIIa) подчиняются соотношению:  $\log(1/IC_{50}) = -0.920(\text{CHO}) + 0.225(F) + 0.287(Cl) + 0.700(Br) + 3.453$  ( $N=7$ ,  $s=0.15$ ,  $R^2=0.932$ ). Рассчитанные AutoDock значения параметров взаимодействия 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанов **310-316**, **318-324** и диазаадамантанов и биспидинов **358-369** с трипсином (Таблицы 8.2 и 8.3) составляют  $-4.7 \div -6.6$  ккал/моль ( $K_i$  16  $\div$  360  $\mu\text{M}$ ) и  $-5.6 \div -6.8$  ккал/моль ( $K_i$  10  $\div$  80  $\mu\text{M}$ ), соответственно. Тенденция погружения галогенареновых фрагментов указанных соединений в S1-карман трипсина отсутствует. Результаты докинга при помощи Fred (ChemGauss3) предсказывают селективность взаимодействия с тромбином по сравнению с трипсином с индексом селективности, достигающим значения 2.

Таблица 8.3. Рассчитанные значения параметров взаимодействия диазаадамантиевых солей и *N*-бензил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов **358-369** с тромбином и трипсином и экспериментальное ингибирование тромбина в буферном растворе.

№ соединения	Max %I (с, $\mu\text{M}$ ); cLogP <sup>a</sup>	$IC_{50}$ (fIIa), $\mu\text{M}$ \ LE <sup>b</sup>	E ( $AD_{\text{calc}}$ ) <sup>c</sup> , ккал/моль fIIa \ трипсин	$K_i$ ( $AD_{\text{calc}}$ ) <sup>c</sup> , $\mu\text{M}$ fIIa \ трипсин	ChG3 <sub>calc</sub> <sup>d</sup> , fIIa \ трипсин
<b>358</b>	5 (3025); -1.462	–	-5.55 \ -5.73	86 \ 63	-61.7 \ -48.1
<b>359</b>	1 (3275); -1.320	–	-5.67 \ -6.09	70 \ 35	-62.0 \ -49.9
<b>360</b>	30 (2800); -0.858	–	-6.15 \ -6.33	31 \ 23	-56.1 \ -43.5
<b>361</b>	12 (8900); -0.694	–	-6.40 \ -6.29	20 \ 25	-58.6 \ -41.8
<b>362</b>	5 (1040); 1.020	–	-5.21 \ -5.92	153 \ 46	-64.1 \ -48.2
<b>363</b>	7 (1848); 1.163	–	-5.47 \ -6.05	98 \ 37	-55.8 \ -48.6
<b>364</b>	–; 1.624	–	-5.92 \ -6.48	46 \ 18	-53.4 \ -36.5
<b>365</b>	11 (1088); 1.789	–	-6.11 \ -6.39	33 \ 21	-58.6 \ -39.0
<b>366</b>	91 (8150); 1.459	2600 \ 0.19	-5.35 \ -5.61	120 \ 77	-63.5 \ -45.0
<b>367</b>	50 (1668); 1.601	1670 \ 0.19	-5.32 \ -5.86	125 \ 51	-67.8 \ -48.0
<b>368</b>	55 (2160); 2.063	2080 \ 0.18	-5.77 \ -6.37	59 \ 22	-64.8 \ -44.2
<b>369</b>	75 (1368); 2.228	900 \ 0.21	-6.01 \ -5.83	39 \ 54	-63.1 \ -39.7

<sup>a</sup> рассчитано Instant JChem 5.9, 2012, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). <sup>b</sup> LE (ligand efficiency) =  $-RT \cdot \ln(IC_{50}) / N_{\text{heavy}}$ , T=300K, R=1.986 $\cdot 10^{-3}$  kcal/(mol $\cdot$ K). <sup>c</sup>  $AD_{\text{calc}}$  – рассчитано AutoDock. <sup>d</sup> ChG3<sub>calc</sub> – рассчитано ChemGauss3 (Fred).

Таким образом, рассматриваемые мостиковые молекулярные каркасы могут быть использованы для дизайна новых потенциальных антикоагулянтов, так как в случае реализации галоген- $\pi$  взаимодействий с S1-карманом фактора Па, не учитываемых в традиционных протоколах докинга, будут увеличиваться аффинность и селективность разрабатываемых соединений к тромбину по сравнению с трипсином. Физико-химические характеристики всех

\* P. Metrangolo, H. Neukirch, T. Pilati, G. Resnati. *Acc. Chem. Res.*, **2005**, Vol. 38, No 5, pp. 386-395.

рассмотренных мостиковых гетероциклических соединений соответствуют «правилу пяти»<sup>\*</sup> Липински, что позиционирует их в лекарствовподобной (drug-like) области химического пространства. Кроме того, 7-арил-3,6-диазабицикло[3.2.1]октан-2,4-дионы **310**, **312-315**, **318**, **320**, **321** и *N*-бензил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-олы **362**, **366-368** соответствуют «правилу трёх»<sup>†</sup>, что позволяет планировать методы ФПОЛ для разработки новых ингибиторов на их основе. Соединения 3,6-диазабицикло[3.2.1]октан-2,4-дионового ряда также могут быть получены в энантимерно чистых формах, экспериментальное исследование биологических свойств которых является перспективным подходом к разработке более эффективных ингибиторов сериновых протеаз.

Для рассмотренных в настоящей Главе соединений с установленной *in vitro* ингибирующей активностью по отношению к тромбину методы молекулярного моделирования предсказывают взаимодействия лишь с избранными регионами активного сайта тромбина, что обосновывает необходимость применения относительно высокой концентрации этих соединений для достижения ингибиторного эффекта. Во многих случаях наличие галогенареновых фрагментов в структуре низкомолекулярных лигандов способствует проявлению целевой ингибирующей активности, что может быть связано с взаимодействием соответствующим образом ориентированного галогенсодержащего заместителя с S1-карманом активного сайта тромбина. Ранее мы соединили структурный фрагмент 2-(4-хлорбензамидо)-тиазола с молекулярным каркасом октагидропирроло[3,4-*b*]пиррола (Глава 5, Схема 5.3) и получили соединения **331-335**, для которых можно предположить взаимодействия с несколькими карманами активных сайтов тромбина и фактора Ха. Проведённый AutoDock докинг (2*R*,3*S*,3*aR*,6*aS*)- и (2*S*,3*R*,3*aS*,6*aR*)-энантимерных форм 2-арилוקтагидропирроло[3,4-*b*]пиррол-3-карбоновых кислот **331-335**, содержащих в 5-ом положении бициклического молекулярного каркаса конъюгированный 2-(4-хлорбензамидо)тиазольный фрагмент, в активный сайт тромбина подтверждает предположения об образовании более стабильных комплексов лиганд/фермент по сравнению с другими производными 5-*Ar*-2-ПКК, рассмотренными в этой Главе. Рацемические 2-арилуктагидропирроло[3,4-*b*]пиррол-3-карбоновые кислоты **331-335** были исследованы на ингибирующую способность по отношению к тромбину, фактору Ха и трипсину, а также изучено влияние этих соединений на протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и тромбиновое время (ТВ) (Таблица 8.4).<sup>‡</sup> Все изученные соединения эффективно ингибируют обе ключевые сериновые протеазы коагуляционного каскада – тромбин и фактор Ха, но не ингибируют или слабо ингибируют ферментативную активность трипсина (Таблица 8.4). Кроме этого, соединения **331-335** увеличивают время образования сгустка в плазме крови крыс при добавлении тромбина (ТВ) в 2-4 раза по сравнению с контрольным экспериментом (Таблица 8.4, последняя колонка), что указывает на антикоагулянтную активность изученных соединений. При добавлении в плазму рассматриваемых полициклических производных 5-*Ar*-2-ПКК также происходит увеличение ПВ и АЧТВ, но выраженное в значительно меньшей степени, чем увеличение ТВ.

Таблица 8.4. Влияние рацемических 2-арилуктагидропирроло[3,4-*b*]пиррол-3-карбоновых кислот **331-335** на скорость расщепления хромогенного/флюорогенного субстрата сериновыми протеазами и ТВ.

Соединение	Тромбин		Фактор Ха		Трипсин	Увеличение ТВ при с 200 мМ, %
	%I при с 25 мМ	IC <sub>50</sub> , мМ	%I при с 25 мМ	IC <sub>50</sub> , мМ	%I при с 25 мМ	
<b>331</b>	49.0 ± 9.7	30.2 ± 5.0	71.3 ± 5.7	11.5 ± 3.3	2.5 ± 0.8	264.1 ± 9.8
<b>332</b>	70.1 ± 1.8	10.5 ± 0.8	96.8 ± 3.3	3.3 ± 1.2	10.8 ± 9.9	433.7 ± 22.5
<b>333</b>	47.5 ± 5.5	≥ 25	95.8 ± 3.6	3.2 ± 1.2	0	172.3 ± 15.1
<b>334</b>	51.7 ± 3.5	27.5 ± 7.0	74.7 ± 2.7	6.3 ± 1.2	3.9 ± 2.1	243.4 ± 19.5
<b>335</b>	73.4 ± 11.7	9.1 ± 0.2	92.6 ± 2.0	4.0 ± 0.7	0	321.0 ± 6.6

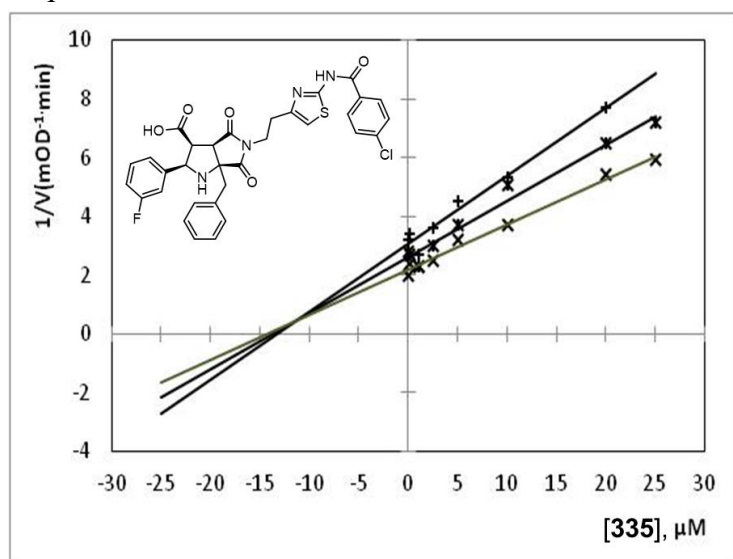
\* C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1997**, Vol. 23, No 1-3, pp. 3-25.

† M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. Jhoti. *Drug Discov. Today*, **2003**, Vol. 8, No 19, pp. 876-877.

‡ Выполнено в соавторстве с к.х.н. Е.Ф. Шевцовой (ИФАВ РАН)

Для получения сведений о механизме ингибирования сериновых протеаз 2-арилоктагидропирроло[3,4-*b*]пиррол-3-карбоновыми кислотами **331-335** была изучена кинетика соответствующих процессов (Таблица 8.5). Линейно-регрессионный анализ кинетических данных ингибирования ферментативной активности тромбина, представленных в координатах Диксона, позволяет рассчитать константы ингибирования  $K_i(f\Pi a)$ , а пересечение прямых над осью абсцисс свидетельствует о конкурентном характере ингибирования (Таблица 8.5, на примере соединения **335**). В случае фактора Ха механизм ингибирования носит более сложный характер, константы ингибирования  $K_i(fXa)$  были оценены для участка концентраций 0.1–10 мкМ и находятся в низком микромолярном и субмикромолярном диапазоне.

Таблица 8.5. Слева: кинетические кривые ингибирования тромбина соединением **335** в координатах Диксона. Справа: экспериментальные константы ингибирования сериновых протеаз коагуляционного каскада рацемическими 2-арилоктагидропирроло[3,4-*b*]пиррол-3-карбоновыми кислотами **331-335**.



соединение	$K_i(f\Pi a)$ , $\mu\text{M}$	$K_i(fXa)$ , $\mu\text{M}$
<b>331</b>	$7.8 \pm 0.4$	$0.8 \pm 0.5$
<b>332</b>	$0.9 \pm 0.2$	$1.5 \pm 0.6$
<b>333</b>	$4.4 \pm 2.7$	$1.6 \pm 0.5$
<b>334</b>	$3.1 \pm 0.4$	$2.5 \pm 1.1$
<b>335</b>	$11.3 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.1$

**Глава 9.** Сопоставлены взаимосвязи окислительно-восстановительных процессов, протекающих в клетках, с патологиями организма, в частности с язвенной болезнью желудка. Рассмотрены существующие лекарственные методы терапии язвенной патологии, определено снижение перекисного окисления липидов (ПОЛ) как возможное направление профилактики и лечения. Проведено экспериментальное исследование ПОЛ в гомогенатах мозга крыс, индуцированное экзогенными окислителями, в присутствии производных 5-Ar-2-ПКК **121**, **125-131**, содержащих структурный фрагмент пространственно-затруднённого фенола (Схемы 2.16 и 2.17; Таблица 9.1).<sup>\*</sup> Полученные данные демонстрируют значительную антиоксидантную активность бициклических пирролидинов **125-131**, причём эта активность зависит от заместителя (Ar) при удалённом от фенольного фрагмента имидном атоме азота (Таблица 9.1).

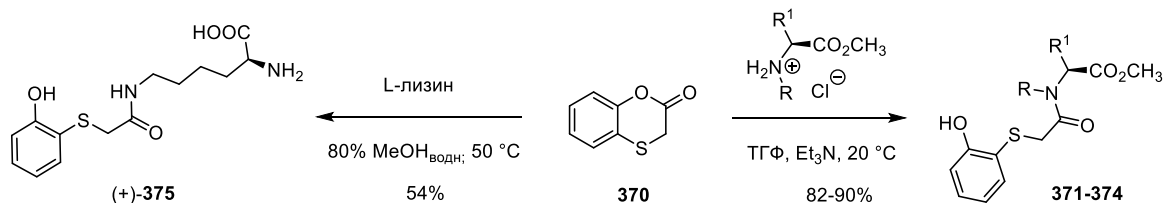
Таблица 9.1. Влияние рацемических соединений **121**, **125-131**, содержащих структурный фрагмент 5-Ar-2-ПКК, на ПОЛ в гомогенатах мозга крыс, вызванное  $\text{Fe}^{3+}$  и *t*-BuOOH.

Соединение	$\text{Fe}^{3+}$ -ПОЛ, $\text{IC}_{50}$ , мкМ	% <i>I</i> ПОЛ ( <i>t</i> - BuOOH), с 100 $\mu\text{M}$	Соединение	$\text{Fe}^{3+}$ -ПОЛ, $\text{IC}_{50}$ , мкМ	% <i>I</i> ПОЛ ( <i>t</i> - BuOOH), с 100 $\mu\text{M}$
<b>121</b>	$61 \pm 16$	н.о.*	<b>128</b> (2,6-( $\text{CH}_3$ ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> )	$1.43 \pm 0.74$	$52.8 \pm 1.3$
<b>125</b> (Ph)	$0.49 \pm 0.14$	$33.6 \pm 5.3$	<b>129</b> (2,3,5,6-(F) <sub>4</sub> C <sub>6</sub> H)	$0.19 \pm 0.02$	н.о.*
<b>126</b> (4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )	$0.23 \pm 0.02$	$39.3 \pm 6.5$	<b>130</b> (1-нафтил)	$0.18 \pm 0.07$	$48.7 \pm 2.4$
<b>127</b> (4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )	$0.76 \pm 0.15$	$33.3 \pm 1.0$	<b>131</b> (2-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )	$0.23 \pm 0.06$	$44.9 \pm 7.6$

Для изучения влияния природы фенольного заместителя на антиоксидантные свойства и возможную биологическую активность были синтезированы производные протеиногенных

\* Выполнено в соавторстве с к.х.н. Е.Ф. Шевцовой (ИФАВ РАН)

$\alpha$ -аминокислот **371-375**, у которых в *орто*-положении к фенольной группе располагается сульфанильный заместитель (Схема 9.1).\*



**R:** H ((-)-**371**,(-)-**373**,(+)-**374**). **R<sup>1</sup>:** *t*Bu ((-)-**371**); CH<sub>3</sub> ((-)-**373**); CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub> ((+)-**374**). **R, R<sup>1</sup>:** -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- ((-)-**372**).  
Схема 9.1

Производное 5-Аг-2-ПКК **129**, содержащее фрагмент пространственно-затруднённого фенола, N-((2-гидроксифенил)тио)ацетильные производные  $\alpha$ -аминокислот (-)-**372**, (+)-**375** и рацемический дипептид **111** (Схема 2.12) были исследованы в качестве потенциальных гастропротективных агентов на стрессорной модели язвенной болезни желудка *in vivo*. Лабораторным белым крысам за 30 минут до иммобилизации внутрибрюшинно вводили растворы указанных соединений в дозе 1 мг/кг.<sup>†</sup> Далее их иммобилизовали в перфорированные металлические трубки и вертикально помещали по уровень шеи крыс на 3 часа в водяную баню с температурой воды 22–23 °С. После этого животных умертвляли, извлекали желудки, исследовали площадь язв, длину эрозий и кровотечения в слизистой оболочке желудка (СОЖ). В СОЖ крыс стресс-контрольной группы животных II водоиммерсионный стресс вызывает развитие язв средней площадью 12.3±2.1 мм<sup>2</sup> (Рисунок 9.1). Профилактическое введение животным дипептидомиметика **111** увеличивает площадь язв на 117% (p<0.05) по сравнению с группой II. Инъекция растворов соединений **129**, (+)-**375**, (-)-**372** до применения стресса уменьшает площадь язв в СОЖ на 62% (p<0.05), 74% (p<0.01) и 86% (p<0.001) по сравнению с группой II, соответственно (Рисунок 9.1). Таким образом, бициклический пирролидин **129** снижает площадь язвенных поражений в СОЖ крыс с 12.6 до 4.7 мм<sup>2</sup> (в 2.7 раза), производное лизина (+)-**375** – с 12.3 до 3.1 мм<sup>2</sup> (в 4 раза), пролиновое производное (-)-**372** – с 12.6 до 1.8 мм<sup>2</sup> (в 7 раз). Во всех трёх соединениях, обладающих гастропротективной активностью *in vivo*, присутствует фенольный фрагмент. Далее было изучено влияние наиболее эффективных соединений (+)-**375** и (-)-**372** на ПОЛ в тканях СОЖ лабораторных животных.

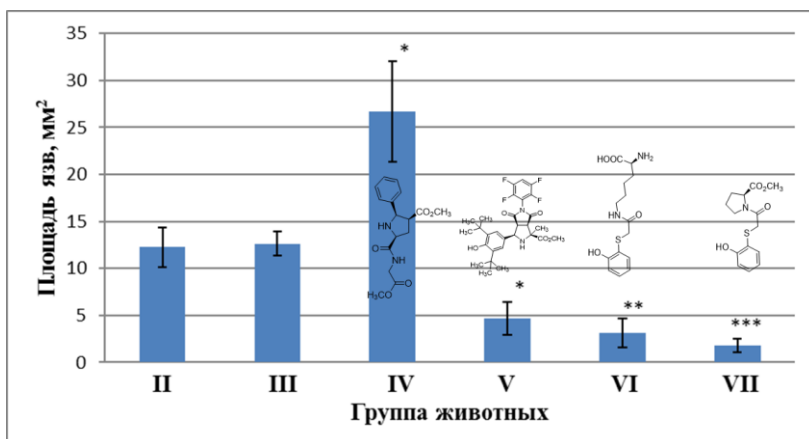


Рисунок 9.1. Профилактическое влияние соединений **111**, **129**, (-)-**372**, (+)-**375** (1 мг/кг, внутрибрюшинно) на площадь язвенных поражений СОЖ: II – стресс-контроль; III – стресс-контроль с введением ДМСО<sub>водн</sub>; IV – **111**; V – **129** в ДМСО<sub>водн</sub>; VI – (+)-**375**; VII – (-)-**372** в ДМСО<sub>водн</sub>. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

Развитие повреждений в СОЖ сопровождается интенсификацией

ПОЛ, что проявляется в увеличении содержания диеновых конъюгатов на 59% (p<0.01), ТВАРS на 139% (p<0.01), оснований Шиффа на 59% (p<0.01) в стресс-контрольной группе II по сравнению с группой интактного контроля I (Таблица 9.2). При предварительном введении 2-((2-гидроксифенил)тио)ацетамидов (+)-**375** и (-)-**372** наблюдается снижение содержания всех компонентов ПОЛ в гомогенатах СОЖ, что указывает на защитное действие этих соединений (Таблица 9.2, группы животных VI и VII соответственно). Изучение ферментной активности в стресс-контрольной группе II указывает на увеличение активности каталазы на 86.1% (p<0.01),

\* Выполнено в соавторстве с к.х.н. В.П. Осиповой (Южный научный центр РАН)

<sup>†</sup> Результаты *in vivo* исследований противоязвенной активности соединений в Главе 9 получены в соавторстве с проф., д.б.н. Л.И. Остапченко, проф., д.б.н. Т.В. Береговой, д.б.н. Т.М. Фалалеевой (КНУ имени Тараса Шевченко, Киев, Украина)



уменьшение активностей супероксиддисмутазы (СОД) и ксантиноксидазы на 52.6% ( $p < 0.01$ ) и 38.3% ( $p < 0.01$ ) по сравнению с группой интактного контроля I, соответственно (Таблица 9.3). Активность СОД уменьшается в стресс-контрольных группах II и III на 53% ( $p < 0.01$ ) и 47% ( $p < 0.01$ ) по сравнению с группой интактного контроля I, соответственно (Таблица 9.3). Активность каталазы в стресс-контрольных группах II и III увеличивается на 86% ( $p < 0.01$ ) и 63% ( $p < 0.01$ ) по сравнению с группой интактного контроля I, соответственно (Таблица 9.3). По-видимому, эти данные указывают на более высокую эффективную концентрацию  $O_2^{\cdot-}$  из-за снижения активности СОД, что приводит к повышенной генерации  $H_2O_2$ , требующей в свою очередь выработки дополнительного количества каталазы у подвергнутых стрессу животных. Оба фактора должны вызывать повышенные окислительные повреждения тканей и последующее язвообразование в СОЖ.

Таблица 9.2. Влияние соединений (+)-**375** (группа VI) и (-)-**372** (группа VII) (1 мг/кг, 30 минут до стресса) на содержание продуктов ПОЛ в гомогенатах СОЖ крыс ( $n=6$ ,  $M \pm m$ ).

Группа животных	I	II	III	VI	VII
Диеновые конъюгаты (нмоль (мг белка) <sup>-1</sup> )	326.11 ± 25.78	518.33 ± 26.72**	465.56 ± 14.67**	443.89 ± 15.44***#	352.22 ± 27.17##
ТВАРС (нмоль (мг белка) <sup>-1</sup> )	69.4 ± 9.24	165.70 ± 12.25**	130.10 ± 10.26**	89.73 ± 6.55##	98.26 ± 8.87##
Основания Шиффа (ед. (мг белка) <sup>-1</sup> )	61.45 ± 4.68	97.53 ± 6.38**	92.17 ± 7.20**	75.17 ± 3.24#	90.67 ± 4.52*

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с группой интактного контроля I; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  по сравнению со стресс-контрольной группой II.

Таблица 9.3. Влияние соединений (+)-**375** (группа VI) и (-)-**372** (группа VII) (1 мг/кг, 30 минут до стресса) на активность антиоксидантных ферментов в гомогенатах СОЖ крыс ( $n=6$ ,  $M \pm m$ ).

Группа животных	I	II	III	VI	VII
СОД (ед. мин <sup>-1</sup> (мг белка) <sup>-1</sup> )	0.19 ± 0.01	0.09 ± 0.01**	0.10 ± 0.01**	0.13 ± 0.01***#	0.12 ± 0.01**
Каталаза (нмоль мин <sup>-1</sup> (мг белка) <sup>-1</sup> )	5.83 ± 0.66	10.85 ± 0.79**	9.48 ± 0.56**	7.89 ± 0.46#	8.50 ± 0.70**
Ксантин-оксидаза (нмоль мин <sup>-1</sup> (мг белка) <sup>-1</sup> )	70.00 ± 5.20	43.20 ± 2.60**	51.50 ± 2.50**	65.80 ± 2.10##	63.20 ± 2.40##

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с группой интактного контроля I; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  по сравнению со стресс-контрольной группой II.

Активность ксантиноксидазы, восстанавливающей молекулярный кислород до  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ , снижается в стресс-контрольных группах II и III на 38% ( $p < 0.01$ ) и 26% ( $p < 0.01$ ) по сравнению с группой интактного контроля I, соответственно (Таблица 9.3). Уменьшение активности ксантиноксидазы может частично обуславливать снижение активности СОД. Профилактическое введение 2-((2-гидроксифенил)тио)ацетамидов (+)-**375** и (-)-**372** (группы животных VI и VII соответственно) частично нормализует уровни активности всех рассмотренных ферментов. Активность СОД увеличивается в VI группе животных на 44% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с группой II (Таблица 9.3). Возрастание активности СОД в VII группе животных по сравнению с группой II является несущественным. Активность каталазы в группах животных VI и VII уменьшается на 27% ( $p < 0.05$ ) и 22% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с группой II, соответственно (Таблица 9.3). Активность ксантиноксидазы в обеих группах животных VI и VII возрастает на 52% ( $p < 0.05$ ) и 46% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с группой II, соответственно (Таблица 9.3).

Полученные результаты указывают на активацию защитных механизмов СОЖ у крыс под действием производных 5-Аг-2-ПКК, содержащих фрагмент пространственно-затруднённого фенола (рацемическое соединение **129**), и N-((2-гидроксифенил)тио)ацетильных производных  $\alpha$ -аминокислот (соединения (+)-**375** и (-)-**372**), однако оставляют открытым вопрос о биомакромолекулярной мишени, на которую воздействуют новые гастропротективные агенты. Целостность СОЖ поддерживается несколькими защитными механизмами,

включающими сохранение слизи-бикарбонатного барьера, секрецию факторов «трилистника», простагландинов, белков теплового шока, микроциркуляцию крови в эпителиальной ткани, непрерывное обновление эпителиальных клеток. Для эндогенного простагландина PGE<sub>2</sub> доказана эффективность при лечении язвенных поражений желудка лабораторных животных, вызванных стрессом, некротическими агентами и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами (НПВЛС). PGE<sub>2</sub> осуществляет свои физиологические функции путём связывания с семейством простагландиновых рецепторов EP, подразделяющихся на 4 подтипа EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, EP<sub>4</sub>. Фармакологические исследования указывают на участие простагландиновых EP рецепторов в различных гастропротективных механизмах, что обусловило рассмотрение этих рецепторов в нашей работе в качестве возможных биомолекулярных мишеней, взаимодействующих с соединениями **111**, **129**, (+)-**375**, (-)-**372**.

Пространственные структуры всех 4-х подтипов EP рецепторов были получены из моделей базы данных GPCRDB\* по GPCRs при помощи моделирования по гомологии с использованием следующих шаблонов: EP<sub>1</sub> – модель pe2r1\_human – PDB ID 3EML; EP<sub>2</sub> – модель pe2r2\_human – PDB ID 2VT4; EP<sub>3</sub> – модель pe2r3\_human – PDB ID 3EML; EP<sub>4</sub> – модель pe2r4\_human – PDB ID 2RH1. Валидацию моделей проводили визуальной проверкой относительного расположения трансмембранных доменов и петель, расположения аминокислотных остатков Leu304 (TM6), Arg302 (TM6) и Ser120 (TM3), участвующих в связывании лигандов и определяющих селективность, методом карт Рамачандрана. Далее мы осуществили моделирование взаимодействия известных лигандов простагландиновых EP рецепторов со всеми четырьмя подтипами EP<sub>1</sub>–EP<sub>4</sub> для определения способности полученных моделей и протоколов докинга ранжировать указанные соединения в соответствии с известной активностью. Программный пакет Fred (PLP) продемонстрировал наилучшую корреляцию расчётных и экспериментальных данных. С его использованием мы провели моделирование взаимодействия соединений **111**, **129**, (-)-**372** и (+)-**375**, для которых была изучена противовоспалительная активность *in vivo*, и простагландиновых EP рецепторов различных подтипов. Для рацемических производных 5-Ar-2-ПКК **111** и **129** изучали взаимодействие обеих энантиомерных форм этих соединений с EP<sub>1</sub>–EP<sub>4</sub> простагландиновыми рецепторами. Если предположить взаимосвязь физиологического действия соединений **111**, **129**, (-)-**372**, (+)-**375** и их влияния на EP рецепторы, то пептидомиметик **111** должен обладать антагонистическим действием на один или несколько подтипов EP рецепторов, что проявляется в его ульцерогенной активности, в то время как гастропротективные агенты могут оказывать агонистическое действие на EP рецепторы. Fred (PLP) предсказывает селективность взаимодействия (1S,3R,3aS,6aR)-**129**, (-)-**372** и (+)-**375** с EP<sub>3</sub> рецептором. Предсказываемые Fred (PLP) параметры взаимодействия гастропротективных соединений **129**, (+)-**375** и (-)-**372** с EP<sub>1</sub> рецептором, активацию которого связывают с основным защитным действием на СОЖ, соответствуют экспериментальному ряду снижения площади язвообразования при профилактическом введении указанных соединений лабораторным животным (Рисунок 9.1).

На рассмотренной водоиммерсионной модели язвообразования было дополнительно исследовано возможное профилактическое действие рацемического 4-винилсульфонил-5-Ar-2-ПКК **87** и 2-((2-гидроксифенил)тио)ацетамидов (-)-**371**, (-)-**373**, (+)-**374** (Рисунок 9.2). Стресс вызывал развитие язв со средней площадью 9.6±2.4 мм<sup>2</sup> в СОЖ крыс стресс-контрольной группы животных I (Рисунок 9.2). Профилактическое введение животным 5-Ar-2-ПКК **87** снижает площадь язв на 49% (p<0.05) в сравнении со стресс-контрольной группой II. В сравнении с группой I статистически значимых изменений площади язв в СОЖ при инъекции соединения **87** не наблюдалось. При профилактическом введении 2-((2-гидроксифенил)тио)-ацетамида (-)-**371** средняя площадь язв в СОЖ составляла 9.7±2.7 мм<sup>2</sup>, что соответствует уменьшению на 49% (p<0.05) в сравнении с группой II. Инъекция раствора соединения (-)-**373** за 30 минут до инициации стресса уменьшала среднюю площадь язв до 5.1±1.1 мм<sup>2</sup>, что на 47%

\* B. Vroling, M. Sanders, C. Baakman, A. Borrmann, S. Verhoeven, J. Klomp, L. Oliveira, J. de Vlieg, G. Vriend. *Nucleic Acids Res.*, **2011**, Vol. 39, Database iss., pp. D309-D319. Работы по молекулярному моделированию в Главе 9 выполнены в соавторстве с к.х.н. В.И. Чупахиним и к.х.н. Д.А. Шульгой (МГУ имени М.В.Ломоносова)

( $p < 0.05$ ) и на 72% ( $p < 0.001$ ) ниже, чем в группах крыс I и II, соответственно. Метиониновое производное (+)-**374** приводит к уменьшению площади язв до  $6.8 \pm 1.5 \text{ мм}^2$  при профилактическом введении, что на 29% ( $p < 0.05$ ) ниже в сравнении с группой II.

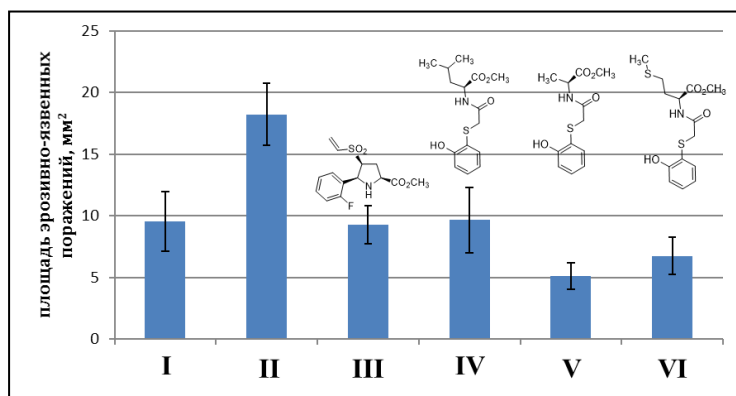
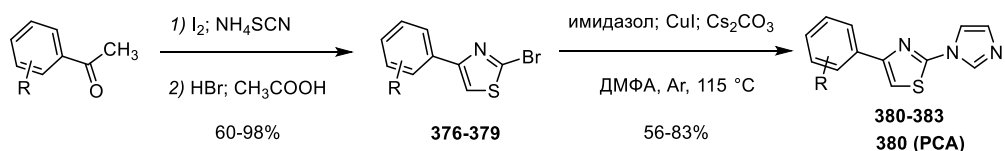


Рисунок 9.2. Профилактическое влияние соединений **87**, (-)-**371**, (-)-**373**, (+)-**374** (1 мг/кг, внутрибрюшинно) на площадь язвенных поражений СОЖ: I – стресс-контроль; II – стресс-контроль с введением ДМСО<sub>водн</sub>; III – **87** в ДМСО<sub>водн</sub>; IV – (-)-**371** в ДМСО<sub>водн</sub>; V – (-)-**373** в ДМСО<sub>водн</sub>; VI – (+)-**374** в ДМСО<sub>водн</sub>.

Далее было проведено *in vivo* исследование профилактического влияния низкомолекулярных агентов, содержащих структурные фрагменты 5-Ar-2-ПКК (соединения **87**, **129**) и 2-((2-гидроксифенил)тио)ацетамида (соединения (-)-**371**, (-)-**372**, (-)-**373**, (+)-**374**, (+)-**375**), на этаноловой, индометациновой и аспириновой моделях язвообразования в СОЖ, и установлена эффективность рацемического винилсульфонилпирролидина **87** и 2-((2-гидроксифенил)тио)ацетамидов (-)-**372** и (-)-**373** в снижении повреждений СОЖ, индуцируемых указанными язвотропными факторами. Помимо профилактического действия, в нашей работе установлено *in vivo* лечебное действие соединений (-)-**372** и (-)-**373** на сформированные язвенные повреждения СОЖ, вызванные стрессом, этанолом, индометацином, аспирином.

**Глава 10.** Приведены сведения о применяемых методах лекарственного лечения гормонорезистентного рака простаты, обсуждены противоопухолевые свойства гетероциклических аналогов нуклеозидов, специфические белок-белковые взаимодействия. В качестве объекта злокачественной опухолевой патологии для потенциального терапевтического воздействия в настоящей работе исследовали клеточные линии гормонорезистентного рака простаты.\* Изучена антипролиферативная активность рацемических производных 5-Ar-2-ПКК **100**, **110**, **266**, **270**, **281**, **290–295** по отношению к клеточной линии гормонорезистентного рака простаты РС-3. К целевой активности приводит модификация ПС 5-Ar-2-ПКК 2,6-дихлорпуринным фрагментом по 4-ому положению молекулярного каркаса с наилучшим показателем концентрации, замедляющей пролиферацию на 50%,  $GI_{50}$  3.9  $\mu\text{M}$  для соединения **292** (Схема 4.6). Для сопоставления влияния структурных характеристик соединений на антипролиферативную активность из 2-бромтиазолов **376–379** синтезированы новые имидазолилтиазолы **380–383** (Схема 10.1).



R: 3-CF<sub>3</sub> (**376,380**); 3-Br (**377,381**); 3-NO<sub>2</sub> (**378,382**); 4-CF<sub>3</sub> (**379,383**).

Схема 10.1

Исследование антипролиферативной активности полученных тиазолов **376–383** установило замедление деления клеток РС-3 под действием имидазолилтиазолов **380–383**, причём наиболее активным оказалось соединение **380** с  $GI_{50}$  1.7  $\mu\text{M}$ , что более чем в 2 раза превышает активность 4-((пурин-9-ил)метил)-5-Ar-2-ПКК **292**. Помимо ингибирования роста РС-3 клеточной линии, соединение **380** также оказывает замедляющее действие на другой тип клеток гормонорезистентного рака простаты DU145 ( $GI_{50}$  3.2  $\mu\text{M}$ , рисунок 10.1).

\* Результаты по антипролиферативному действию соединений и изучению механизмов биологической активности в Главе 10 получены в соавторстве с Prof. Jih-Hwa Guh (National Taiwan University, Taipei, Taiwan)

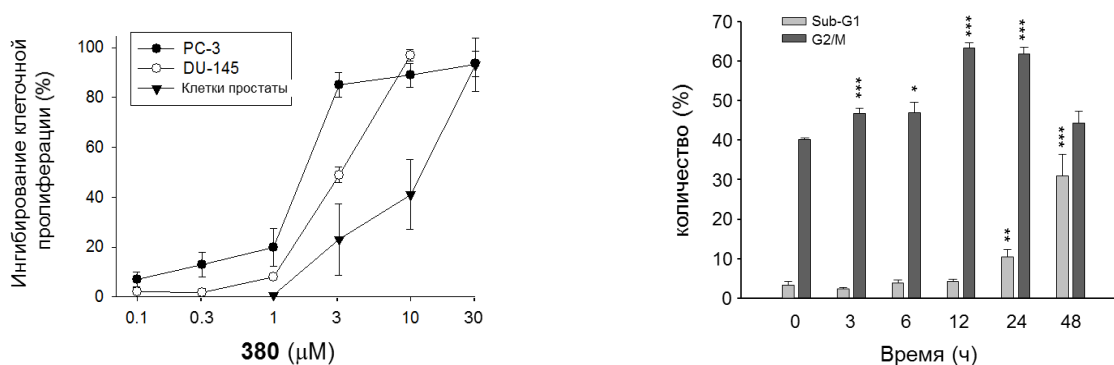


Рисунок 10.1. Слева: Концентрационная зависимость влияния соединения **380** на пролиферацию злокачественных клеточных линий PC-3 и DU145 и нормальных клеток простаты. Справа: Влияние соединения **380** на развитие PC-3 клеточного цикла и апоптоз. Представлены средние величины  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=3$ ). \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  и \*\*\*  $p<0.001$  по сравнению с контрольным временем «0».

В то же время его цитотоксическое действие на нормальные клетки простаты проявляется только при более высоких концентрациях ( $GI_{50}$  18.3  $\mu\text{M}$ ) (рисунок 10.1, слева). При развитии раковых заболеваний происходят многочисленные сбои в клеточном цикле, в результате чего повреждённые и мутантные клетки прогрессируют, накапливают мутации, неконтролируемо делятся. Различают фазы G1 (фаза роста), S (синтез ДНК), G2 (подготовка к митозу), M (митоз) и G0 клеточного цикла. Контрольные точки расположены между G1/S и G2/M фазами клеточного цикла, при прохождении которых экспрессируются циклинзависимые киназы (CDKs). При отклонении или неполноте необходимых в клеточном цикле событий, подаётся сигнал белкам-эффекторам, останавливающим дальнейшее развитие клеточного цикла. Таким образом, воздействие на механизмы развития клеточного цикла, приводящее к его остановке и последующему апоптозу злокачественной клетки, является современной стратегией создания противораковых лекарственных препаратов.\* Распределение клеток PC-3 по фазам клеточного цикла после действия антипролиферативного агента **380** было изучено при помощи проточного цитометрического анализа (рисунок 10.1, справа). Как следует из полученных результатов, под действием имидазолилтиазола **380** происходит задержка PC-3 клеточного цикла в G2/M контрольной точке и последующее возрастание популяции клеток в гиподиплоидной sub-G1 фазе, что приводит к апоптозу (рисунок 10.1, справа).

Наблюдаемый под действием **380** митотический блок PC-3 клеточного цикла связан с влиянием на динамику сборки микротрубочек или ингибированием киназы Аврора А. При изучении сборки микротрубочек было установлено, что фракция последних в форме микрочастиц уменьшается под действием имидазолилтиазола **380**. Соединение **380** индуцирует образование монополярных веретён деления в 12.7%, 37.8% и 51.7% случаев при концентрациях 3, 10 и 30  $\mu\text{M}$ , соответственно, что может вызываться недостаточной активностью киназы Аврора А. При помощи люминесцентного метода мы установили дозозависимое ингибирование киназы Аврора А под действием антипролиферативного агента **380** с  $IC_{50}$  30.0  $\mu\text{M}$ . Соединение **380** относится к новому структурному типу ингибиторов киназы Аврора-А, что позволяет рассматривать его в качестве соединения-хита для разработки более эффективных ингибиторов указанной биологической мишени при помощи методов молекулярного моделирования.† Первичные энергетически наиболее выгодные способы связывания имидазолилтиазола **380** с активным сайтом консенсусной модели киназы Аврора-А были определены при помощи докинга с использованием программного пакета Fred (Chemgauss4). Далее взаимодействия между имидазолилтиазолом **380** и киназой Аврора-А изучали при помощи молекулярной динамики (MD) (Рисунок 10.2).

\* S. Diaz-Moralli, M. Tarrado-Castellarnau, A. Miranda, M. Cascante. *Pharmacol. Ther.*, 2013, Vol. 138, No 2, pp. 255-271.

† Работы по молекулярному моделированию в Главе 10 выполнены в соавторстве с к.х.н. В.И. Чупахиним и к.х.н. Д.А. Шульгой (МГУ имени М.В.Ломоносова)

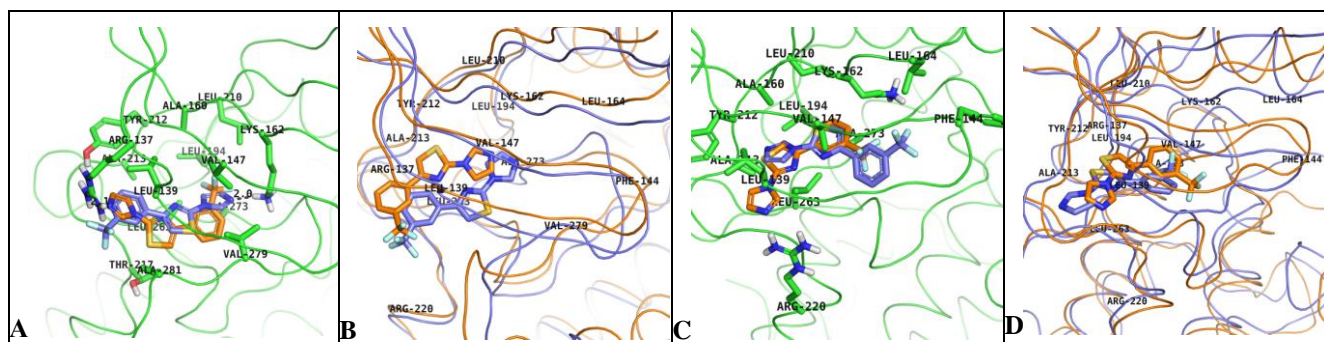


Рисунок 10.2. Взаимодействие имидазолпиримидина **380** с АТФ-связывающим сайтом киназы Аврора-А в конформациях DFG-in (PDB ID 3UNZ (A, B)) и DFG-out (PDB ID 3VAP (C, D)). Приведено расположение лиганда **380** до (A, C) и после (B, D) молекулярной динамики.

На основании объединённых данных исследований при помощи докинга, MD и визуального анализа имидазолпиримидин **380** способен взаимодействовать с АТФ-связывающим сайтом киназы Аврора-А в конформациях DFG-in и DFG-out. Наблюдается гидрофобная и пространственная комплементарность лиганда **380** и активного сайта в DFG-in форме с участком 210-214 аминокислотных остатков шарнирного региона в одном случае и с участком 277-282 аминокислотных остатков петельного региона при другом способе связывания. Взаимодействие **380** с АТФ-связывающим сайтом киназы Аврора-А в конформации DFG-out также обосновано гидрофобным и пространственным соответствием лиганда с шарнирным регионом белка. В одном из способов связывания формируется водородная связь Arg220/имидазольный фрагмент лиганда, а во втором наблюдается Ala273/CF<sub>3</sub>-Ph взаимодействие. Следовательно, имидазолпиримидин **380** может рассматриваться как основа для дизайна ингибиторов киназ I и II типов с возможной оптимизацией по активности и селективности.

В регуляции клеточного цикла неопластических клеток участвует большое количество белок-белковых взаимодействий (ББВ) между онкопротеинами, обеспечивающими неконтролируемое деление через специфические ББВ, что делает нейтрализацию таких взаимодействий привлекательной стратегией в терапии рака различной природы. \* Принимая во внимание представленные в Главе 3 данные по синтезу и изучению вторичной структуры нового класса функционализированных β-пептидов, мы предположили их возможное влияние на ББВ, определяющие выживаемость раковых клеток, и провели фенотипический скрининг полученных поли-β-пролинов (Таблицы 3.1 и 3.2) на клеточной линии рака простаты PC-3 (Таблица 10.1). Полученные результаты указывают на антипролиферативную активность ряда β-пролиновых олигомеров в нижнем микромолярном диапазоне концентраций, причём наиболее эффективными ингибиторами процесса деления клеток PC-3 оказались рацемические соединения **171**, **172** и **176** со значениями GI<sub>50</sub> 6.93, 0.73 и 3.17 μM, соответственно (Таблица 10.1). Все три соединения содержат структурный фрагмент акриламида, который вносит существенный вклад в наблюдаемую активность, так как олигомерные предшественники **169**, **170** и **174** до 15 раз менее активны (Таблица 10.1, Рисунок 10.3).

Таблица 10.1. Антипролиферативная активность β-пролиновых олигомеров и их акриламидов **167–182** по отношению к клеточной линии гормонорезистентного рака простаты PC-3.

Соединение	GI <sub>50</sub> , μM*	GI <sub>50</sub> , μM*	GI <sub>50</sub> , μM*
Акриламид мономера	<b>167</b> / –**	(–)- <b>167</b> / >30	<b>168</b> / 12.20 ± 1.29
β-Pro димер	<b>169</b> / >30	(–)- <b>169</b> / >30	<b>170</b> / 11.12 ± 1.64
Акриламид димера	<b>171</b> / 6.93 ± 0.21	(–)- <b>171</b> / 22.36 ± 0.48	<b>172</b> / 0.73 ± 0.02
β-Pro тример	<b>173</b> / >30	(+)- <b>173</b> / >30	<b>174</b> / 16.42 ± 2.24
Акриламид тримера	<b>175</b> / 13.30 ± 0.50	(+)- <b>175</b> / 12.86 ± 0.46	<b>176</b> / 3.17 ± 0.77
β-Pro тетрамер	<b>177</b> / 28.80 ± 2.48	(–)- <b>177</b> / 26.22 ± 0.65	<b>178</b> / >30
Акриламид тетрамера	–	(–)- <b>179</b> / 11.11 ± 0.31	<b>180</b> / 25.25 ± 1.46
β-Pro пентамер	–	(–)- <b>181</b> / >30	<b>182</b> / >30

\* Представлены средние величины ± стандартная ошибка среднего (n=3). \*\* Не определяли.

\* A.A. Ivanov, F.R. Khuri, H.Fu. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2013**, Vol. 34, No 7, pp. 393-400.



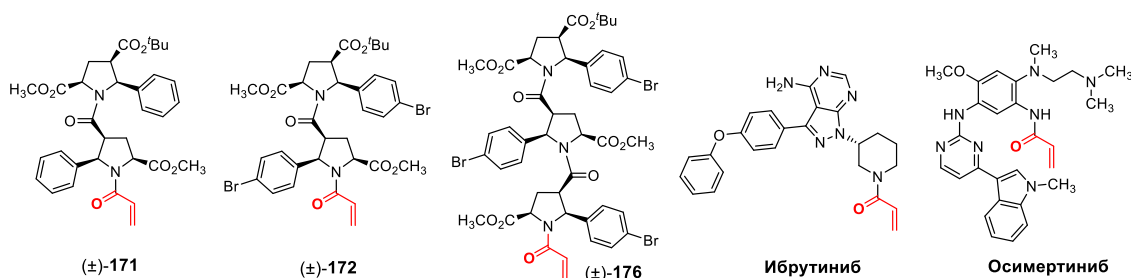


Рисунок 10.3. Структурные формулы рацемических акриламидов **171**, **172** и **176**, ингибирующих пролиферацию РС-3 клеток, и противораковых препаратов Ибрутиниб и Осимертиниб.

Существуют определённые опасения по поводу ненасыщенного акриламидного фрагмента в структуре разрабатываемых соединений-лидеров, однако противоопухолевые препараты Ибрутиниб, ингибитор тирозинкиназы Брутона, и Осимертиниб, ингибитор 3-его поколения тирозинкиназы EGFR, содержащие акриламидный структурный фрагмент (Рисунок 10.3), одобрены FDA для терапии В-лимфопролиферативных заболеваний и метастазирующего немелкоклеточного рака лёгких, соответственно. Также, как следует из полученных нами данных, акриламиды  $\beta$ -пролиновых мономеров и тетрамеров менее активны по сравнению с ди- и тримерными аналогами, что указывает на избирательность взаимодействий (Таблица 10.1). Таким образом, акриламиды **171**, **172** и **176** могут рассматриваться как соединения-лидеры и были подвергнуты детальному исследованию по установлению возможного механизма антипролиферативного действия.

Все три соединения блокируют развитие клеточного цикла в G1 фазе. При помощи вестерн-блоттинга было исследовано влияние соединений **171**, **172** и **176** на экспрессию различных протеинов в клетках РС-3, для чего клетки инкубировались с антипролиферативными агентами в течение 24 ч, затем лизировались, и лизаты анализировались на специфические компоненты (Рисунок 10.4). Акриламиды **171** и **176** вызывают снижение экспрессии циклина E, что указывает на стимулирование блокирования клеточного цикла в поздней G1 фазе. Димерный акриламид **172** подавляет экспрессию как циклина E, так и циклина D1, что свидетельствует о более раннем этапе блокировки G1 фазы клеточного цикла. Кроме этого, бромсодержащие акриламиды **172** и **176** индуцируют активацию каспазы-8 и каспазы-9, двух инициаторных каспаз внешних и внутренних сигнальных путей апоптоза, а также активацию эффекторной каспазы-3 (Рисунок 10.4). Расщепление PARP-1, субстрата каспазы-3, также подтверждает каспазо-зависимый апоптоз РС-3 клеток под действием соединений **172** и **176** (Рисунок 10.4).

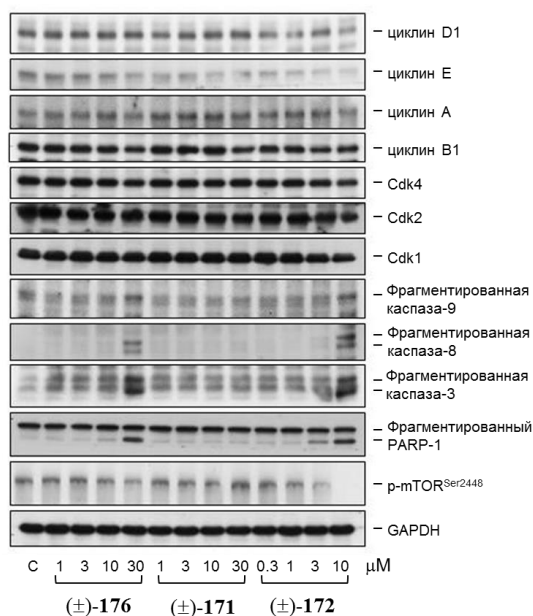


Рисунок 10.4. Влияние рацемических соединений **171**, **172** и **176** на экспрессию белков в клетках РС-3.

Детектирование фосфорилирования аминокислотного остатка Ser2448, общепризнанного сайта активации mTOR киназы, выявило значительное ингибирование активации mTOR при действии бромсодержащих акриламидов **172** и **176**, причём ингибиторный эффект первого из них более выражен (Рисунок 10.4). Для наиболее активного соединения **172** также установлено ингибирование фосфорилирования киназы Akt по аминокислотному остатку Ser473, что в свою очередь указывает на ингибирование активности фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). В целом, эти результаты указывают на блокирование сигнального пути PI3K/Akt/mTOR как один из механизмов антипролиферативного действия бромсодержащего акриламида **172**. Для установления



роли митохондрий в антипролиферативной активности бромсодержащего акриламида **172** мы исследовали мембранный потенциал митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ) при помощи окрашивания реагентом JC-1. Под действием антипролиферативного агента **172** происходит увеличение образования мономеров JC-1, указывающее на повреждение митохондрий и апоптоз из-за потери  $\Delta\Psi_m$ .

Для получения дополнительных данных о взаимосвязи структуры поли- $\beta$ -пролинов и их цитотоксических свойств была изучена антипролиферативная активность олигомеров, имеющих ментилловый заместитель на C-конце молекулы (Таблицы 3.3 и 3.4; Схема 3.3). Наиболее активными соединениями в этой серии, подавляющими пролиферацию PC-3 клеток в нижнем микромолярном диапазоне концентраций, оказались димерный акриламид (+)-**202** ( $GI_{50}$  1.7  $\mu M$ ), тетрамерные акриламиды (+)-**213** ( $GI_{50}$  1.9  $\mu M$ ) и (-)-**229** ( $GI_{50}$  2.9  $\mu M$ ), и пентамерные акриламиды (-)-**219** ( $GI_{50}$  2.9  $\mu M$ ) и (+)-**231** ( $GI_{50}$  1.8  $\mu M$ ) (Таблица 10.2). Две последние пары соединений являются зеркальными антиподами.

Таблица 10.2. Антипролиферативная активность ментилсодержащих  $\beta$ -пролиновых олигомеров и их акриламидов **186**, **195**, **196**, **200–322** по отношению к клеточной линии PC-3.

Соединение	L-a серия / $GI_{50}$ , $\mu M$	L-b серия / $GI_{50}$ , $\mu M$	L-c серия / $GI_{50}$ , $\mu M$	D-a серия / $GI_{50}$ , $\mu M$
$\beta$ -Pro димер	(-)- <b>195</b> / 6.3	(+)- <b>196</b> / 7.4	(-)- <b>200</b> / 6.9	(+)- <b>186</b> / 10.2
Акриламид димера	(+)- <b>201</b> / 4.8	(+)- <b>202</b> / 1.7	(+)- <b>203</b> / 3.4	(-)- <b>225</b> / 4.1
$\beta$ -Pro тример	(-)- <b>204</b> / 6.4	(-)- <b>205</b> / >30.0	(-)- <b>206</b> / >30.0	(+)- <b>226</b> / 4.4
Акриламид тримера	(-)- <b>207</b> / 3.4	(-)- <b>208</b> / >30.0	(-)- <b>209</b> / 17.7	(+)- <b>227</b> / 3.0
$\beta$ -Pro тетрамер	(-)- <b>210</b> / 9.1	(+)- <b>211</b> / >30.0	(-)- <b>212</b> / >30.0	(+)- <b>228</b> / >30.0
Акриламид тетрамера	(+)- <b>213</b> / 1.9	(-)- <b>214</b> / 14.6	(-)- <b>215</b> / >30.0	(-)- <b>229</b> / 2.9
$\beta$ -Pro пентамер	(-)- <b>216</b> / 6.6	(-)- <b>217</b> / >30.0	(-)- <b>218</b> / 19.5	(+)- <b>230</b> / 25.6
Акриламид пентамера	(-)- <b>219</b> / 2.9	(-)- <b>220</b> / >30.0	(-)- <b>221</b> / >30.0	(+)- <b>231</b> / 1.8
$\beta$ -Pro гексамер	(-)- <b>222</b> / >30.0	(+)- <b>223</b> / >30.0	(-)- <b>224</b> / 15.2	(+)- <b>232</b> / >30.0

Таким образом, в общей сложности 55 олигомерных соединений, молекулярный каркас которых состоит из чередующихся звеньев 5-Ar-2-ПКК противоположной хиральности, были исследованы на антипролиферативную активность по отношению к PC-3 клеткам гормонорезистентного рака простаты (Таблицы 10.1 и 10.2). Как следует из полученных данных по влиянию новых соединений  $\beta$ -пептидной природы на митоз гормонорезистентной клеточной линии PC-3, представляющая интерес биологическая активность зависит от длины олигомерной цепи, абсолютной конфигурации стереогенных центров, заместителей на N- и C-концах  $\beta$ -пептида, а также заместителей в периферических арильных и карбоксильных фрагментах (Таблицы 10.1 и 10.2). Наибольшей активностью среди изученных соединений характеризуется рацемический *S*-*tert*-бутилзамещённый бромсодержащий димерный акриламид **172** (Таблица 10.1). Руководствуясь его изученным механизмом антипролиферативного действия и принципами «изменения хиральности», мы синтезировали оба энантиомерно чистых димерных акриламида (+)-**172** и (-)-**172** из энантиомерно чистых предшественников (+)-**170** и (-)-**170**, соответственно, для установления влияния абсолютной конфигурации на целевую биологическую активность и механизм действия (Схема 10.1).

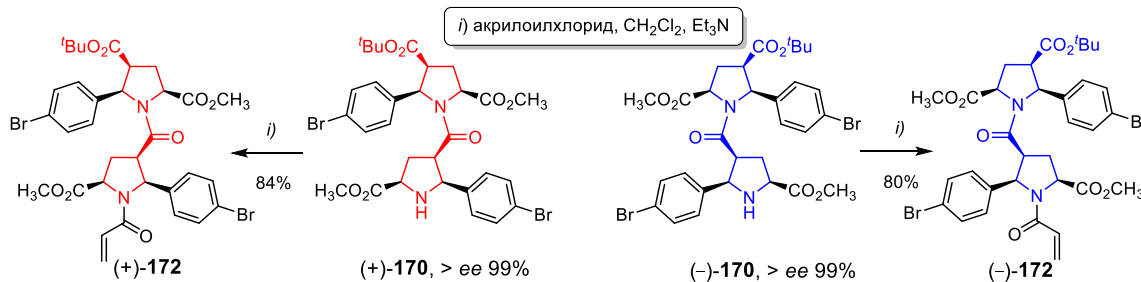


Схема 10.1

Оба энантиомера димерного акриламида **172** вызывают ингибирование пролиферации у неопластических клеток PC-3 and DU145, зависящее от концентрации, при этом активность правовращающего энантиомера (+)-**172** в 18-21 раз выше по сравнению с левовращающим

энантиомером (-)-172 с величинами  $GI_{50}$   $0.56 \pm 0.07$  против  $9.95 \pm 1.64 \mu\text{M}$  для PC-3 и  $0.50 \pm 0.04$  против  $10.67 \pm 0.84 \mu\text{M}$  для DU145, соответственно (Рисунок 10.5, слева).

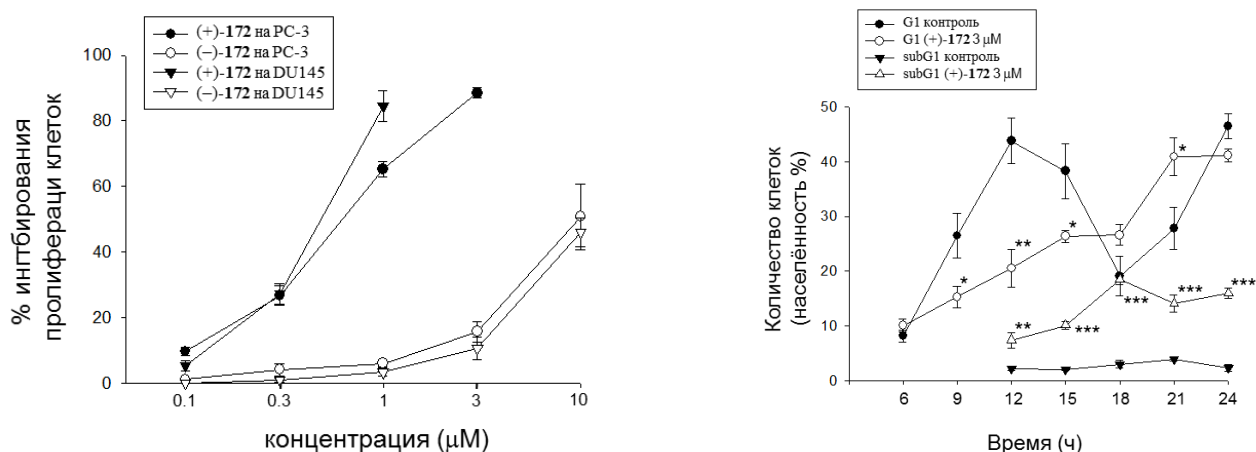


Рисунок 10.5. Слева: концентрационная зависимость влияния энантиомеров (+)-172 и (-)-172 на пролиферацию злокачественных клеточных линий PC-3 и DU145. Справа: Влияние соединения (+)-172 на развитие PC-3 клеточного цикла. Количественные данные представлены в виде средних величин  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=3$ ). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  и \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контрольным экспериментом.

Для определения взаимосвязи антипролиферативного эффекта с изменениями в развитии клеточного цикла PC-3 клетки синхронизировали обработкой тимидином, а затем сравнивали развитие цикла после снятия тимидинового блока в контрольной и обработанной соединением (+)-172 группах. PC-3 клетки в контрольной группе через 12 ч после снятия тимидинового блока прошли G2/M фазу и вошли в G1 фазу, за которой последовал следующий цикл. В отличие от этого, PC-3 клетки, обработанные димерным акриламидом (+)-172, претерпели постепенное увеличение популяции в G1 фазе, за которым последовал рост количества клеток в sub-G1 фазе, ведущей к апоптозу (Рисунок 10.5, справа). Полученные данные указывают на блокирование клеточного цикла гормонорезистентных клеток PC-3 рака простаты в G1 фазе и последующий апоптоз при действии антипролиферативного агента (+)-172. Энантиомерно чистый димерный акриламид (+)-172 ингибирует фосфорилирование референсных аминокислотных остатков всех киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, что следует из данных вестерн-блоттинга.

**Глава 11.** Приведены экспериментальные методы и структурные данные синтезированных в диссертации соединений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По полученным в ходе выполнения диссертационной работы результатам автором сделаны следующие **выводы**:

1) Сформулирована и реализована новая стратегия синтетического дизайна биологически активных соединений, базирующаяся на концепциях *привилегированных структур* и *диверсифицированно-ориентированного синтеза* и позволяющая получать сфокусированные библиотеки соединений, характеризующихся высокой степенью молекулярного разнообразия и занимающих различные области биологически значимого химического пространства.

2) Установлена *новая привилегированная структура* в медицинской химии – *5-арилпирролидин-2-карбоновая кислота*.

3) Разработаны синтетические методы получения и структурных модификаций новых соединений, содержащих фрагмент 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты, в том числе приводящих к глубокой перестройке исходного молекулярного каркаса.

4) Разработан метод получения нового класса олигомерных соединений, в том числе энантиомерно и диастереомерно чистых, с упорядоченной молекулярной организацией – *циклоприсоединительная олигомеризация*, позволяющая получать функционализированные

альтернированные поли-β-пролины. Метод характеризуется высокой стереоселективностью синтетических стадий и не требует введения защитных и активирующих функциональных групп.

5) Развита методология 1,3-диполярного циклоприсоединения азометиновых илидов в направлениях применения новых диполярофилов и стереоэлектронного контроля. Установлен эффект конформационной фиксации трифторметильной группы, позволяющей получать оптически активные гомохиральные β-дипептиды без введения защитных и активирующих функциональных групп.

6) Установлена ингибиторная активность сфокусированной библиотеки соединений, содержащих структурные фрагменты 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты и винилсульфона, по отношению к определяемым цистеиновыми аминокислотными фрагментами функциям бактериального фермента Сортаза А и прокоагулянтному действию тромбоцитов.

7) Обоснован выбор привилегированной структуры 5-арилпирролидин-2-карбоновой кислоты для направленного дизайна ингибиторов сериновых протеаз системы гемостаза. Получены новые антикоагулянтные низкомолекулярные агенты, ингибирующие ферментативную активность тромбина и фактора Ха.

8) Разработан новый класс противоязвенных соединений – N-((2-гидроксифенил)тио)-ацетильные производные α-аминокислот, включающие привилегированную структуру 2-(арилтио)ацетата. Соединения этого класса продемонстрировали высокую эффективность в профилактике и терапии язвенной болезни желудка различной этиологии на животных моделях.

9) Установлена системная антипролиферативная активность альтернированных поли-β-пролинов по отношению к клеточным линиям гормонорезистентного рака простаты различных генных типов. Изучены сигнальные пути и ферменты, подверженные влиянию новых антипролиферативных агентов, вызывающих блокирование клеточного цикла и апоптоз раковых клеток.

#### **Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:**

##### Статьи в рецензируемых и входящих в список ВАК журналах

1. K.V. Kudryavtsev, V.V. Irkha. Three-component synthesis of polysubstituted homoproline analogs // *Molecules*, **2005**, Vol. 10, N 7, pp. 755-761.
2. К.В. Кудрявцев, Н.В. Нуколова, О.В. Кокорева, Е.С. Смолин. Стереоселективный синтез функционализированных производных 2-(2-карбоксиэтил)пирролидин-2-карбоновой кислоты // *Журнал органической химии*, **2006**, Т. 42, Вып. 3, сс. 424-434.
3. K.V. Kudryavtsev, M.Yu. Tsentalovich, A.S. Yegorov, E.L. Kolychev. Highly diastereoselective synthesis of chimeras of proline and glutamate // *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2006**, Vol. 43, N 6, pp. 1461-1466.
4. К.В. Кудрявцев, М.Ю. Центалович. Синтез производных 5-фенилпролинов, обладающих антибактериальной активностью // *Вестник Московского Университета. Серия 2. Химия*, **2007**, Т. 48, № 5, сс. 308-313.
5. К.В. Кудрявцев, А.А. Загуляева. Катализируемое α-аминокислотами 1,3-диполярное циклоприсоединение азометинов и электронодефицитных алкенов // *Журнал органической химии*, **2008**, Т. 44, Вып. 3, сс. 384-393.
6. К.В. Кудрявцев. Стереоселективный трехкомпонентный одностадийный синтез полифункционального производного 2-пирролидинкарбоновой кислоты // *Журнал органической химии*, **2008**, Т. 44, Вып. 11, сс. 1709-1711.
7. К.В. Кудрявцев. Трехкомпонентный синтез трициклических лактамов, содержащих пирролизидин-3-оновый фрагмент // *Известия Академии наук. Серия химическая*, **2008**, № 11, сс. 2318-2325.
8. K.V. Kudryavtsev, M.L. Bentley, D.G. McCafferty. Probing of the *cis*-5-phenyl proline scaffold as a platform for the synthesis of mechanism-based inhibitors of the *Staphylococcus aureus* sortase SrtA isoform // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2009**, Vol. 17, No. 7, pp. 2886-2893.

9. К.В. Кудрявцев. Синтез мостиковых гетероциклов из *цис*-2,4-пирролидиндикарбоновых кислот: I. 3,6-диазабицикло[3.2.1]октаны // *Журнал органической химии*, **2010**, Т. 46, Вып. 3, сс. 379-386.
10. K.V. Kudryavtsev. Efficient synthesis of functionalized diazacyclopenta[*c*]pentalene with multiple intermolecular interactions in crystal // *Heterocycles*, **2011**, Vol. 83, No. 2, pp. 323-330.
11. К.В. Кудрявцев, Е.В. Трофимова, А.О. Борисова. Ангидриды пирролидин-2,3,4-трикарбоновых кислот: I. Органокаталитический синтез и аннелирование под действием *n*-фторбензиламина // *Журнал органической химии*, **2011**, Т. 47, Вып. 4, сс. 554-560.
12. К.В. Кудрявцев, Н.А. Подошлелова, А.А. Новикова, М.А. Пантелеев, Д.В. Заболотнев, Н.С. Зефилов. Ингибирование прокоагулянтной активности тромбоцитов крови винилсульфонилпроизводными пирролидин-2-карбоновой кислоты // *Известия Академии наук. Серия химическая*, **2011**, № 4, сс. 665-670.
13. К.В. Кудрявцев, Д.А. Шульга, В.И. Чупахин, А.В. Чураков, Н.Г. Дацук, Д.В. Заболотнев, Н.С. Зефилов. Дизайн низкомолекулярных ингибиторов тромбина на основе *цис*-5-фенилпролинового молекулярного каркаса // *Известия Академии наук. Серия химическая*, **2011**, № 4, сс. 671-679.
14. K.V. Kudryavtsev, A.V. Churakov, O. Dogan. Bis[5-(4-bromophenyl)-4-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylato]copper(II) dihydrate // *Acta Crystallographica Section E*, **2011**, Vol. 67, Part 11, pp. m1623.
15. K.V. Kudryavtsev, A.V. Churakov, O. Dogan. 2-[(1*RS*,3*RS*,3*aRS*,6*aSR*)-5-Benzyl-4,6-dioxo-3-phenyloctahydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrol-1-yl]acetamide // *Acta Crystallographica Section E*, **2011**, Vol. 67, Part 12, pp. o3186.
16. K.V. Kudryavtsev, A.V. Churakov. 4-[(1*RS*,5*RS*,7*SR*)-5-Methyl-2,4-dioxo-3,6-diazabicyclo[3.2.1]octan-7-yl]benzotrile // *Acta Crystallographica Section E*, **2012**, Vol. 68, Part 6, pp. o1718.
17. K.V. Kudryavtsev, P.M. Ivantcova, A.V. Churakov, V.A. Vasin. Phenyl  $\alpha$ -bromovinyl sulfone in cycloadditions with azomethine ylides: an unexpected facile aromatization of the cycloadducts into pyrroles // *Tetrahedron Letters*, **2012**, Vol. 53, No 33, pp. 4300-4303.
18. K.V. Kudryavtsev, S.Z. Vatsadze, V.S. Semashko, A.V. Churakov. Syn-3-(4-Chlorobenzyl)-1,5-dimethyl-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-ol // *Acta Crystallographica Section E*, **2012**, Vol. 68, Part 8, pp. o2373.
19. K.V. Kudryavtsev, P.M. Ivantcova, A.V. Churakov. (1*SR*,3*RS*,3*aSR*,6*aRS*)-Methyl 5-methyl-4,6-dioxo-3-(2-(trifluoromethyl)phenyl)octahydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-1-carboxylate // *Acta Crystallographica Section E*, **2013**, Vol. 69, Part 2, pp. o161-o162.
20. K.V. Kudryavtsev, A.V. Churakov, J.-H. Guh. 2-(1*H*-Imidazol-1-yl)-4-(3-(trifluoromethyl)phenyl)thiazole // *Acta Crystallographica Section E*, **2013**, Vol. 69, Part 2, pp. o238.
21. S. Ayan, O. Dogan, P.M. Ivantcova, N.G. Datsuk, D.A. Shulga, V.I. Chupakhin, D.V. Zabolotnev, K.V. Kudryavtsev. Asymmetric synthesis and molecular docking study of enantiomerically pure pyrrolidine derivatives with potential antithrombin activity // *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, Vol. 24, No 13-14, pp. 838-843.
22. K.V. Kudryavtsev, P.M. Ivantcova, A.V. Churakov, S. Wiedmann, B. Luy, C. Muhle-Goll, N.S. Zefirov, S. Bräse. Alternating asymmetric self-induction in functionalized pyrrolidine oligomers // *Angewandte Chemie International Edition*, **2013**, Vol. 52, Issue 48, pp. 12736-12740.
23. K.V. Kudryavtsev, A.O. Markevich, O.V. Virchenko, T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko, D.V. Zabolotnev, N.S. Zefirov. Pharmacological correction of stress-induced gastric ulceration by novel small-molecule agents with antioxidant profile // *The Scientific World Journal*, **2014**, Vol. 2014, Article ID 217039, 6 pages.
24. K.V. Kudryavtsev, D.A. Shulga, V.I. Chupakhin, E.I. Sinauridze, F.I. Ataulkhanov, S.Z. Vatsadze. Synthesis of novel bridged dinitrogen heterocycles and their evaluation as potential fragments for the design of biologically active compounds // *Tetrahedron*, **2014**, Vol. 70, No 43, pp. 7854-7864.

25. C.-C. Yu, S.-P. Liu, J.-L. Hsu, J.T.A. Hsu, K.V. Kudryavtsev, J.-H. Guh. KUD773, a phenylthiazole derivative, displays anticancer activity in human hormone-refractory prostate cancers through inhibition of tubulin polymerization and anti-Aurora A activity // *Journal of Biomedical Science*, **2015**, Vol. 22, Article 2.
26. K.V. Kudryavtsev, C.-C. Yu, P.M. Ivantcova, V.I. Polshakov, A.V. Churakov, S. Bräse, N.S. Zefirov, J.-H. Guh. Structural studies and anticancer activity of a novel class of  $\beta$ -peptides // *Chemistry – An Asian Journal*, **2015**, Vol. 10, Issue 2, pp. 383-389.
27. K.V. Kudryavtsev, P.M. Ivantcova, C. Muhle-Goll, A.V. Churakov, M.N. Sokolov, A.V. Dyuba, A.M. Arutyunyan, J.A.K. Howard, C.-C. Yu, J.-H. Guh, N.S. Zefirov, S. Bräse. Menthols as chiral auxiliaries for asymmetric cycloadditive oligomerization: syntheses and studies of  $\beta$ -proline hexamers // *Organic Letters*, **2015**, Vol. 17, Issue 24, pp. 6178-6181.
28. K.V. Kudryavtsev, A.B. Mantsyzov, P.M. Ivantcova, M.N. Sokolov, A.V. Churakov, S. Bräse, N.S. Zefirov, V.I. Polshakov. Control of azomethine cycloaddition stereochemistry by  $\text{CF}_3$  group: structural diversity of fluorinated  $\beta$ -proline dimers // *Organic Letters*, **2016**, Vol. 18, Issue 18, pp. 4698-4701.

Другие публикации в рецензируемых и входящих в список ВАК журналах

29. K.V. Kudryavtsev, M.I. Kucherenko, T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregoва, L.I. Ostapchenko. Novel drug-like small molecules protect from stress-induced gastric ulceration in vivo // *European Journal of Clinical Investigation*, **2012**, Vol. 42, Suppl. 1, pp. 6.
30. E.A. Strotskaya, K.V. Kudryavtsev, L.I. Ostapchenko. Identification of novel chemotypes of  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase inhibitors // *FEBS Journal*, **2013**, Vol. 280, Suppl. 1, pp. 332-333.

Статьи в журналах и сборниках научных работ

31. П.С. Петров, В.А. Васин, К.В. Кудрявцев. Молекулярный докинг сульфонилзамещенных пирролидинов, ингибирующих сортазу А *Staphylococcus aureus* // В сборнике «Актуальные проблемы химии и методики преподавания химии». Мордовский государственный педагогический институт. Саранск, **2011**, сс. 27-29.
32. В.А. Калязин, П.С. Петров, В.А. Васин, К.В. Кудрявцев. Молекулярный докинг и синтез 4-сульфонилзамещенных *цис*-5-фенилпролинов – потенциальных ингибиторов *Staphylococcus aureus* сортазы А // В сборнике «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине». Том 3. Издательство Политехнического университета. С.-Петербург, **2011**, сс. 163-164.
33. К.В. Кудрявцев, А.А. Маркевич, А.В. Вирченко, Т.М. Фалалеева, Т.В. Береговая, Л.И. Остапченко. Использование новых низкомолекулярных органических соединений в профилактике вызванных аспирином эрозивно-язвенных поражений у крыс // В сборнике «Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии». Выпуск 5 (113). Киев-Луганск. **2012**, сс. 458-464.
34. А.А. Маркевич, Е.П. Гадилия, Т.М. Фалалеева, Л.И. Остапченко, К.В. Кудрявцев. Скрининг синтезированных низкомолекулярных органических соединений по их эффективности в профилактике поражений слизистой оболочки желудка // *Вестник проблем биологии и медицины*, **2013**, Т. 1 (102), № 3, сс. 116-121.
35. Е.П. Гадилия, Л.И. Остапченко, А.А. Маркевич, Т.М. Фалалеева, К.В. Кудрявцев. Скрининг синтезированных низкомолекулярных органических соединений по их эффективности в лечении язв на лабораторных животных // *Мир медицины и биологии*, **2013**, Т. 9, № 3 (39), сс. 16-20.

Патенты Российской Федерации на изобретение

36. К.В. Кудрявцев, Н.Т. Берберова, В.П. Осипова, Н.А. Антонова. Новые бициклические производные пирролидинов, обладающие антиоксидантной активностью, и способ их получения. Патент на изобретение № **2472794**. Опубликовано **20.01.2013** Бюл. № 2.
37. К.В. Кудрявцев, Н.Т. Берберова, В.П. Осипова, Н.А. Антонова. Амиды 2-(2-гидроксифенилтио)уксусной кислоты, обладающие антиоксидантной активностью, и способ их получения. Патент на изобретение № **2473540**. Опубликовано **27.01.2013** Бюл. № 3.

38. К.В. Кудрявцев, Н.С. Зефирова, Т.М. Фалалеева, Т.В. Береговая, Л.И. Остапченко. *Способ профилактики и лечения язвенной болезни желудка, вызываемой приёмом этанолсодержащих жидкостей*. Патент на изобретение № **2527334**. Опубликовано **27.08.2014** Бюл. № 24.
39. К.В. Кудрявцев, Н.С. Зефирова, Т.М. Фалалеева, Т.В. Береговая, Л.И. Остапченко. *Способ профилактики и лечения язвенной болезни желудка, вызываемой стрессом*. Патент на изобретение № **2527683**. Опубликовано **10.09.2014** Бюл. № 25.
40. К.В. Кудрявцев, Н.С. Зефирова, Т.М. Фалалеева, Т.В. Береговая, Л.И. Остапченко. *Способ профилактики и лечения язвенных поражений желудка, вызываемых приёмом нестероидных противовоспалительных лекарственных средств*. Патент на изобретение № **2530615**. Опубликовано **10.10.2014** Бюл. № 28.