



Минобрнауки России

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет)»

Направление подготовки 18.03.01 Химическая технология
Направленность Химическая технология органических веществ
Модуль Химическая технология биологически активных
веществ, фармацевтических препаратов и
косметических средств
УДК 547.1 + 547.794.3
Факультет Химической и биотехнологии
Кафедра Химии и технологии синтетических
биологически активных веществ

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
БАКАЛАВРА

Тема Получение производных диэтил(7-арил-5-оксо-6-циано-5H-
тиазоло[3,2-a]пиримидин-3-ил)фосфонатов и исследование их
противовирусной активности

Студент

А.А. Бабушкина

Санкт-Петербург

2020

Заведующий кафедрой



В.И. Крутиков

Руководитель,

Д-р. хим. наук, профессор



В.И. Крутиков

Консультант,

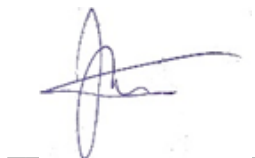
к.х.н., доцент



Ю.Л. Питерская

Нормоконтролер,

к.х.н., доцент



Е.Е. Щадилова

Минобрнауки России
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет)»

ЗАДАНИЕ
НА ВЫПУСКНУЮ КВАЛИФИКАЦИОННУЮ РАБОТУ
БАКАЛАВРА

Направление подготовки	18.03.01 Химическая технология
Направленность образовательной программы	Химическая технология органических веществ
Факультет	Химической и биотехнологии
Кафедра	Химии и технологии синтетических биологически активных веществ
Студент	Бабушкина Анастасия Андреевна

Тема Получение производных диэтил(7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфонатов и исследование их противовирусной активности

Утверждена приказом по институту от	28.04.2020 № 395-032
Срок сдачи работы	14.06.2020
Цель работы	Получение производных диэтил(6-циано-5-оксо-7-арил-5 <i>H</i> -тиазоло[3,2- <i>a</i>]пиримидин-3-ил)фосфонатов и определение их противовирусной активности в отношении вируса гриппа

A/PR/8/34(H1N1)

Исходные данные:

- 1 Егоров, Д.М. Фосфорилирование гетероциклических тионов хлорацетиленфосфонатами [Текст]: дис. канд. хим. наук. / Д.М. Егоров. – СПб: СПбГТИ(ТУ). – 2019. – 137 с.
- 2 Штро, А.А. Исследование активности производных усниновой кислоты в отношении вируса гриппа [Текст]: дис. канд. биол. наук. / А.А. Штро. – СПб: ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. – 2014. – 134 с.

Основные задачи ВКР бакалавра:

- 1 Получить целевые продукты конденсированные тиазоло[3,2- α]пиримидины;
- 2 Доказать структуру полученных соединений на основании данных физико-химических методов анализа;
- 3 Определить активность препаратов в отношении вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1) *in vitro*.
- 4 Найти соединение-лидера среди полученных целевых препаратов.

Перечень графического материала:

Схемы реакций, рисунки спектров ЯМР соединений, сводные таблицы характеристик целевых соединений.

Заведующий кафедрой



В.И. Крутиков

Руководитель,

Д-р. хим. наук, профессор



В.И. Крутиков

Задание приняла к выполнению



А.А. Бабушкина

РЕФЕРАТ

Работа содержит 8 рисунков, 27 схем, 8 таблицы, 1 приложение, 58 библиографических наименований.

2-ТИОУРАЦИЛЫ, ТИАЗОЛО[3,2- α]ПИРИМИДИНЫ,
ДИЭТИЛХЛОРЭТИНФОСФОНАТ, ФОСФОНАТЫ, ВИРУС ГРИППА
A/PR/8/34(H1N1), ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ИНДЕКС.

Объектами исследования являются диэтил(7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфонаты - производные 6-арил-5-циано-2-тиоурацилов.

Полученные трехкомпонентной реакцией конденсации 6-арил-5-циано-2-тиоурацилы были введены в реакцию с диэтилхлорэтинфосфонатом, проходящую с последующим замещением атома хлора и внутримолекулярной циклизацией, приводящую к образованию диэтиловых эфиров (7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфоновой кислоты, ранее не описанных в литературе.

В результате работы получен ряд диэтил(7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфонатов, цитотоксичность и противовирусная активность в отношении вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1) которых определены в ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	9
2 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.....	10
2.1 6-АРИЛ-5-ЦИАНО-2-ТИОУРАЦИЛЫ.....	10
2.1.1 ТАУТОМЕРНЫЕ ФОРМЫ.....	10
2.1.2 СИНТЕЗ 6-АРИЛ-5-ЦИАНО-2-ТИОУРАЦИЛОВ.....	11
2.2 РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ХЛОРЭТИНФОСФОНАТОВ.....	11
2.3 МЕТОДЫ СИНТЕЗА ТИАЗОЛО[3,2- <i>a</i>]ПИРИМИДИНОВ.....	13
3 ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ 2-ТИОУРАЦИЛОВ И ТИАЗОЛО[3,2- <i>a</i>]ПИРИМИДИНОВ.....	17
4 ВЫВОДЫ ПО АНАЛИТИЧЕСКОМУ ОБЗОРУ.....	25
5 ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
6 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	27
6.1 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
6.2 СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 6-АРИЛ-5-ЦИАНО-2-ТИОУРАЦИЛОВ.....	27
6.3 СИНТЕЗ ДИЭТИЛ(7-(4-АРИЛ)-6-ЦИАНО-5-ОКСО-5 <i>H</i> - ТИАЗОЛО[3,2- <i>a</i>]ПИРИМИДИН-3-ИЛ)ФОСФОНАТОВ.....	28
6.4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТОВ.....	28
6.5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ.....	30
7 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	31
7.1 ТАУТОМЕРНЫЕ ФОРМЫ 2-ТИОУРАЦИЛОВ.....	31
7.2 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 6-АРИЛ-5-ЦИАНО-2- ТИОУРАЦИЛОВ С ДИЭТИЛХЛОРЭТИНФОСФОНАТОМ.....	33
7.3 ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ В ОПЫТАХ <i>IN VITRO</i>	40
ВЫВОДЫ.....	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	44
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	52

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений развития фармацевтической химии является создание новых высокоэффективных и малотоксичных отечественных лекарственных средств. Большой интерес в этом плане представляют производные 2-тиоурацила, являющиеся перспективными базовыми объектами для синтеза новых биологически активных веществ. Это, прежде всего, объясняется родством их структуры с природными биологически активными соединениями – нуклеотидами, алкалоидами и витаминами. Кроме того производные 2-тиоурацила проявляют широкий спектр биологической активности, а неограниченные возможности дальнейшей химической модификации путем введения заместителей по атомам серы, азота и углерода делает их уникальными ядрами для создания новых эффективных препаратов.

Грипп, входящий в группу острых респираторных вирусных инфекций, является одним из самых распространённых заболеваний в мире на сегодняшний день, эпидемии которого происходят ежегодно, унося сотни тысяч человеческих жизней. По этой причине поиск и разработка ранее неизвестных, активных по отношению к вирусу гриппа препаратов, а также определения механизма их действия является актуальной задачей.

Производные 2-тиоурацилов – тиазолопиримидины – проявляют противовирусную активность в отношении вирусов иммунодефицита человека первого типа и простого вируса герпеса. Введение фосфорсодержащих групп может привести к расширению спектра проявляемых видов биологической активности.

Научная новизна полученных результатов:

Впервые получена серия диэтил(7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2- α]пиримидин-3-ил)фосфонатов на основе реакции диэтилхлорэтинфосфоната с 6-арил-5-циано-2-тиоурацилами. Цитотоксичность полученных новых препаратов определена в отношении линии клеток MDCK, а также

установлена активность препаратов в отношении вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1).

Материалы выпускной квалификационной работы представлены на следующих конференциях:

1 Бабушкина А.А., Каскевич К.И., Егоров Д.М. Синтез и модификация 6-арил-5-нитрил-2-тиоурацилов / Материалы IX научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых в рамках мероприятий, посвященных 150-летию открытия Периодического закона химических элементов Д.И. Менделеевым «НЕДЕЛЯ НАУКИ-2019» (с международным участием), СПб. –2019, С. 85. (1–3 апреля 2019)

2 Бабушкина А.А., Каскевич К.И., Егоров Д.М., Питерская Ю.Л. Синтез и фосфорилирование 6-арил-5-нитрил-2-тиоурацилов хлорэтинфосфонатом / Материалы VIII молодежной конференции ИОХ РАН, посвященной 85-летию со дня основания ИОХ РАН, Москва.- 2019, С. 83. (22-23 мая 2019)

3 Бабушкина А.А., Егоров Д.М., Леоненко В.Е., Чекалов А.П., Питерская Ю.Л. Фосфорилирование 2-тиоурацилов / Материалы XI международной конференции по химии для молодых ученых «Mendeleev2019», посвященной 150-летию Периодической таблицы, СПб. – 2019, С. 224. (9–13 сентября 2019)

4 Бабушкина А.А., Егоров Д.М., Питерская Ю.Л. Синтез и биологическая активность фосфорилированных тиазоло[3,2-а]пиримидинов / Материалы XXIII всероссийской конференции молодых ученых-химиков (с международным участием), Нижний Новгород.- 2020, С.50.(21-23 апреля 2020)

1 ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

A/Pr/8/34(H1N1) – штамм вируса гриппа А, выделенный в Пуэрто-Рико восьмым в 1934 году

MDCK – тестовая линия клеток почки собаки майдин-дэрби

ЦТД₅₀ – цитотоксическая концентрация соединения, вызывающая 50% снижение числа жизнеспособных клеток в тестовой линии клеток

ЭД₅₀ – эффективная концентрация соединения, вызывающая 50% снижение цитопатических эффектов вируса в колонии клеток

ХТИ – химиотерапевтический индекс, рассчитанный как отношение

ЦТД₅₀ к ЭД₅₀

МТТ – метилтетразолиевый тест

РГА – реакция гемагглютинации

2 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

2.1 6-АРИЛ-5-ЦИАНО-2-ТИОУРАЦИЛЫ

2.1.1 ТАУТОМЕРНЫЕ ФОРМЫ

2-Тиоурацилы теоритически могут существовать в шести различных таутомерных формах **A-F**, что объясняется подвижностью протонов, находящихся у атомов азота в пиримидиновом кольце. Таутомерные формы **A-F** представлены на схеме 1.

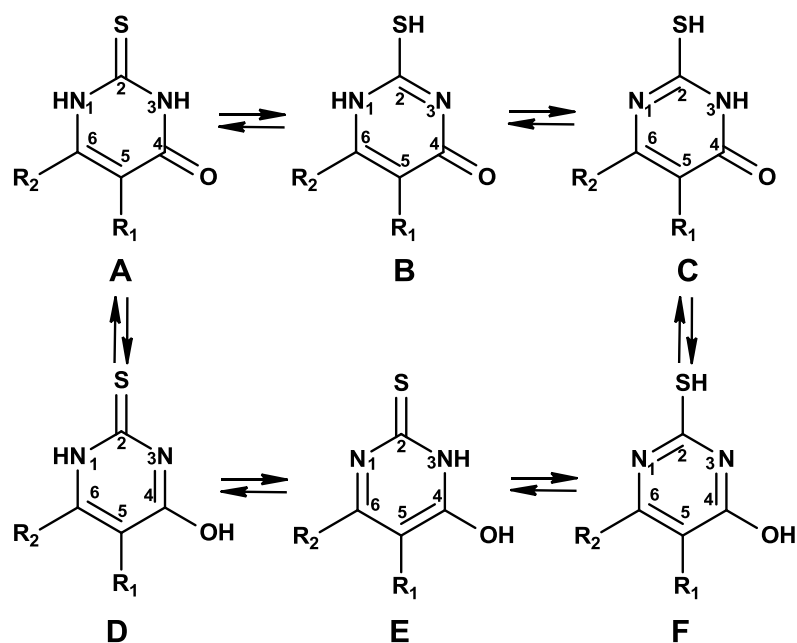


Схема 1 –Возможные таутомерные формы 2-тиоурацилов

Согласно литературным данным [1-3] наиболее термодинамически устойчивой формой является форма **A** как в твердом состоянии, так и в растворе ацетонитрила.

Известно, что 6-арил-5-циано-2-тиоурацилы имеют четыре нуклеофильных центра: N_1 , N_3 , S и O . По литературным данным [1, 4 - 6] наиболее нуклеофильным является S -центр, менее – центры N_1 и N_3 .

2.1.2 СИНТЕЗ 6-АРИЛ-5-ЦИАНО-2-ТИОУРАЦИЛОВ

В основе построения пиримидинового кольца лежат реакции конденсации различных реагентов. Самым распространенным методом является конденсация трехуглеродной компоненты и фрагмента N-C-N. В качестве трехуглеродной компоненты могут выступать β-дикарбонильные соединения, производные циануксусной кислоты, β-альдегидонитрилы и динитрилы. Подобный метод позволяет получить широкий круг пиримидиновых производных.

Наиболее распространённым методом синтеза 6-арил-5-циано-2-тиоурацилов является трехкомпонентная реакция конденсации *one-pot* тиомочевины, замещенного бензальдегида и цианоксусного эфира, представленная на схеме 2.

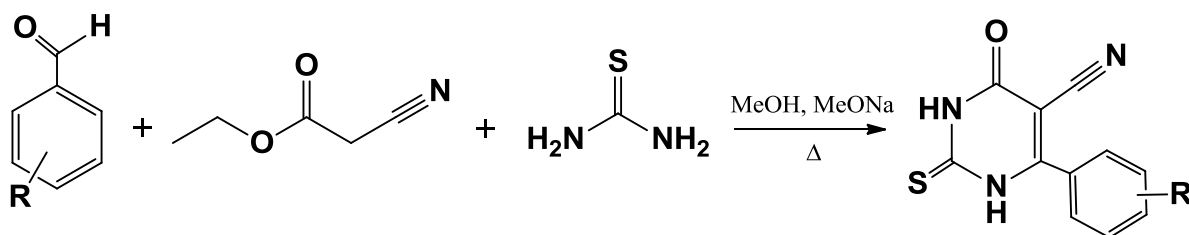


Схема 2 – Получение 6-арил-5-циано-2-тиоурацилов

В ряде работ используют микроволновое излучение с целью ускорения реакции и увеличения выхода целевого продукта [7-10].

Минусами подобных реакций являются низкие выходы (30-50%) и достаточно большой промежуток времени прохождения реакции (до 30 ч) [11].

2.2 РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ХЛОРЕТИНФОСФОНАТОВ

Реакционная способность хлорэтинфосфонатов подробно изучена сотрудниками кафедры органической химии СПбГТИ(ТУ) в ряде работ [12-17].

Сильная поляризация ацетиленовой связи в хлорэтинфосфонате, вызванная вследствие наличия акцепторных заместителей, обуславливает реакционную способность таковых в реакциях нуклеофильного замещения. Общая структура хлорэтинфосфонатов представлена на схеме 3.

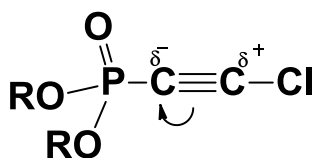


Схема 3 – Распределение электронной плотности в ацетиленовой связи хлорэтинфосфоната

В ранних работах исследовано взаимодействие 4,5-замещенных 1*H*-имидазол-2-тионов с хлорацетиленфосфонатами, приводящее к образованию vicинально и gemинально замещенных соответствующих имидазолсульфанилэтиленфосфонатов линейной структуры в соотношении $\approx 1:1$ [12-14].

Дальнейшее изучение реакций хлорэтинфосфонатов с *S,N*-бинуклеофилами привело к получению новых фосфорилорванных бициклических конденсированных структур с высокими выходами [15, 16]. Так, продуктами взаимодействия хлорэтинфосфонатов с замещенными 1,3,4-тиадиазол-2-тионами являются 5-фосфорилированные тиазоло[2,3-*b*][1,3,4]тиадиазол-4-илия хлориды в соответствии со схемой 4.

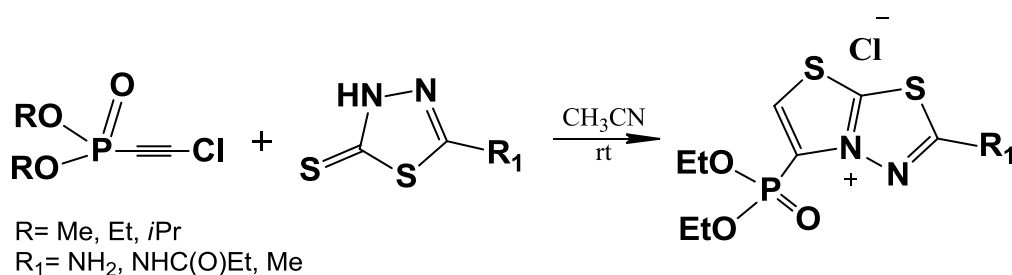


Схема 4 – Взаимодействие хлорэтинфосфонатов с 1,3,4-тиадиазол-2-тионами

Реакции протекают хемо- и региоселективно в безводном ацетонитриле.

В последних работах нами было показано, что реакцией диэтилхлорэтинфосфоната с метиловым (этиловым) эфиром 6-метил-4-арил-2-тио-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновых кислот получены единственные продукты циклизации – метил(этил)-3-(диэтоксифосфорил)-5-арил-7-метил-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-6-карбоксилаты[17], продемонстрированные на схеме 5.

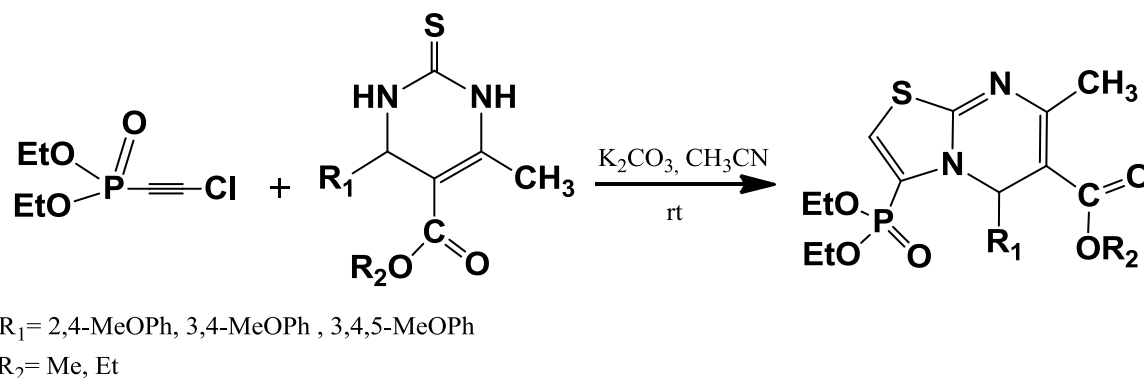


Схема 5 – Получение метил(этил)-3-(диэтоксифосфорил)-5-арил-7-метил-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-6-карбоксилатов

2.3 МЕТОДЫ СИНТЕЗА ТИАЗОЛО[3,2- α]ПИРИМИДИНОВ

Тиазолопиримидиновые структуры можно получить замыканием одного из колец: пиримидинового или тиазольного. В работах широко распространён метод достройки тиазольного кольца, однако, более ранним является способ достройки пиримидинового цикла. В основе подобных реакций лежат реакции конденсации.

В 90х годах группой ученых из Франции выделены два региоизомера, представляющие собой 5-оксо и 7-оксотетрагидротиазоло[3,2-*a*]пиримидины, полученные в результате трехкомпонентной реакции конденсации 2-аминотиазолина, ароматического альдегида и этилцианоацетата в соответствии со схемой 6 [18-20].

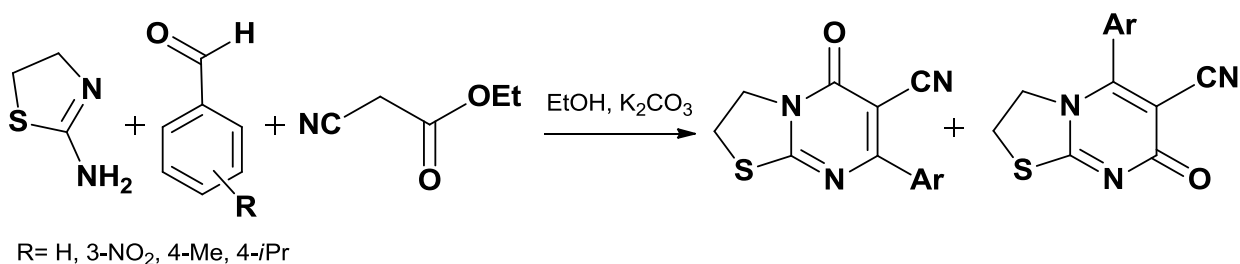


Схема 6 – One-pot реакция между 2-аминотиазолином, ароматическим альдегидом и этилцианоацетатом

Выходы в данной реакции невелики – 14 - 43%. Структурные различия изомеров исследованы методом масс-спектрометрии [21].

Хорошо изучены синтезы тиазолопиримидинов путем взаимодействия 2-аминотиазолов с 1,3-кетозэфирами в присутствии кислот, оснований или конденсирующих агентов [22, 23]. Реакция представлена на схеме 7.

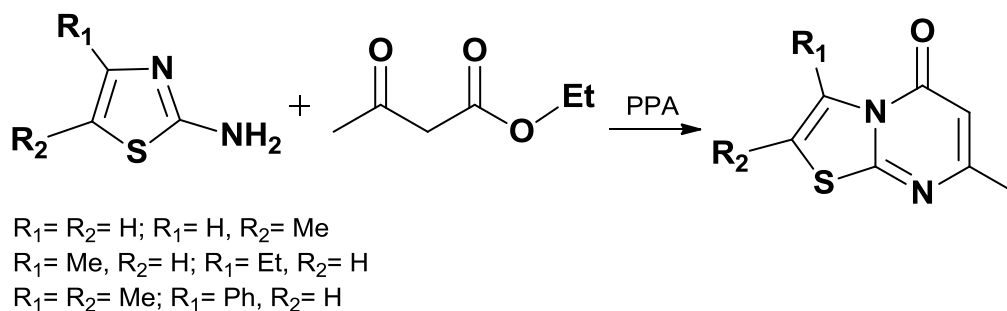
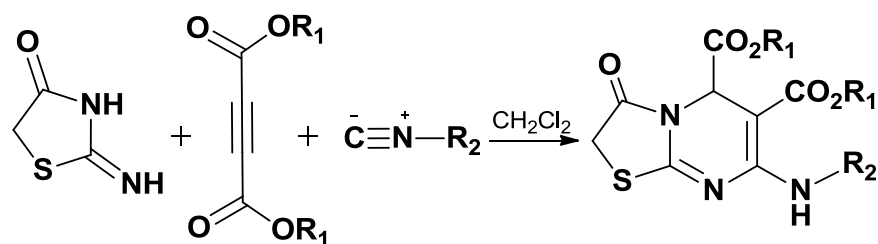


Схема 7 – Получение замещенных 7-метил - 5H-[1,3]тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-5-онов

Авторами отмечено образование лишь одного продукта реакции – 5-оксо изомера.

Время реакции составляет 1,5-3 минуты при использовании микроволнового излучения, при этом выход продукта колеблется от 80 до 90% . При нагревании до 160°C реакция проходит за 3-4 часа с выходом 60-70%.

Достройка пиримидинового кольца может осуществляются трехкомпонентной реакцией между 2-амино-1,3-тиазолидин-4-оном, диалкил ацетилендикарбосилатом и замещенным изоцианидом [24]. Реакция представлена на схеме 8.



R₁= Cyclohexyl, t-Bu
 1,1,3,3-Tetramethylbutyl
 R₂= Me, Et, *i*Pr

Схема 8 - Взаимодействие 2-амино-1,3-тиазолидин-4-она, диалкил ацетилендикарбоксилата и замещенного изоцианида

Наиболее распространенным методом синтеза 5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-5-онов являются реакции производных 2-тиоурацилов с α -галокетонами и α -галокислотами, протекающие через последовательные стадии алкилирования и конденсации. Предположительный механизм реакции 6-арил-5-циано-2-тиоурацила с α -хлоруксусной кислотой описан на схеме 9 [25-31].

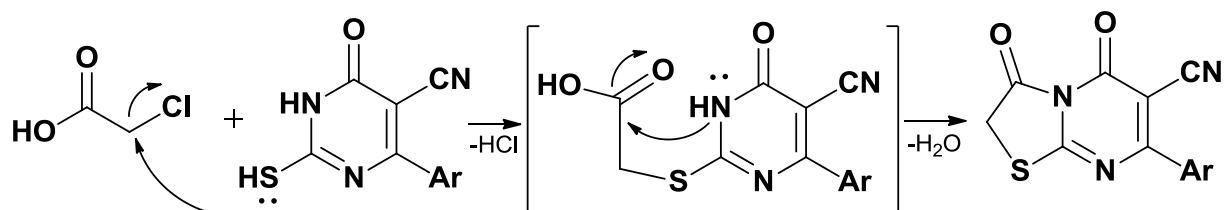


Схема 9 – Предположительный механизм реакции

Единственным продуктом взаимодействия 6-фенил-5-циано-2-тиоурацила с 1,2-дибромэтаном является региоизомер – 5-оксо-5-фенил-3,7-дигидро-2*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-6-карбонитрил, то есть внутримолекулярная циклизация проходит по третьему атому азота, как предполагают авторы работы [32, 33]. Реакция приведена на схеме 10.

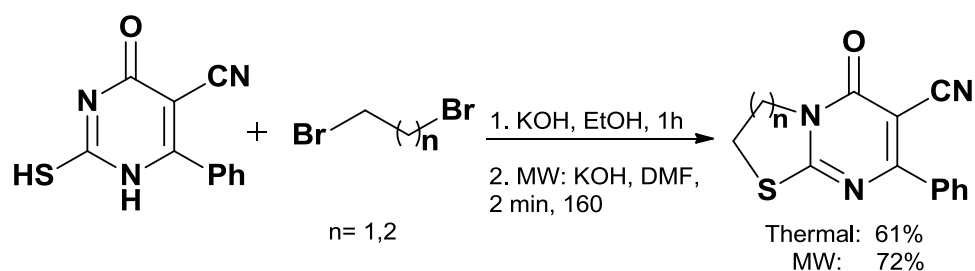


Схема 10 – Реакция между 6-фенил-5-циано-2-тиоурацилом и 1,2(1,3)-дибромалканами

Заключение о структуре полученного региоизомера сделано на основании данных квантово-химических расчетов. В случае использования 1,3-дибромпропана образование тиазинового цикла проходит также за счёт циклизации по третьему атому азота.

Альтернативным методом синтеза тиазолопиримидиновых структур является взаимодействие замещенных 2-тиоурацилов с терминальными алкинами.

Российскими химиками в 1996 году установлена рентгеноструктурным методом структура продукта взаимодействия 6-метил-2-тиоурацила и бромэтинкетона [34]. Продуктом реакции является 3-бензоил-7-метил-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-5-он. Реакция представлена на схеме 11.

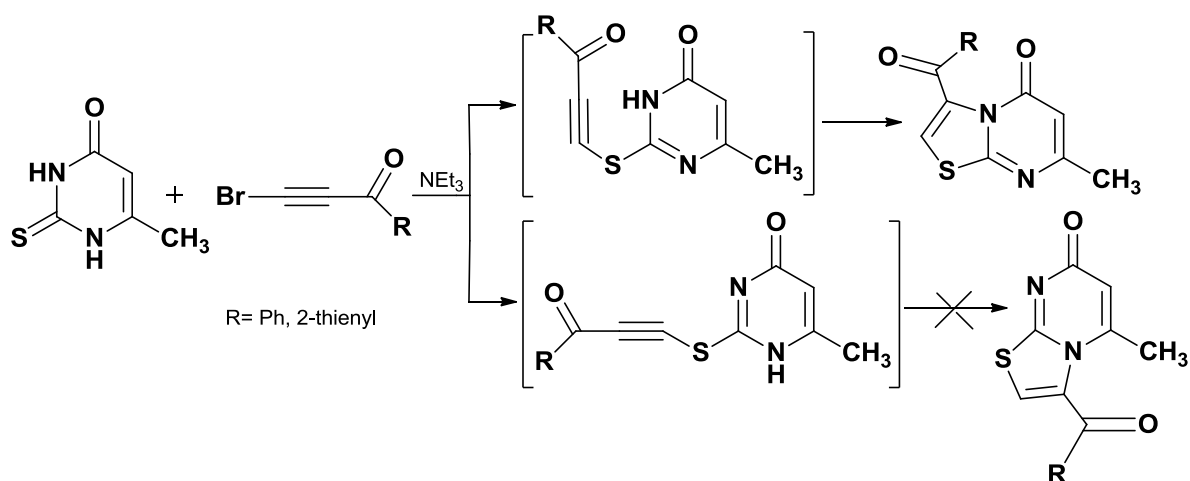


Схема 11 – Возможное образование двух региоизомеров

Продуктом взаимодействия 4-арил-3,4-дигидропиримидин-2(1*H*)-тионов с тозилатами алкинил(арил)йодония являются 5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидины, получаемые с хорошим выходом 67-80% [35]. Механизм

реакции продемонстрирован на схеме 12. Сера, являясь нуклеофильным центром, атакует атом йода в результате чего образуется промежуточный продукт **4**, последний претерпевает перегруппировку Кляйзена с получением интермедиата **5**. Отщепление йодбензола приводит к образованию соединения **6**, который подвергается циклизации в конечный продукт **3**.

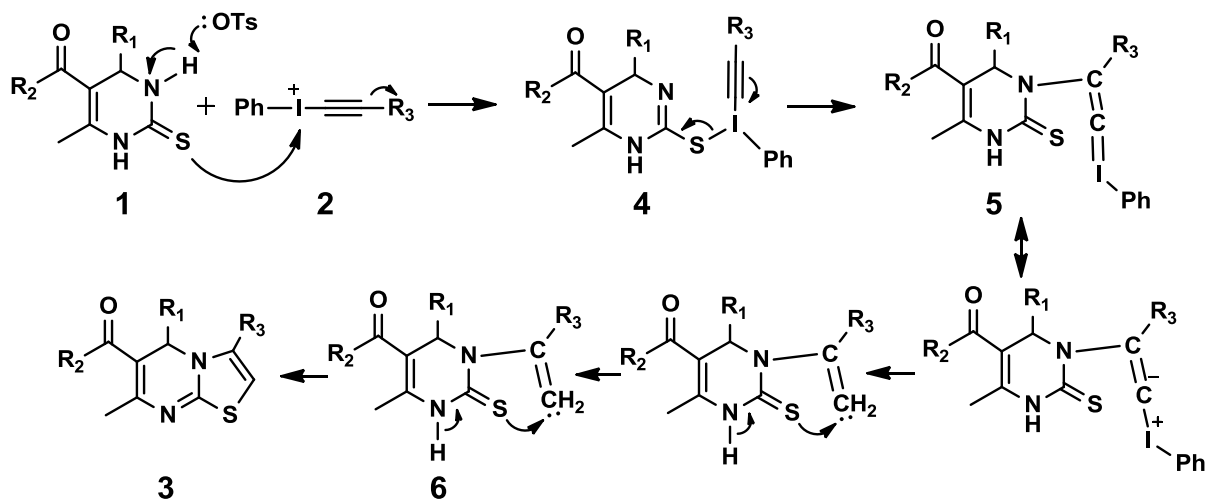
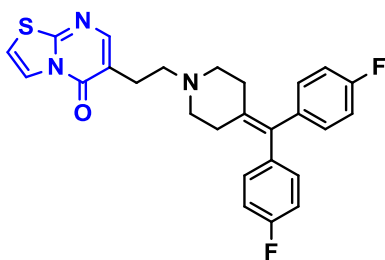


Схема 12 – Механизм реакции

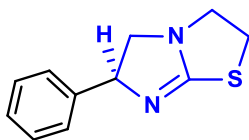
Ряд подобных реакций являются металл катализируемыми [36, 37]. В качестве катализаторов выступают соединения меди и палладия.

3 ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ 2-ТИОУРАЦИЛОВ И ТИАЗОЛО[3,2- α]ПИРИМИДИНОВ

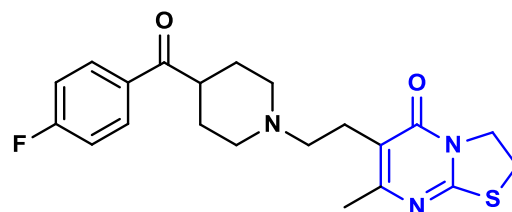
Ряд препаратов, относящихся к производным тиазоло[3,2- α]пиримидинов, широко используется в медицинской практике. К антипсихотическим средствам относятся – ритансерин и сетоперон, показанные на схеме 13 [38, 39]. Структура тиазолопиримидинов аналогична структуре мощного иммуномодулирующего препарата – левамизола, который также используется в качестве противогельминтного средства, представленного на схеме 13 [40].



Ритансерин



Левамизол



Сетоперон

Схема 13 – Структуры препаратов

Одними из наиболее изучаемых производных пиримидинов являются тиазоло[3,2-*a*]пиримидины, проявляющие широкий спектр биологической активности, в том числе и противовирусную, как и их предшественники – 2-тиоурацилы.

Еще в 1987 году совместно учеными из Индии и Бельгии установлена противовирусная активность производных 5-циано-2-тиоурацилов в отношении вируса полиомиелита, Коксаки, простого герпеса (HSV) и Семликовского лесного вируса [41]. В результате были выявлены семь препаратов, проявивших наибольшую противовирусную активность. Структуры соединений-лидеров продемонстрированы на схеме 14.

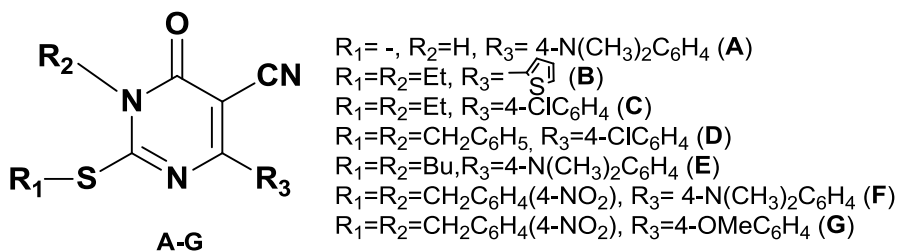


Схема 14– Структура соединений **A-G**

Препарат **A** проявил высокую активность сразу против двух штаммов вирусов – Коксаки и Герпеса; препарат **B** – против вируса полиомиелита; соединения **C-G** показали умеренную активность против вируса Герпеса и вируса леса Семлики.

Общепринятая терапия Гепатита С на протяжении долгого времени включала препараты на основе интерферонов, а также рибавирин [42]. С 2010 года корпорации начали разрабатывать новую стратегию борьбы с

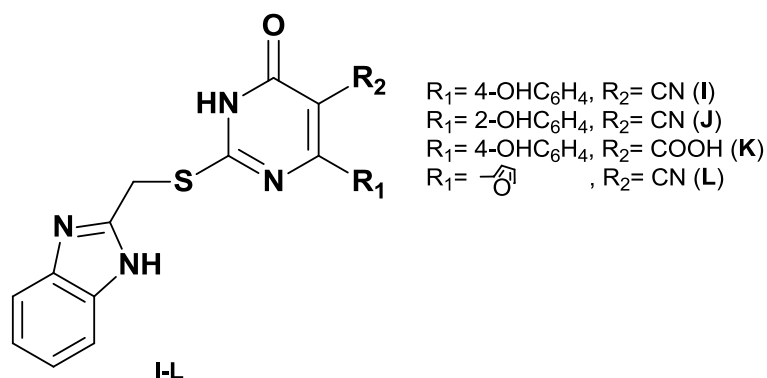


Схема 16 - Структура соединений **I-L**

Производные 2-тиоурацила активны не только против вируса Гепатита С, но и против вируса Гепатита В [46]. В результате найдено соединение, продемонстрированное на схеме 17, проявляющее наибольшую ингибирующую активность и наименьшую цитотоксичность из исследуемых.

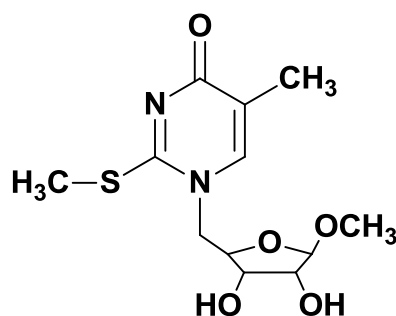
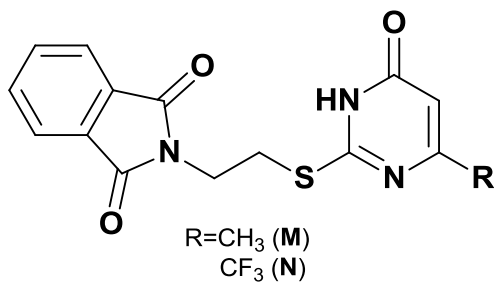


Схема 17 – Структура метил 5-дезоксид-5-[5-метил-2-(метилсульфанил)урацил-1-ил]-β-D-рибофуранозид

В многочисленных работах [47-50] описана активность производных 2-тиоурацилов в отношении вируса иммунодефицита человека первого и второго типов (ВИЧ-1/2).

В 2005 году ученым из России синтезирован ряд 2-тиоурацилов, одно из которых **M** проявило наибольшую активность против ВИЧ-1. Структура одного из перспективных соединений представлена на схеме 18 [47].



Для соединения **M**:

ЦТД₅₀=117,0 мг/мл

ЭД₅₀=1,9 мг/мл

ХТИ=61,6

Схема 18 – Структура соединений **M**, **N**

В результате замены метильной группы в четвертом положении пиримидинового кольца на трифторметильную соединение **N** приобретает активность как против ВИЧ-1, так и против ВИЧ-2 [48]. Результаты исследования приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Активность соединения **N** в отношении ВИЧ-1/2

	ЭД ₅₀ , ВИЧ-1	ЭД ₅₀ , ВИЧ-2	ЦТД ₅₀	ХТИ, ВИЧ-1	ХТИ, ВИЧ-2
N	124,77	66,37	>270,80	2,17	4,08
Тенофовир	0,03	0,04	3,48	133,95	80,93
Плериксафор	0,02	0,03	1,99	99,50	81,22

Относительно известных препаратов активность соединения **N** невысока, что указывает на необходимость дальнейшей направленной модификации структуры.

Итальянскими химиками был найден препарат **O**, активность которого превышает активность Невирапина и Эфавиренза и близка к активности Зидовудина [49]. Структура препарата представлена на схеме 16, данные о противовирусной активности внесены в таблицу 2.

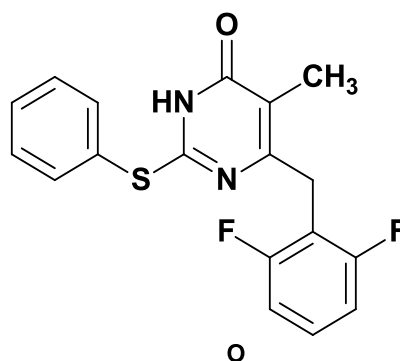


Схема 19 – Структура соединения **O**

Таблица 2 – Анти ВИЧ-1 активность препарата **О**

	ЭД ₅₀	ЦТД ₅₀	ХТИ
О	0,09	72,70	835
Невирапин	0,05	7,50	144
Эфавиренз	0,001	0,32	320
Зидовудин	0,003	3,70	1233

Соединения подобной структуры встречаются и в дальнейших исследованиях.

Так, в 2009 году совместно учеными из Китая и Бельгии обнаружен препарат **Р**, представленный на схеме 20, противовирусная активность которого превышает используемые средства Невирапин и Делавирдин и близка к активности Эфавиренза [50]. Результаты представлены в таблице 3.

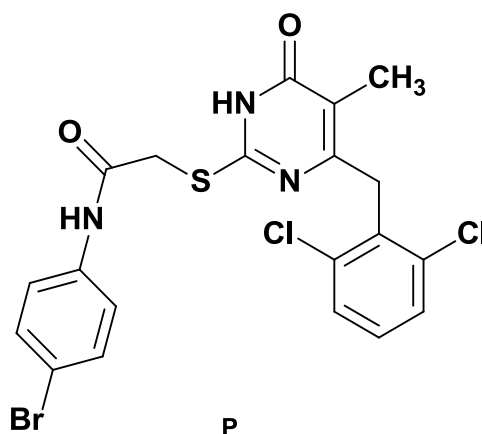


Схема 20 – Структура соединения **Р**

Таблица 3 – Активность препарата **Р**

	ЭД ₅₀	ЦТД ₅₀	ХТИ
Р	0,18	>243,56	1326
Невирапин	0,21	15,02	72
Делавирдин	0,32	3,83	12
Эфавиренз	0,004	6,34	1434
Зидовудин	0,015	93,55	6192

Соединения подобной структуры **Q-T**, представленные на схеме 21, показали сильную активность против вирусов гриппа А, В [51]. Так, соединение **S** обладает широкой активностью против гриппа А (ЭД₅₀ составляет 9 мкМ (А/Н1N1), 18 мкМ (А/Н3N2) и гриппа В (ЭД₅₀ - 33 мкМ).

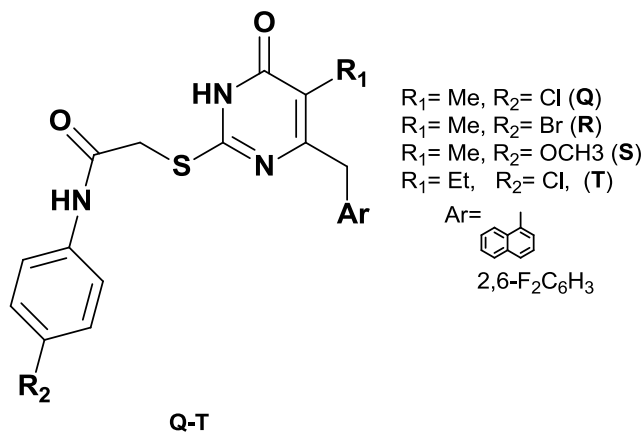


Схема 21 – Структура соединений **Q-T**

Одним из возбудителей острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) является вирус SARS-CoV, впервые обнаруженный в 2002 году. Репликацию вируса катализируют две протеазы 3С_{pro} и PL_{pro} – мишени для разработки препаратов против вируса [52]. В работе доказана активность препарата **U**, действующего как ингибитор 3С_{pro}-протеазы, с ЭД₅₀ 6,1 мкМ, описанный на схеме 22.

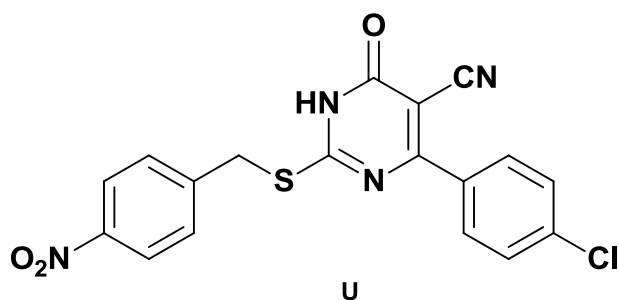


Схема 22 – Структура соединения **U**

Тиазоло[3,2-α]пиримидины проявляют противовирусную активность в отношении простого вируса герпеса первого типа – ВПГ-1 [53, 54].

В работе [53] установлено, что в концентрациях 30-40 мг/мл препарат **V**, структурная формула которого представлена на схеме 23, эффективнее

известного противовирусного средства ацекловира. Сравнительные данные внесены в таблицу 4.

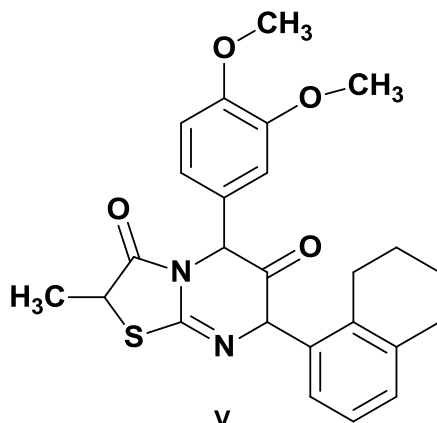


Схема 23 – Структура соединения **V**

Таблица 4 – Активность препарата **V**

Концентрация мг/мл	Соединение V	Ацекловир
	% ингибирования ВПГ-1	
30	80	10
40	90	15

В исследовании [54] обнаруженная активность соединений **W-Y**, представленных на схеме 24, близка к препарату афидиколину, сравнительная характеристика дана в таблице 5.

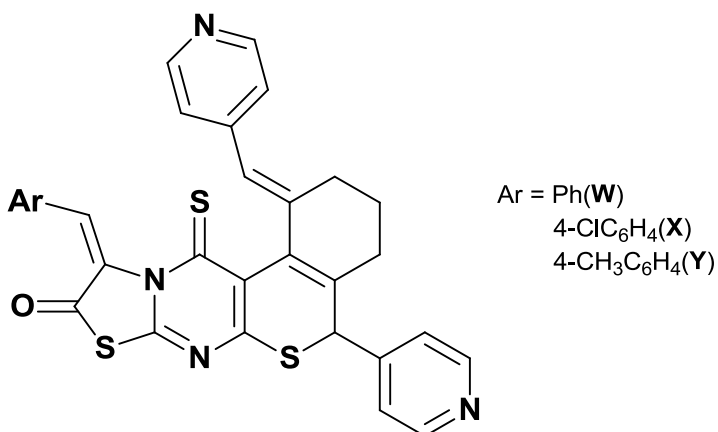


Схема 24 – Структура соединений **W-Y**

Таблица 5 – Активность препаратов W-Y

	% Уменьшения бляшек вируса	ЭД ₅₀ , мкМ
W	82	0,22
X	88	0,20
Y	85	0,21
Афидиколин	100	0,15

В работе [55] вещества **Z1-3**, представленные на схеме 25, проявляют относительно хорошую ингибирующую активность обратной транскриптазы ВИЧ-1.

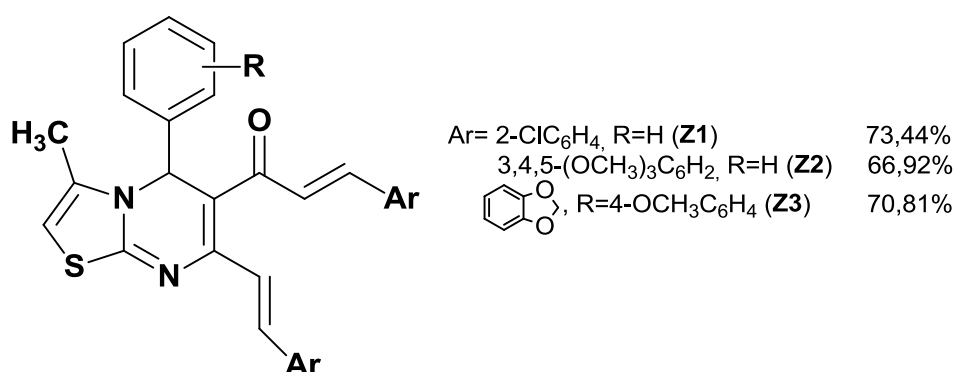


Схема 25 – Структура соединений **Z1-3**

4 ВЫВОДЫ ПО АНАЛИТИЧЕСКОМУ ОБЗОРУ

В ходе аналитического обзора изучены научные труды, посвященные тематике данной дипломной работы. В результате были рассмотрены методы синтеза исходных 2-тиорациллов и тиазоло[3,2- α]пиримидинов, а также их противовирусная активность.

Вопрос синтеза конденсированных 3-фосфорилированных соединений в результате реакций хлорэтинфосфонатов с бинуклеофилами достаточно хорошо изучен сотрудниками кафедры органической химии СПбГТИ(ТУ). Однако в литературе нет упоминания о 3-фосфорилированных тиазоло[3,2- α]пиримидинах.

В литературе также не встречаются исследования активности тиазолопиримидиновых структур в отношении вируса гриппа А. Замещённые 2-тиоурацилы и тиазолопиримидины обладают широким спектром биологической активности, однако в работе рассмотрена лишь их противовирусная активность.

5 ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основной и второстепенной целью данной работы являются синтез производных диэтил(7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2- α]пиримидин-3-ил)фосфонатов и определение их противовирусной активности в отношении вируса гриппа А/PR/8/34(H1N1) соответственно.

Для достижения поставленных целей были решены следующие задачи

- 1 Провести реакцию 6-арил-5-циано-2-тиоурацилов с диэтилхлорэтинфосфонатом, представляющую собой одновременное введение фосфорсодержащей группы и внутримолекулярную циклизацию, приводящую к образованию конденсированных тиазоло[3,2- α]пиримидиновых структур
- 2 Определить структуру полученных соединений на основании данных современных физико-химических методов анализа – спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{19}F , масс-спектрометрии высокого разрешения, рентгеноструктурного анализа
- 3 Определить активность препаратов в отношении вируса гриппа А/PR/8/34(H1N1) *in vitro*
- 4 Найти соединение-лидера среди полученных фосфорилированных препаратов.

6 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

6.1 ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры ЯМР зарегистрированы на спектрометрах Bruker Ascend 400 на частотах 400.13 МГц (^1H), 100.61 МГц (^{13}C), 161.98 МГц (^{31}P) и 40.54 МГц (^{15}N), 19.83 МГц (^{19}F).

Спектры снимались в дейтерированном диметилсульфоксиде ($\text{DMSO-}d_6$). Температуры плавления измеряли на столике Кофлера (VEB Wägetechnik Rapido, РНМК 81/2969).

ИК-спектры записывали на спектрометре Shimadzu FTIR-8400S в таблетках KBr.

Масс-спектры высокого разрешения были записаны на масс-спектрометре Bruker MicrOTOF при ионизации вещества распылением в электрическом поле (ESI); температура ионизационной камеры 180°C , напряжением ионизации 70 Эв и 100 Эв.

Рентгеноструктурный анализ выполнен на дифрактометрах Agilent Technologies Excalibur Eos и SuperNova, Dual, Cu at zero, Atlas.

Программное обеспечение, использованное при написании данной работы: «MestReNova» (обработка ЯМР спектров), «ChemDraw» (визуализации структурных формул химических соединений), «MagicPlot» (обработка ИК-спектров), «Olex» (обработка рентгеноструктурных данных).

Использованные в синтезах растворители были предварительно очищены и абсолютированы стандартными методиками [56, 57].

6.2 СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 6-АРИЛ-5-ЦИАНО-2-ТИОУРАЦИЛОВ

В круглодонную колбу объемом 100 мл добавляли свежеприготовленный метилат натрия (0,01 моль), соответствующий бензальдегид (0,01 моль), тиомочевину (0,01 моль), цианоуксусный эфир (0,01 моль), 40 мл метилового спирта. Смесь кипятили, активно

перемешивали на магнитной мешалке. Ход реакции отслеживали методом тонкослойной хроматографии. После в реакционную массу добавляли дистиллированную воду до прекращения выпадения осадка. Последний подкисляли концентрированной соляной кислотой до слабокислой реакции среды. Выпавший осадок фильтровали под вакуумом и перекристаллизовывали из этилового спирта

6.3 СИНТЕЗ ДИЭТИЛ(7-(4-АРИЛ)-6-ЦИАНО-5-ОКСО-5H-ТИАЗОЛО[3,2-*a*]ПИРИМИДИН-3-ИЛ)ФОСФОНАТОВ

Смесь 0,001 моль диэтилхлорэтинфосфоната, 0,001 моль соответствующего 6-арил-5-циано-2-тиоурацила, 10 мл абсолютного ацетонитрила и 0,0012 моль карбоната калия интенсивно перемешивали при комнатной температуре в течение 2–6 ч. По окончании реакции осадок отфильтровывали и промывали этиловым спиртом. Фильтрат упаривали в вакууме водоструйного насоса. Осадок перекристаллизовывали из этилацетата.

6.4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТОВ

Определение цитотоксичности, а также противовирусной активности препаратов выполнены ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. Исследования, проведенные в работе, выполнены в соответствии с известными методиками [58].

Односуточную культуру клеток MDCK, выращенную на 96-луночных планшетах, концентрация клеток 10^4 /лунку планшета, проверили визуально под микроскопом на целостность монослоя. В работу отбирали планшеты, где сомкнутость клеток составляла 95% и выше.

Приготовили серию двукратных последовательных разведений (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,8 мкг/мл соответственно) препаратов **3а-е** в поддерживающей питательной среде для клеток MDCK.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													1000 мкг/мл
B													500 мкг/мл
C													250 мкг/мл
D													125 мкг/мл
E													62,5 мкг/мл
F													31,25 мкг/мл
G													15,63 мкг/мл
H													7,8 мкг/мл

Рисунок 1 – Схема планшета для тестирования токсичности. Разными цветами обозначены лунки, используемые для тестирования препаратов **3а-е**. Белым цветом обозначен контроль клеток.

Планшеты двукратно промывали теплой средой альфа-MEM, после чего на клетки монослоя в планшете вносили разведенные препараты в соответствующей концентрации в объеме 100 мкл в каждую лунку в 2 повторах на каждую тестируемую концентрацию. Планшеты инкубировали 72 часа при температуре 37°C в присутствии 5% CO₂. На конечном сроке проводили оценку результата визуально в инвертированном микроскопе, оценивая состояние монослоя в присутствии разных концентраций препарата по сравнению с клетками в контрольных лунках.

Оценка жизнеспособности клеток велась при помощи МТТ. МТТ-тест основан на восстановлении МТТ (желтый водорастворимый тетразолиевый краситель) под действием дегидрогеназ живых клеток с образованием голубых кристаллов формазана, количество которого измеряется спектрофотометрически.

Раствор МТТ готовили в физиологическом растворе в концентрации 0,5 мг/мл. Перед внесением раствора МТТ клетки промывали 0,1 мл физиологического раствора. Далее вносили 0,1 мл раствора МТТ в каждую лунку. После 1,5 часа контакта МТТ при 37°C при концентрации CO₂ 5% с клетками лунки промывали и заливали 0,1 мл этилового спирта 96%, после чего оптическую плотность в лунках измеряли на ридере Victor 2 1440 при длине волны 535 нм. Основываясь на полученных данных, рассчитывали ЦТД₅₀ - дозу препарата в лунке, при которой погибает 50% клеток - с помощью метода линейной регрессии.

6.5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ

В 96-луночный планшет, содержащий монослойную культуру клеток MDCK, добавляли двукратные разведения препаратов, начиная с 0,5 от ЦТД₅₀, растворенные в клеточной среде. Планшеты выдерживали в CO₂ инкубаторе в течение 1 часа при температуре 37°C. В лунки с клеточной культурой и препаратом добавляли 10-кратное разведение вируса от 10⁻¹ до 10⁻⁶. В качестве контроля использовали клеточную среду. Планшеты с препаратом и вирусом выдерживали в CO₂ инкубаторе в течение 48 часов при температуре 37°C.

Активность вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1) определяли реакцией гемагглютинации (РГА) с куриными эритроцитами. В лунки планшета переносили по 100 мкл вирусосодержащей среды из соответствующей лунки планшета для клеточных культур, после добавляли равное количество 1% суспензии куриных эритроцитов. Выдерживали планшеты при комнатной температуре в течение 30-40 минут. За титр вируса принимали наибольшее разведение вируса, вызвавшее полную агглютинацию эритроцитов. Противовирусная активность препаратов оценивалась снижением титра вируса по сравнению с контролем. Доза

препарата, при которой титр вируса снижается вдвое, – ЭД₅₀ рассчитывали на основании полученных данных.

Основным критерием противовирусной активности препаратов является химиотерапевтический индекс (ХТИ), определявшийся отношением ЦТД₅₀ к ЭД₅₀.

7 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выпускная квалификационная работа является продолжением последних исследований, проведенных на кафедре органической химии СПбГТИ(ТУ), связанных с изучением реакционной способности хлорацетиленфосфонатов в реакциях с N,S-бинуклеофилами.

Предыдущие работы [12-17] легли в основу данного исследования.

7.1 ТАУТОМЕРНЫЕ ФОРМЫ 2-ТИОУРАЦИЛОВ

Современными методами физико-химического анализа органических соединений, включая ИК и ЯМР-спектроскопию на ядрах ¹H, ¹³C было подтверждено существование 2-тиоурацилов в виде 2-тиоксо-2,3-дигидропиримидин-4(1*H*)-онов.

Так, в ИК спектрах синтезированных 2-тиоурацилов наблюдается полоса поглощения C=O лактамной формы при 1658-1691 см⁻¹ в твердом состоянии.

В спектрах ЯМР ¹H присутствуют синглетные сигналы протонов у атомов азота при 13.14-13.20 м.д. и при 13.18-13.33 м.д. На рисунке 2 представлен спектр ПМР 6-(4-изопропилфенил)-5-циано-2-тиоурацила.

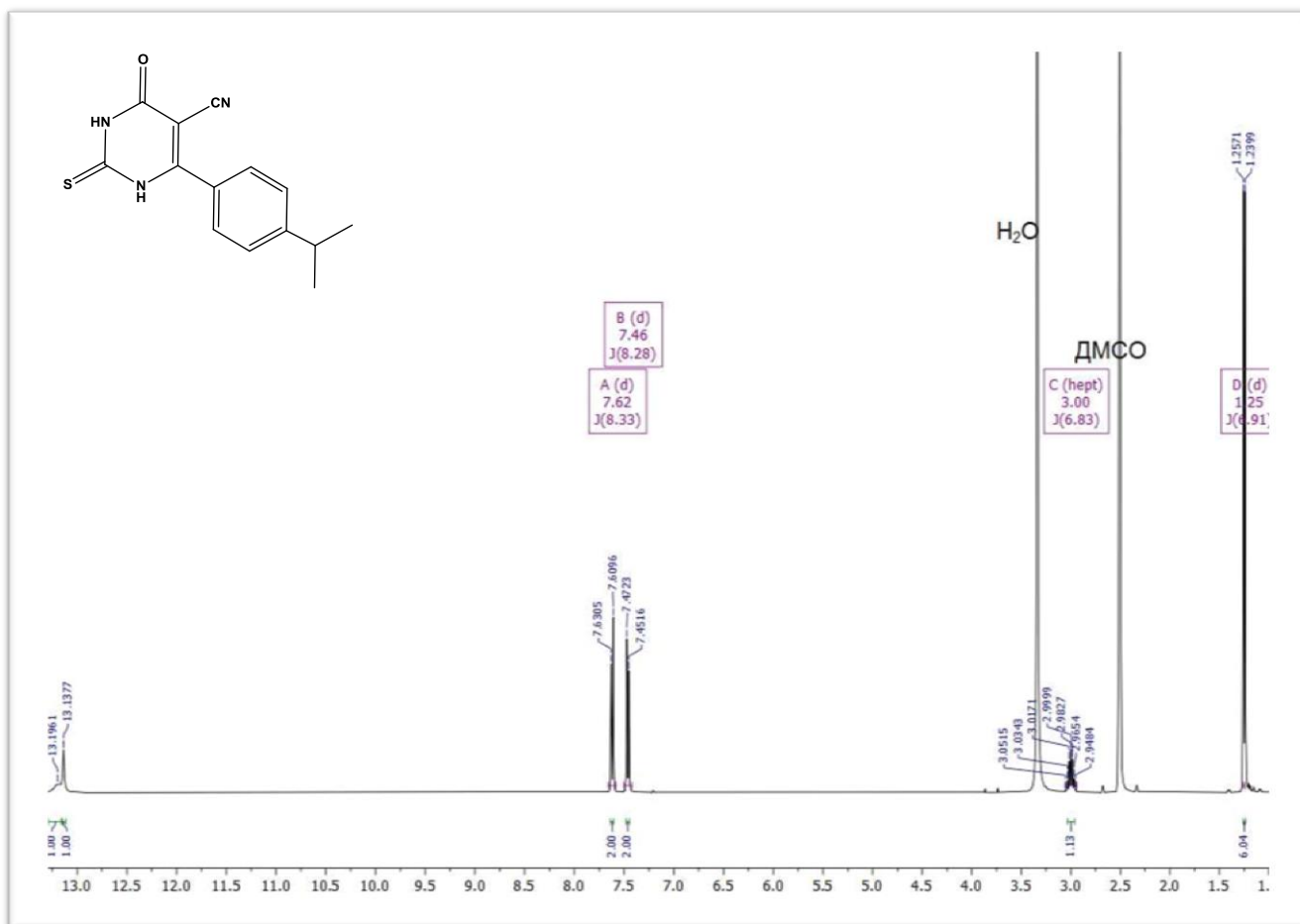


Рисунок 2 – Спектр ЯМР¹H 6-(4-изопропилфенил)-5-циано-2-тиоурацила

В спектре ¹³C присутствуют сигналы карбонильного атома углерода при 159.37-161.41 м.д., а также атома углерода тионной группы при 176.51-176.95 м.д. Все спектры были записаны в растворе ДМСО-d₆. Спектр ¹³C показан на рисунке 3.

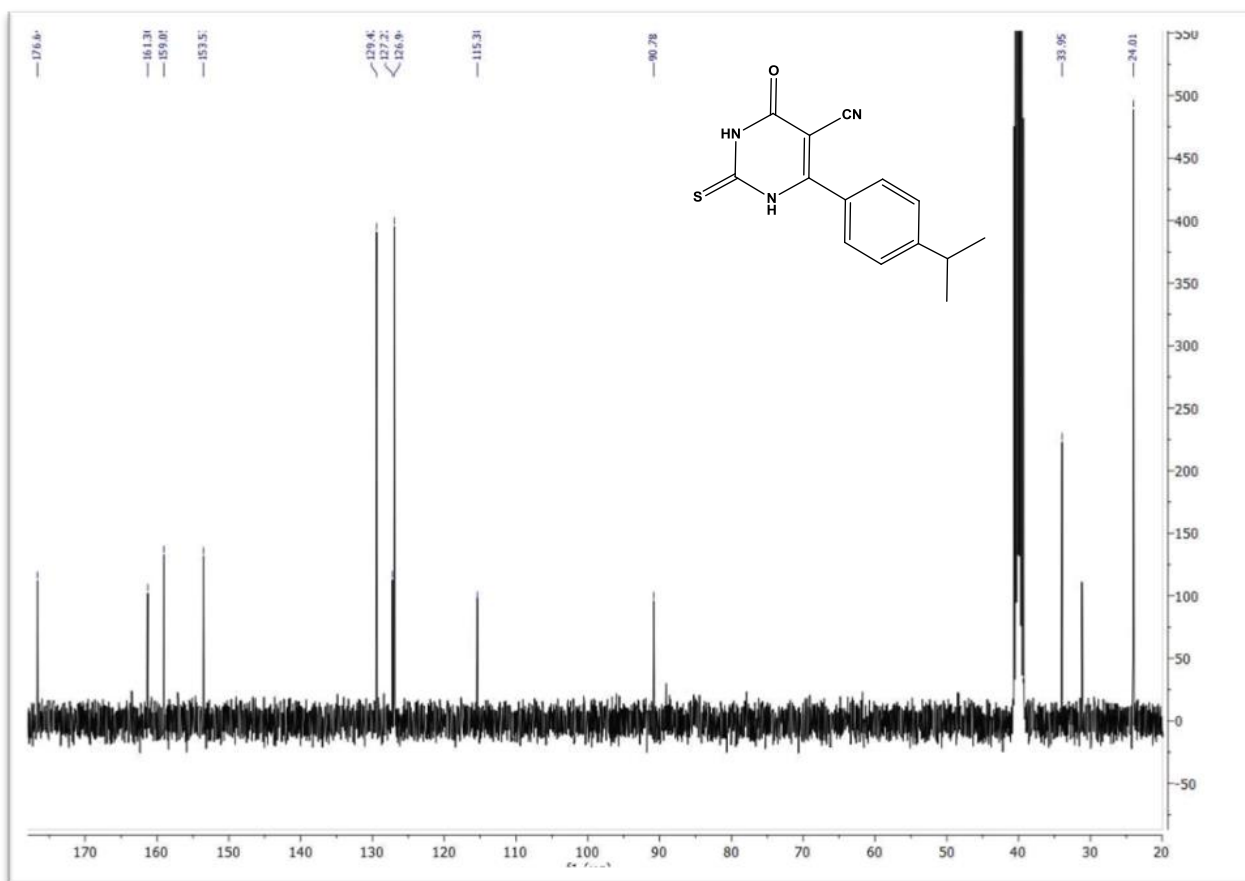
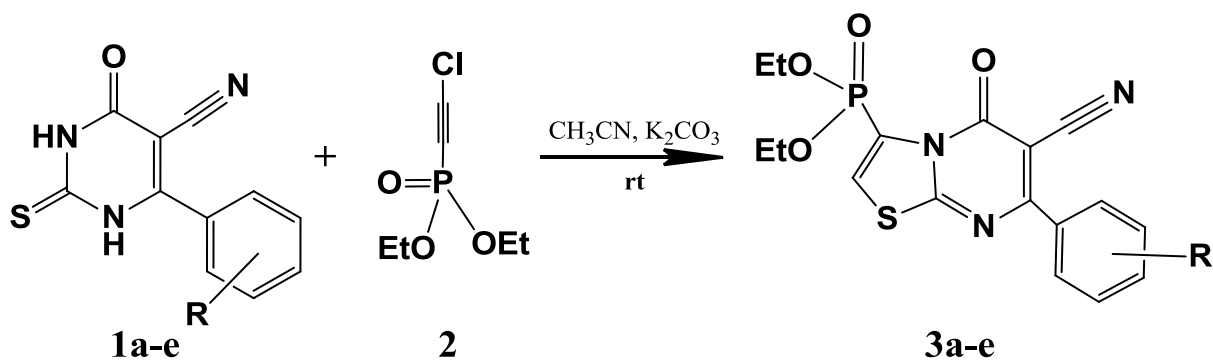


Рисунок 3 – Спектр ЯМР ¹³C 6-(4-изоприпилфенил)-5-циано-2-тиоурацила

7.2 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 6-АРИЛ-5-ЦИАНО-2-ТИОУРАЦИЛОВ С ДИЭТИЛХЛОРЕТИНФОСФОНАТОМ

Известно, что в 6-арил-5-циано-2-тиоурацилах наиболее нуклеофильным является S-центр, менее – центры N₁, N₃. Следовательно, теоритически в результате реакции 6-арил-5-циано-2-тиоурацилов с диэтилхлорэтинфосфонатом можно ожидать образования двух продуктов реакции: 5-оксо и 7-оксо изомеров. Образование первого происходит при циклизации по третьему атому азота N₃, второго – при циклизации по первому атому азота N₁. Уравнение реакции приведено на схеме 26.



R = H (3a), 4-*i*Pr (3b), 3-Cl (3c), 3,4-Cl₂ (3d), 2-F (3e)

Схема 26 – Взаимодействие 6-арил-5-циано-2-тиоурацилов с
диэтилхлорэтинфосфонатом

Однако в спектре ЯМР ³¹P не наблюдается образование смеси двух различных изомеров. Реакция проходит регио- и хемоселективно с образованием одного продукта - 5-оксоизомера, структура которого однозначно подтверждена методом рентгеноструктурного анализа для соединений **3b** и **3d**, показанных на рисунках 7 и 8.

Электронная плотность в хлорацетиленфосфонатах смещена в сторону фосфонатной группы, что обуславливает первичную атаку хлорацетиленового атома углерода нуклеофильного центра 2-тиоурацила, в частности атома серы, далее, вероятно, происходит отщепление хлор-аниона, приводящее к образованию сульфениевого катиона, в котором поляризация меняется на противоположную относительно исходного хлорэтинфосфоната. Почти одновременно происходит атака второго нуклеофильного центра 2-тиоурацила – атома азота N₃ – атомом углерода, ближайшим к фосфонатной группе, что приводит к образованию пятичленного гетероцикла.

Предполагаемый путь реакции хлорацетиленфосфонатов с замещенными 2-тиоурацилами представлен на схеме 27.

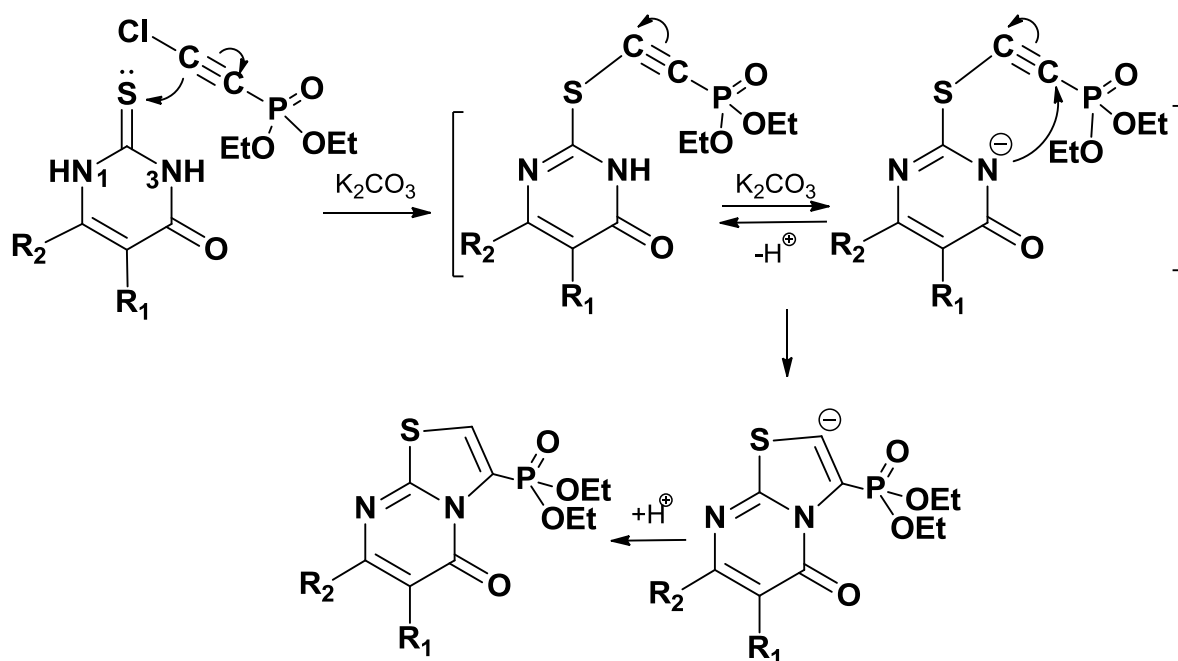


Схема 27 – Предположительный путь реакции

Строение полученных соединений **3a-e** устанавливали по данным спектроскопии ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{31}P , рентгеноструктурного анализа и масс-спектрометрии.

Выводы о селективности реакций и бициклической структуре полученных продуктов сделаны на основании данных ЯМР ^{31}P .

Так, в спектре ЯМР ^{31}P соединений **3a-e** присутствует сигнал в сильном поле δ_{P} 0.36–0.49 м. д., химический сдвиг которого входит в область образования циклических продуктов, установленную в предыдущих работах [12-17]. Спектр ЯМР ^{31}P 7-(4-изопропилфенил)-6-циано-5-оксо-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-илфосфоната **3b** показан на рисунке 4.

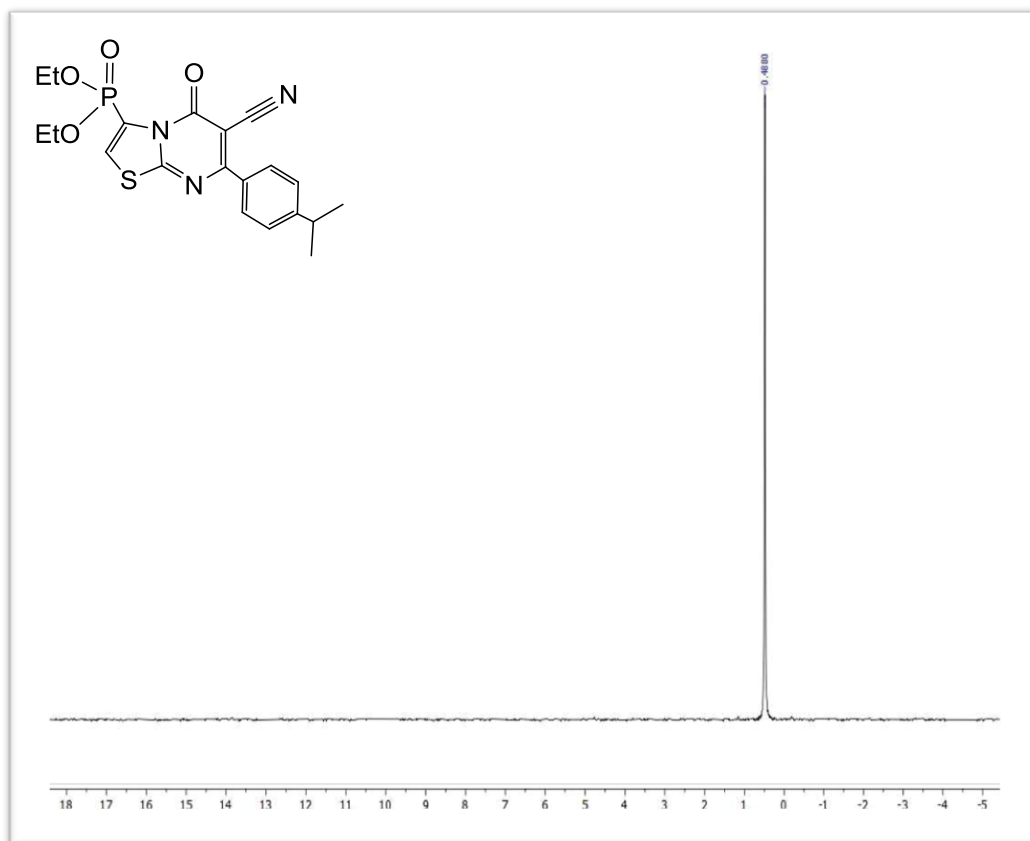


Рисунок 4 - Спектр ЯМР ^{31}P 7-(4-изопропилфенил)-6-циано-5-оксо-5H-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-илфосфоната **3b**

Доказательством образования тиазолопиримидиновой структуры является наличие характерного дублетного сигнала протона у sp^2 -гибридизованного атома углерода в слабом поле спектра ЯМР ^1H при 8.29-8.34 м.д., третья константа спин-спинового взаимодействия которого с ядром фосфора оставляет 7.3 Гц. Данный протон обозначен H_A и показан на рисунке 5.

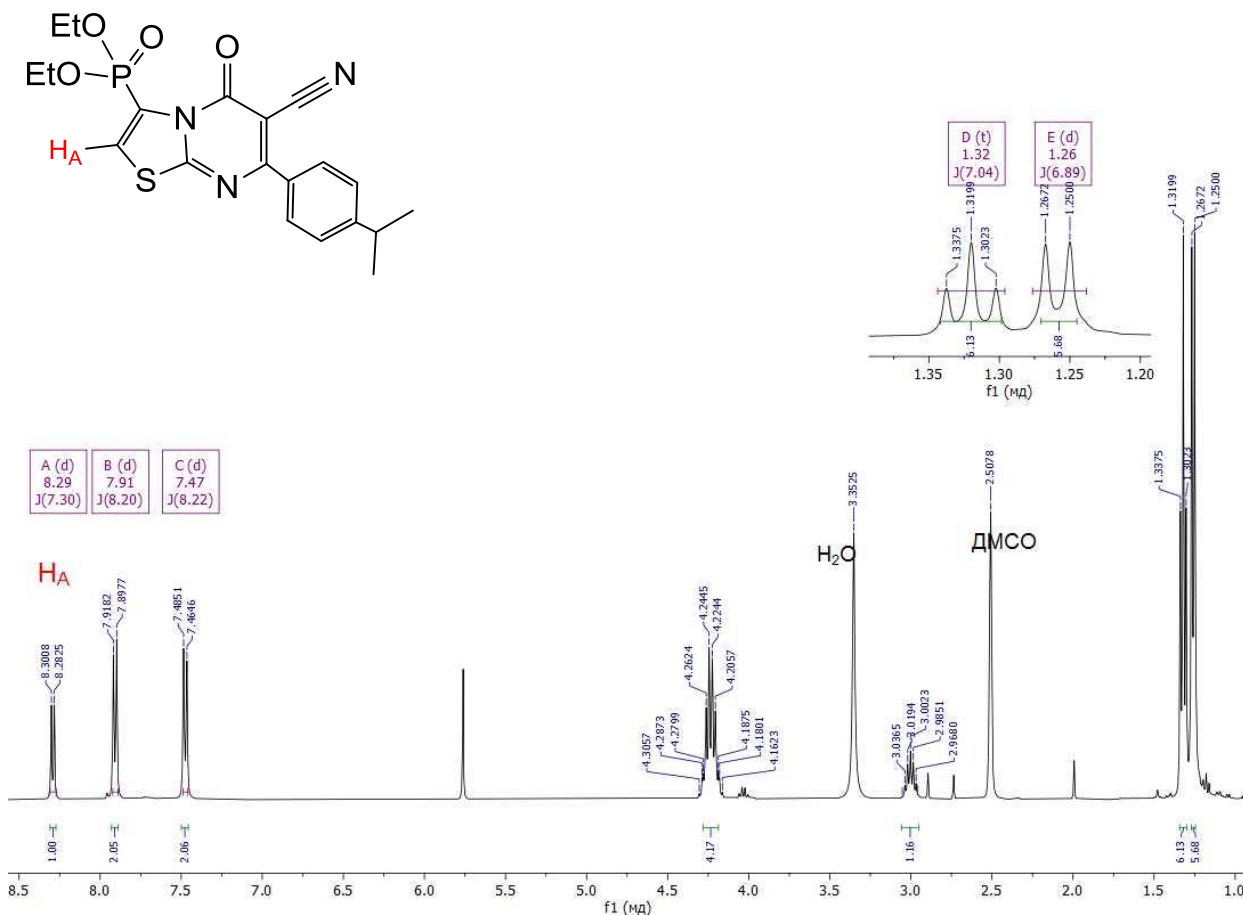


Рисунок 5 – Спектр ЯМР ^1H соединения **3b**

Наличие констант спин-спинового взаимодействия с ядром фосфора трех углеродов тиазольного кольца подтверждают образование последнего. Так, в спектрах ЯМР ^{13}C олефиновые углероды, обозначенные на рисунке 6 C_A и C_B соответственно, резонируют дублетными сигналами в области 127.65 – 127.83 м. д. с большой первой КССВ от ядра фосфора $^1J_{\text{CP}} = 216.1\text{--}216.9$ Гц и 130.36– 130.91 м. д. с меньшей КССВ с ядром фосфора $^2J_{\text{CP}} = 12.8\text{--}14.2$ Гц. Сигнал ядра углерода, входящего как в тиазольное, так и в пиримидиновое кольцо и обозначенный на рисунке 6 C_C , имеет химический сдвиг при 167.33– 167.95 м.д. с третьей КССВ от ядра фосфора $^3J_{\text{CP}} = 9.4\text{--}9.8$ Гц.

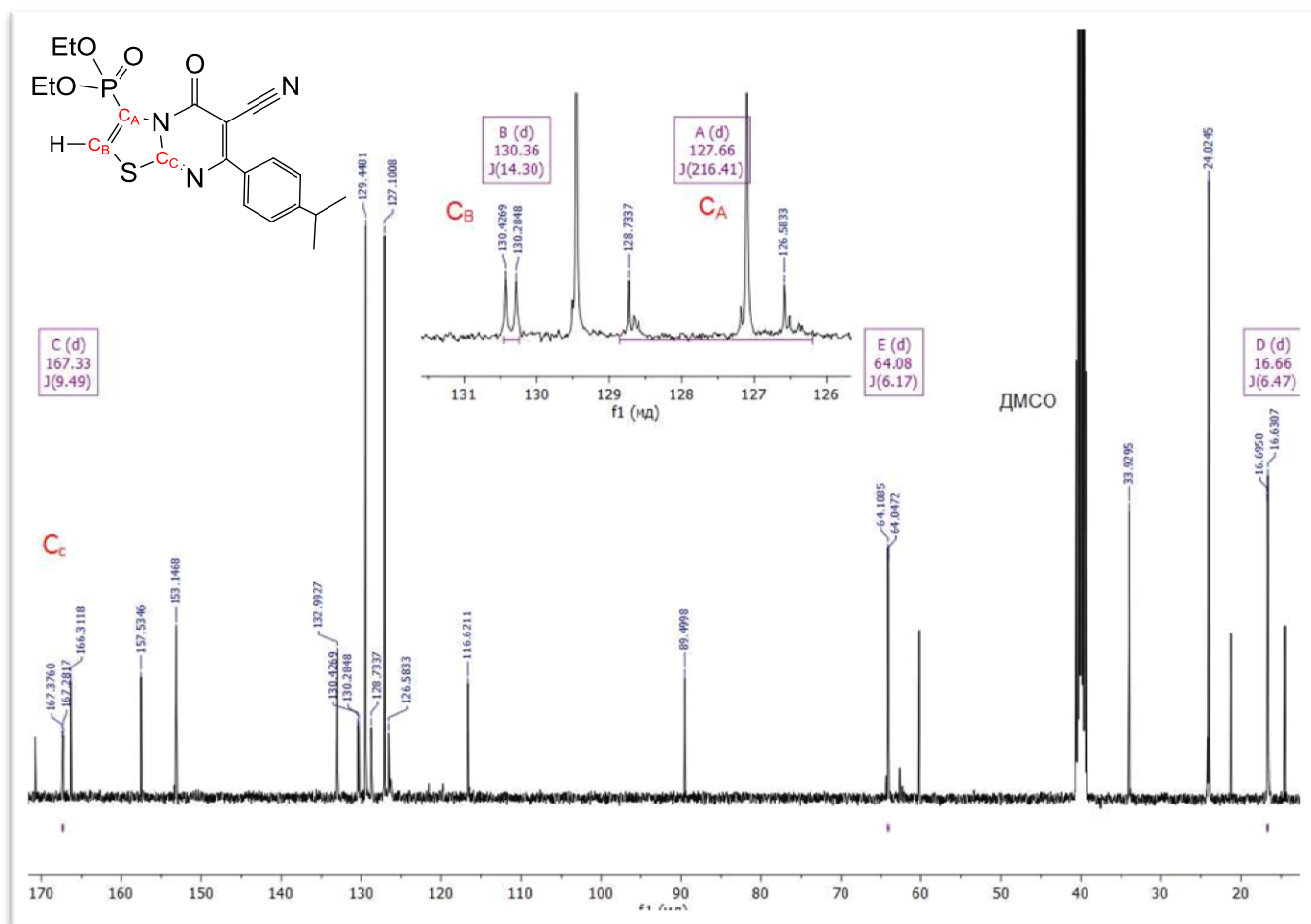


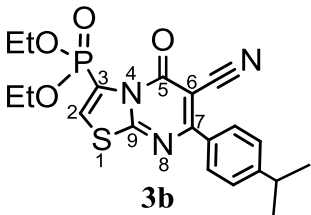
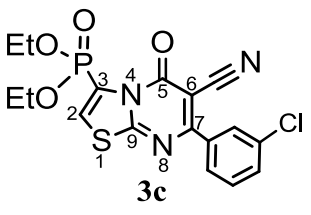
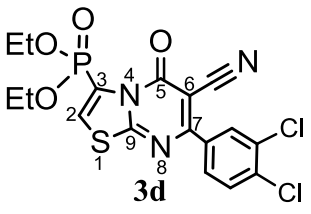
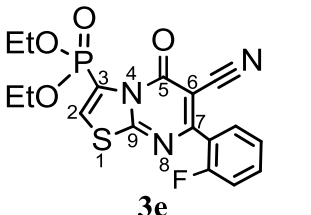
Рисунок 6 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **3b**

Спектральные характеристики соединений **3a-e** и масс-спектрометрия высокого разрешения (HRMS-ESI) представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Характерные параметры ЯМР спектров ^1H , ^{13}C , ^{31}P и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS-ESI) фосфонатов **3a-e**.

Соединение	^1H , δ_{H} , м.д. H_2	^{13}C , δ_{C} , м.д.			^{31}P , δ_{P} , м.д.	m/z, [M+nNa] ⁺
		C ₂	C ₃	C ₉		
 3a	8.30 d $^3J_{\text{HP}}=7.3$	127.65 d $^1J_{\text{CP}}=216.9$	130.52 d $^2J_{\text{CP}}=14.2$	167.48 d $^3J_{\text{CP}}=9.8$	0.49	412.0491

Продолжение таблицы 6

Соединение	^1H , δ_{H} , М.Д. H_2	^{13}C , δ_{C} , М.Д.			^{31}P , δ_{P} , М.Д.	m/z, [M+nNa] ⁺
		C ₂	C ₃	C ₉		
 <p>3b</p>	8.29 d $^3J_{\text{HP}}=7.3$	127.66 d $^1J_{\text{CP}}=216.5$	130.36 d $^2J_{\text{CP}}=14.2$	167.33 d $^3J_{\text{CP}}=9.5$	0.49	454.0961
 <p>3c</p>	8.33 d $^3J_{\text{HP}}=7.3$	127.73 d $^1J_{\text{CP}}=216.1$	130.80 d $^2J_{\text{CP}}=13.9$	167.63 d $^3J_{\text{CP}}=9.4$	0.40	424.0282*
 <p>3d</p>	8.33 d $^3J_{\text{HP}}=7.3$	127.75 d $^1J_{\text{CP}}=216.5$	130.89 d $^2J_{\text{CP}}=12.8$	167.65 d $^3J_{\text{CP}}=9.7$	0.36	479.9712
 <p>3e</p>	8.34 d $^3J_{\text{HP}}=7.3$	127.83 d $^1J_{\text{CP}}=216.2$	130.91 d $^2J_{\text{CP}}=14.1$	167.95 d $^3J_{\text{CP}}=9.6$	0.43	430.0427*

* m/z, [M+nH]⁺

Выходы и температуры плавления полученных веществ **3a-e** представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Выходы и температуры плавления соединений **3a-e**

Соединение	Выход, %	T _{плав} , °C
3a	89	158
3b	87	119
3c	83	155
3d	85	178
3e	87	141

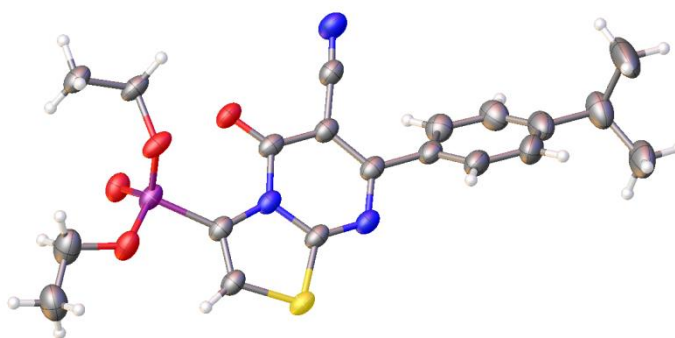


Рисунок 7 – Геометрия диэтил(7-(4-изоприлфенил)-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфоната **3b**

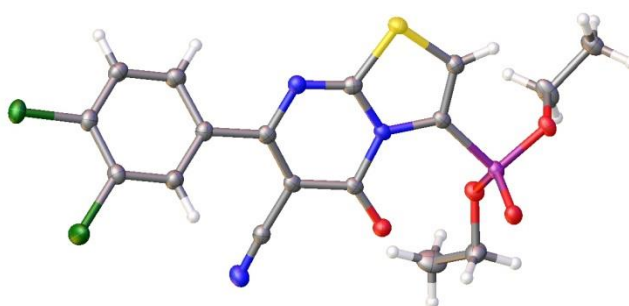
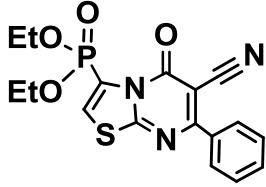
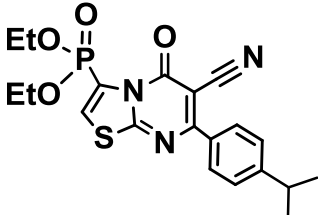
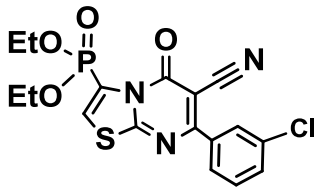
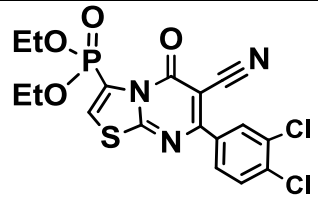
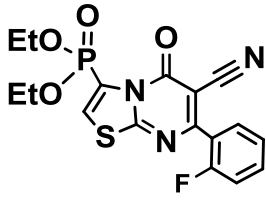


Рисунок 8 – Геометрия диэтил(7-(3,4-хлорфенил)-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфоната **3d**

7.3 ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ В ОПЫТАХ *IN VITRO*

На первом этапе определили 50% цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀) каждого препарата **3a-e** в культуре клеток MDCK. Затем установили 50% эффективную дозу (ЭД₅₀). Отношением ЦТД₅₀ к ЭД₅₀ определили химиотерапевтический индекс полученных препаратов. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Активность соединений **3a-e** в отношении вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1) *in vitro*

Соединение	Номер	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ХТИ
	3a	439,00	96,30	4,56
	3b	122,00	56,9	2,14
	3c	412,00	89,60	4,60
	3d	50,00	9,60	5,21
	3e	353,00	18,00	19,61

При введении в фенильное кольцо:

1. Изопропиловой группы в 4-е положение токсичность препарата **3b** возрастает в 3,5 раза по отношению к незамещенному производному **3a**, а активность соединения падает в 2 раза.
2. Атома фтора во 2-е положение токсичность соединения **3e** сравнима с незамещенным препаратом **3a**, но при этом химиотерапевтический индекс увеличивается в 4 раза и составляет 19,61.

3. Атома хлора в 3-е положение показатели ЦТД₅₀, ЭД₅₀ и ХТИ сравнимы с показателями препарата **3a**.

Необходимо отметить, что при введении второго атома хлора в структуру фенильного кольца наблюдается возрастание токсичности препарата **3d** примерно в 8 раз по отношению к монозамещенному производному **3c**, однако значения химиотерапевтических индексов обоих препаратов сравнимы.

Сравнив значения полученных параметров между замещенными производными диэтил(7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфонатов **3b-e** и диэтил(5-оксо-7-фенил-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфонатом **3a**, можно сделать следующие заключения:

1. В структуру не рекомендуется вводить изопропиловую группу. В работе недостаточно данных для заключения о том, что алкильные группы уменьшают активность производных диэтил(7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфонатов в отношении вируса гриппа. Данный вопрос является предметом дальнейших исследований.
2. В фенильное кольцо рекомендуется вводить атомы фтора и F-содержащие группы.
3. Диэтил(5-оксо-7-(2-фторфенил)-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфонат **3e** может быть признан активным по отношению к вирусу гриппа A/PR/8/34(H1N1), т.к имеет ХТИ больше 10.
4. Ввод атома хлора в 3-е положение фенильного кольца не дает значительного увеличения активности препарата.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что реакция замещенных 2-тиоурацилов с диэтилхлорэтинфосфонатом протекает с высокой хемо- и региоселективностью с образованием бициклических конденсированных структур типа тиазоло[3,2-*a*]пиримидинов **3а-е**.
2. Строение новых производных диэтилового эфира (7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфоновой кислоты **3а-е** изучено с помощью современных физико-химических методов анализа: ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии, рентгеноструктурного анализа.
3. Показано, что при взаимодействии диэтилхлорэтинфосфоната с производными 6-арил-5-циано-2-тиоурацилов в замыкании тиазольного кольца принимает участие третий атом азота пиримидинового цикла.
4. Предложен путь образования производных диэтилового эфира (7-арил-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфоновой кислоты **3а-е**.
5. Установлены значения цитотоксичности исследуемых препаратов **3а-е**, колеблющиеся в широких пределах от 50 до 439 мкг/мл.
6. Отмечено, что диэтиловый эфир (7-(2-фторфенил)-5-оксо-6-циано-5*H*-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)фосфоновой кислоты **3е** является наиболее перспективным препаратом для дальнейших исследований в опытах *in vivo*, химиотерапевтический индекс которого составляет 19,6.
7. Полученные данные могут применяться для дальнейшей разработки методов получения тиазолопиримидиновых систем, являющихся потенциальными биологически активными веществами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Khudina O. G., Ivanova A. E., Burgart Y. V., Pervova M. G., Shatunova T. V., Borisevich S. S., Saloutin V. I. Alkylation of 6-Polyfluoroalkyl-2-thiouracils with Haloalkanes // *Russian Journal of Organic Chemistry*. - 2019. –V. 55. No. 6. – P. 782–791.
2. Abd El-Fatah N. A., Darweesh A. F., Mohamed A. A., Abdelhamid I. A., Elwahy A. H. M. Experimental and theoretical study on the regioselective bis- and polyalkylation of 2-mercaptocotinonitrile and 2-mercaptopyrimidine-5-carbonitrile derivatives // *Tetrahedron*. - 2017. - V. 73. No. 11. - P. 1436–1450.
3. Khvorostov A., Lapinski L., Rostkowska H., Nowak M. J. UV-Induced Generation of Rare Tautomers of 2-Thiouracils: A Matrix Isolation Study // *The Journal of Physical Chemistry A*. - 2005. – V. 109. No. 34. – P. 7700–7707.
4. Shukla M. K., Leszczynski J. Electronic Transitions of Thiouracils in the Gas Phase and in Solutions: Time-Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) Study // *The Journal of Physical Chemistry A*. - 2004. – V. 108. No.46. – P. 10367–10375.
5. Ivanova A. E., Khudina O. G., Burgart Y. V., Pervova M. G., Ezhikova M. A., Kodess M. I., Saloutin V. I. 6-Trifluoromethyl-2-thiouracil and its analogs in reactions with 4-bromobutyl acetate and 2-bromoacetophenone // *Russian Chemical Bulletin*. - 2019. – V. 68. No.6. – P. 1190–1195.
6. Strekowski L., Abdou I. M., Attia A. M. , Patterson S. E. The first direct ammonolysis of 2-thiouracil nucleosides to 2-thiocytosine nucleosides // *Tetrahedron Letters*. - 2000. – V. 41. No. 24. – P. 4757–4761.
7. Kappe C. O., Shishkin O. V., Uray G., Verdino P. X-Ray Structure, Conformational Analysis, Enantioseparation, and Determination of Absolute Configuration of the Mitotic Kinesin Eg5 Inhibitor Monastrol // *Tetrahedron*. -2000. – V. 56. No.13. – P. 1859–1862.

8. Desai B., Dallinger D., Kappe C. O. Microwave-assisted solution phase synthesis of dihydropyrimidine C5 amides and esters // *Tetrahedron*. - 2006. –V. 62. No.19. – P. 4651–4664.
9. Balalaie S., Bararjanian M., Rominger F. An Efficient One-Pot Synthesis of 6-Aryl-5-cyano-2-thiopyrimidinone Derivatives and Their Piperidinium Ionic Forms, X-Ray Crystal Structures // *ChemInform*. - 2006. – V. 37. No. 51. – P. 821-826.
10. Kidwai M., Saxena S., Mohan R., Venkataramanan R. A novel one pot synthesis of nitrogen containing heterocycles: an alternate methodology to the Biginelli and Hantzsch reactions // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. - 2002. – V. 1. No. 16. – P. 1845–1846.
11. Vdovina S. V., Mamedov V. A. New potential of the classical Biginelli reaction // *Russian Chemical Reviews*. – 2008. – V. 77. No.12. - P.1017–1053.
12. Егоров Д. М., Питерская Ю. Л., Миронов В. Ф., Догадина А. В. Реакция хлорэтинфосфонатов с 4,5-замещенными 1H-имидазол-2-тионами // *ЖОХ*. - 2015. –Т. 85. Вып. 9. - С. 1564-1566.
13. Egorov, D. M., Piterskaya, Y. L., Dogadina, A. V. Reaction of chloroethynylphosphonates with 1-methyl-3H-imidazole-2-thiones // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2015. - Vol. 85. No. 2. - P. 502–504.
14. Егоров Д. М., Питерская Ю. Л., Догадина А. В. Взаимодействие хлорэтинфосфонатов с 1-метил-3H-имидазол-2-тионом // *ЖОХ*. - 2015. –Т. 85. Вып. 2. - С. 333-335.
15. Egorov D. M., Piterskaya Y. L., Dogadina A. V., Svintsitskaya N. I. Reactions of 5-substituted 1,3,4-thiadiazole-2-thiones with chloroacetylenephosphonates // *Tetrahedron Letters*. - 2015. – V.56.No12. – P. 1552–1554.

16. Erkhitueva E. B., Dogadina A. V., Khranchikhin A. V., Ionin, B. I. Reaction of chloroacetylenephosphonates with 5-thiotetrazoles // *Tetrahedron Letters*. - 2013. – V. 54.No.38. – P. 5174–5177.
17. Егоров Д. М., Бабушкина А. А., Леоненко В. Е., Чекалов А. П., Ю. Л. Питерская. Синтез 3-фосфорилированных тиазоло[3,2-а]пиримидин-6-карбоксилатов // *ЖОХ*. – 2020. – Т.90. Вып. 2. - С. 326–328.
18. Jeanneau-Nicolle E., Benoit-Guyod M., Leclerc G. One-Pot Synthesis of Thiazolidino [3,2-a] Pyrimidine Derivatives // *Synthetic Communications*. - 1991. –V. 21. No.14. – P. 1443–1454.
19. Jeanneau-Nicolle E., Benoit-Guyod M., Namil A., Leclerc G. New thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives, synthesis and structure-activity relationships // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 1992. – V. 27.No.2. – P. 115–120.
20. Youssef M. S. K., Ahmed R. A., Abbady M. S., Abdel-Mohsen S. A., Omar A. A. Reactions of 4-(2-aminothiazole-4-yl)-3-methyl-5-oxo-1-phenyl-2-pyrazoline. Synthesis of thiazolo[3,2-a]pyrimidine and imidazo[2,1-b]thiazole derivatives // *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*. – 2008. – V. 139. No.5. – P. 553–559.
21. Jeanneau-Nicolle E., Bosso C., Benoit-Guyod M., Leclerc G. Differentiation of isomeric 5- and 7-oxo derivatives of tetrahydrothiazolo[3,2-a]pyrimidine by electron impact mass spectrometry // *Organic Mass Spectrometry*. – V. 28. No.1. – P. 37–41.
22. Veretennikov E. A., Pavlov A. V. Synthesis of 5H-[1,3]thiazolo[3,2-a]pyrimidin-5-one derivatives // *Russian Journal of Organic Chemistry*. - 2013. – V. 49. No.4. – P. 575–579.
23. Yaragatti N. B., Kulkarni M. V., Ghate M. D., Hebbar S. S., Hegde G. R. Synthesis and biological evaluation of some new coumarinyl thiazolopyrimidinones // *Journal of Sulfur Chemistry*. - 2010. – V. 31. No. 2. – P. 123–133.

24. Esmaeili A. A., Zangouei M., Fakhari A. R., Habibi A. An efficient regioselective synthesis of highly functionalized 3-oxo-2,3-dihydro-5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidines via an isocyanide-based three-component reaction // *Tetrahedron Letters*. - 2012. – V.53. No.11. – P. 1351–1353.
25. Zhao D., Chen C., Liu H., Zheng L., Tong Y., Qu D., Han S. Biological evaluation of halogenated thiazolo[3,2-a]pyrimidin-3-one carboxylic acid derivatives targeting the YycG histidine kinase // *European Journal of Medicinal Chemistry*. -2014. – V. 87. – P. 500–507.
26. Mohamed M. M., Khalil A. K., Abbass E. M., El-Naggar A. M. Design, synthesis of new pyrimidine derivatives as anticancer and antimicrobial agents // *Synthetic Communications*. - 2017. – V. 47. No. 16. – P. 1441–1457.
27. Mond Z. H, Abdulrhman A., Hasnah O., Mohamed A. A., Abdullatif B. M., Mohamed J. A. Synthesis and evaluation of coumarin hybrids as antimycobacterial agents // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. – 2019. – V. 76. No. 6. – P. 1029– 1036.
28. Mohamed K. S., Abdulaziz N. M., Fadda A. A. Synthesis of Some New Pyridine and Pyrimidine Derivatives Containing Benzothiazole Moiety // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. -2013. – V. 50. No. 3. – P. 645–649.
29. Frolova T. V., Kim D. G., Sharutin V. V., Shalkova E. N. Synthesis and heterocyclization of 2-{{2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl}sulfanyl}pyrimidin-4(3h)-ones // *Russian Journal of Organic Chemistry*. – 2016. – V. 52. No.1. – P. 96–98.
30. Mobinikhaledi A., Foroughifar N., Ahmadi B. Synthesis of Some Bicyclic Thiazolo- and Oxothiazolo-Pyrimidines // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. – 2005. – V.180. No.2. – P. 339–345.
31. Selvam. Synthesis and structure-activity relationship study of 2-(substituted benzylidene)-7-(4-fluorophenyl)-5-(furan-2-yl)-2H-thiazolo[3,2-a]pyrimidin-3(7H)-one derivatives as anticancer agents // *Drug Discoveries and Therapeutics*. – 2012. – V. 6. No.4. – P. 198–204.

32. Abd El-Fatah N. A., Darweesh A. F., Mohamed A. A., Abdelhamid I. A., Elwahy A. H. M. Experimental and theoretical study on the regioselective bis- and polyalkylation of 2-mercaptocotinonitrile and 2-mercaptopyrimidine-5-carbonitrile derivatives // *Tetrahedron*. – 2017. – V. 73. No.11. – P. 1436–1450.
33. Pivazyan V. A., Ghazaryan E. A., Shainova R. S., Tamazyan R. A., Ayvazyan A. G., Yengoyan A. P. Synthesis and Growth Stimulant Properties of 2-Acetyl-3,7-dimethyl-5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidin-5-one Derivatives // *Journal of Chemistry*. – 2017. – V. 2017. – P. 1–8.
34. Elokhina V. N., Nakhmanovich A. S., Stepanova Z. V., Lopyrev V. A., Bannikova O. B., Struchkov Y. T., Shishkin O. V. Synthesis of 5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives from 6-methyl-2-thiouracil and 1-acyl-2-bromoacetylenes. X-ray structural study of 3-benzoyl-7-methyl-5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidin-5-one // *Russian Chemical Bulletin*. – 1996. – V. 45. No. 9. – P. 2189–2191.
35. Shelke A. V., Bhong B. Y., Karade N. N. New synthesis of 3,5-disubstituted-5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidine via ring annulation of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione using alkynyl(aryl)iodonium salts // *Tetrahedron Letters*. – 2013. – V. 54. No. 6. – P. 600–603.
36. Xiao D., Han L., Sun Q., Chen Q., Gong N., Lv Y., Li R. Copper-mediated synthesis of N-fused heterocycles via Csp–S coupling reaction and 5-endo-dig cyclization sequence // *RSC Advances*. – 2012. – V. 2. No.12. – P. 5054 – 5057.
37. Keivanloo A., Bakherad M., Rajaei M. One-Pot Regioselective Synthesis of 5-Amino-3-Benzyl-7H-[1,3]Thiazolo[3,2-A]Pyrimidin-7-Ones via Sonogashira Coupling Reaction // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. - 2014. – V.189. No.11. – P. 1656–1663.
38. Leysen J.E, Gommeren W., Gompel P.Van, Wynants J., Janssen P. F., P. M Laduron. Receptor-binding properties in vitro and in vivo of ritanserine: A

- very potent and long acting serotonin-5₂ antagonist // *Molecular Pharmacology*. – 1985. – V. 27. No. 6. – P. 600-611.
39. Wetzel H., Benkert O. Neuroleptika: Neue Substanzen—Neue Indikationen // *Psychopharmaka heute*. – 1990. – P. 108–128.
40. Renoux G. The General Immunopharmacology of Levamisole // *Drugs*. – 1980. – V. 20. No.2. – P. 89–99.
41. Ram V. J., Vanden Berghe D. A., Vlietinck A. J. Chemotherapeutical Agents, V. Syntheses and Activities of Novel Pyrimidines Derived from 5-Cyano-6-aryl-2-thiouracil // *Liebigs Annalen Der Chemie*. – 1987. – V.9. – P. 797–801.
42. Ющук Н. Д., Климова Е. А. Гепатит С // *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение*. – 2012. – V. 1. No. 1. – P. 46–55.
43. Кузнецов Н. И., Романова Е. С., Старцева Г. Ю. Современные принципы противовирусной терапии гепатита С // *Российский семейный врач*. – 2018. – V. 3. – P. 23–27.
44. Ding Y., Girardet J.-L., Smith K. L., Larson G., Prigaro B., Wu J. Z., Yao N. Parallel synthesis of 5-cyano-6-aryl-2-thiouracil derivatives as inhibitors for hepatitis C viral NS5B RNA-dependent RNA polymerase // *Bioorganic Chemistry*. – 2006. – V. 34. No.1. – P. 26–38.
45. El Diwani H. I., Abdel-Mohsen H. T., Salama I., Ragab F. A.-F., Ramla M. M., Galal S. A., El Demellawy M. A. Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation of Novel Benzimidazole Derivatives as Inhibitors of Hepatitis C Virus RNA Replication // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2014. – V. 62. No. 9. – P. 856–866.
46. Abdel-Rahman A. A.-H., Abdel-Megied A. E.-S., Goda A. E.-S., Zeid I. F., El Ashry E. S. H. Synthesis and Anti-HBV Activity of Thiouracils Linked via S and N-1 to the 5-Position of Methyl β -D-Ribofuranoside // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. – 2003. – V. 22. No.11. – P. 2027–2038.

47. Navrotskii M. B. Synthesis and Anti-HIV-1 Activity of New 2-[(2-Phthalimidoethyl)thio]-4(3H)-pyrimidinone Derivatives // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2005. – V. 39. No.9. – P. 466–467.
48. Новаков И. А., Шейкин Д. С., Чапуркин В. В., Навроцкий М. Б., Бабушкин А. С., Кузнецов Я. П., Ручко Е.А., Качала В. В., Марышев А. Ю., Шольц Д. Синтез 2-[(ω-фталимидаалкил)сульфанил]-пиримидин-4(3H)-онон, их цитотоксичность и антиВИЧ-1/2 активность *in vitro* // *Химия гетероциклических соединений*. – 2020. – V. 56. No.1. – P. 67–72.
49. Mugnaini C., Manetti F., Esté J. A., Clotet-Codina I., Maga G., Cancio R., Corelli F. Synthesis and biological investigation of S-aryl-S-DABO derivatives as HIV-1 inhibitors // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2006. – V. 16.No.13. – P. 3541–3544.
50. Yu M., Liu X., Li Z., Liu S., Pannecouque C., Clercq E. D. Synthesis and biological evaluation of novel 2-(substituted phenylaminocarbonylmethylthio)-6-(2,6-dichlorobenzyl)-pyrimidin-4(3H)-ones as potent HIV-1 NNRTIs // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2009. – V. 17. No.22. – P. 7749–7754.
51. Yu M., Liu A., Du G., Naesens L., Vanderlinden E., De Clercq E., Liu X. Discovery of Dihydro-Alkyloxy-Benzyl-Oxopyrimidines as Promising Anti-Influenza Virus Agents // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2011. – V. 78. No. 4. – P. 596–602.
52. Ramajayam R., Tan K.-P., Liu H.-G., Liang P.-H. Synthesis, docking studies, and evaluation of pyrimidines as inhibitors of SARS-CoV 3CL protease // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – V. 20. No.12. – P. 3569–3572.
53. Mohamed S. F., Flefel E. M., Amr A. E.-G. E., Abd El-Shafy D. N. Anti-HSV-1 activity and mechanism of action of some new synthesized substituted pyrimidine, thiopyrimidine and thiazolopyrimidine derivatives //

- European Journal of Medicinal Chemistry. – 2010. – V. 45. No.4. – P. 1494–1501.
54. Abu-Hashem A. A., Gouda M. A., Badria F. A. Design, synthesis and identification of novel substituted isothiochromene analogs as potential antiviral and cytotoxic agents // Medicinal Chemistry Research. – 2018. – V. 27. – P. 2297–2311.
55. Fatima S., Sharma A., Saxena R., Tripathi R., Shukla S. K., Pandey S. K., Tripathi R. P. One pot efficient diversity oriented synthesis of polyfunctional styryl thiazolopyrimidines and their bio-evaluation as antimalarial and anti-HIV agents // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2012. – V. 55. – P. 195–204.
56. Препаративная органическая химия [Текст] / под ред. Н.С. Вульфсона. – М.: Химия. – 1959. – 908 с.
57. Органические растворители: Физические свойства и методы очистки [Текст] / под ред. А. Вайсбергера. – М.: Изд-во иностр. лит. – 1958. – 520 с.
58. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К. – 2012. - 944с.

Приложение А

Патентный поиск

Таблица А.1 – Перечень просмотренных источников патентной документации

Страна	Глубина поиска	Наименование источника патентной документации
Россия Китай Южная Корея Великобритания Япония Чехия США Швеция	1995-2020	www.fips.ru www.google.com/patents www.espacenet.com

Таблица А.2 – Перечень отобранных аналогов

Страна	Индекс МПК	Название изобретения	Наименование источника патентной документации
Россия	RU2003129060/04	Замещенные пиразоло- и тиазолопиримидины	www.fips.ru
Россия	RU2013145299	Тиазолопиримидины	www.fips.ru
Россия	RU2610840	Тиазолопиримидины	www.fips.ru
Китай	CN103012440А	Метод синтеза производных тиазоло[3,2-а]пиримидинов by one pot process	www.espacenet.com

Южная Корея	KR830006316A	Способ получения производных 2,3,6,7-тетрагидропиримидино[3,2-а] пиримидина	www.espacenet.com
Китай	CN102731411A	Получение 4-алкил-6-арил-3,4-дигидропиримидин-2-тиокетона и применение его в качестве антидепрессанта	www.espacenet.com
Великобритания	GB2359080A	Фармацевтически активные тиазолопиримидины	www.espacenet.com
Япония	JP5539190B2	Тиазолопиримидины и их применение в качестве ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназы	www.google.com/patents
Чехия	CZ20032474A3	Замещенные пиразолопиримидины и тиазолопиримидины, способ их получения. Фармацевтические композиции, в состав которых входят производные, и их применение.	www.google.com/patents
США	US3660405A	Тиазолопиримидины	www.google.com/patents
США	US3772290A	Способ получения тиазолопиримидинов взаимодействием 6-амино-1,3-диметилурацила с алкилизотиоцианатом	www.google.com/patents
США	US3745217A	Тиазолопиримидины для восстановления после передозировки барбитуратами	www.google.com/patents

США	US3769287A	Способ восстановления тиазолопиримидинов реакцией тиомочевин урацила с перекисью водорода	www.google.com/patents
США	US4103016A	Противовоспалительные имидазотиазолы и тиазолопиримидины	www.google.com/patents
Швеция	WO2001058907A1	Тиазолопиримидины и их применение в качестве модуляторов активности рецепторов хемокинов	www.google.com/patents
Великобритания	WO2005117890A3	Тиенопиримидины и тиазолопиримидины для применения в медицине	www.google.com/patents