

На правах рукописи



ПУГАЧЕВ МИХАИЛ ВЛАДИМИРОВИЧ

**СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФОСФОНИЕВЫХ
СОЛЕЙ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДОКСИНА**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2014

Работа выполнена в Химическом институте им. А.М. Бутлерова и Научно-образовательном центре фармацевтики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

Штырлин Юрий Григорьевич
кандидат химических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Бурилов Александр Романович
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией
элементоорганического синтеза
ФГБУН «Институт органической и
физической химии им. А.Е. Арбузова
КазНЦ РАН»,
г. Казань

Бардасов Иван Николаевич
кандидат химических наук, доцент
кафедры общей, неорганической и
аналитической химии
ФГБОУ ВПО «Чувашский
государственный университет имени
И.Н. Ульянова»,
г. Чебоксары

Ведущая организация:

ФГБОУ ВПО «Московский
государственный университет имени
М.В. Ломоносова»,
г. Москва

Защита состоится «18» декабря 2014 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 212.081.30 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова КФУ, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета, автореферат и диссертация размещены на сайте <http://www.kpfu.ru>

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Научная часть.

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор химических наук



Верещагина Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Направленный синтез и установление взаимосвязи структуры органических соединений с их биологической активностью являются одними из приоритетных направлений развития современной медицинской и органической химии. Несмотря на достигнутый в этой области значительный прогресс, еще множество задач остаются нерешенными. В частности, в последние годы наблюдается заметный рост числа и распространенности инфекционных заболеваний, обусловленных появлением новых резистентных штаммов микроорганизмов. При разработке антибактериальных средств для лечения внутри- и внебольничных инфекций эффективным может стать подход, основанный на химической модификации биологически активных веществ природного происхождения. Одним из ярких представителей таких соединений является витамин В₆, который вовлечен в метаболизм с более чем 100 ферментами и участвует в процессах биосинтеза аминокислот.

В течение последних 15 лет в отделе прикладной химии Химического института им. А.М. Бутлерова, а с 2011 года в отделе медицинской химии Научно-образовательного центра фармацевтики ведутся систематические исследования по изучению химических и биологических свойств производных пиридоксина. Разработан удобный способ синтеза 6-замещенных производных пиридоксина, установлены факторы, определяющие их реакционную способность, проведены исследования *in vitro* и *in vivo* антибактериальной, противовоспалительной, антихолинэстеразной и др. видов активности.

В настоящей работе представлялось целесообразным сконцентрировать свое внимание на синтезе, первичном скрининге и оптимизации структуры производных пиридоксина, содержащих фосфониевые фрагменты. Привлекательность такой модификации обусловлена тем, что, как известно из литературных данных, некоторые фосфониевые соли могут выступать в качестве антибактериальных фармакофорных групп.

Целью настоящей работы является синтез широкого ряда фосфониевых солей на основе производных пиридоксина и исследование их антибактериальной активности.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие **основные задачи**:

1. Разработка подходов к синтезу ряда шестичленных ацеталей 6-метил-2,3,4-трис(гидроксиметил)пиридин-5-ола;
2. Разработка подходов к синтезу широкого ряда фосфониевых солей на основе пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина;
3. Исследование антибактериальной активности полученных соединений на штаммах условно-патогенных микроорганизмов. Выявление закономерностей «структура - антибактериальная активность»;
4. Оптимизация химической структуры выявленных соединений-лидеров и исследование их антибактериальной активности;
5. Разработка подходов к синтезу алкенилпроизводных по реакции Виттига фосфониевых солей пиридоксина с бензальдегидом.

Научная новизна полученных результатов состоит в следующем:

- разработаны подходы к синтезу шестичленных циклических ацеталей на основе 6-метил-2,3,4-трис(гидроксиметил)пиридин-5-ола;

- подобраны условия проведения реакций галогенирования (хлорирования, бромирования) новых гидроксиметилпроизводных пиридоксина;
- впервые синтезирован ряд четвертичных фосфониевых солей на основе производных пиридоксина и исследована их антибактериальная активность;
- проведена оптимизация химической структуры выявленных соединений-лидеров;
- впервые синтезированы алкенилпроизводные пиридоксина по реакции Виттига четвертичных фосфониевых солей с бензальдегидом.

Практическая значимость работы. Разработан синтетический подход, позволяющий селективно модифицировать гидроксиметильные группы во втором, пятом и шестом положениях пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина, что открывает широкие перспективы для введения различных функциональных групп.

Некоторые четвертичные фосфониевые соли на основе производных пиридоксина *in vitro* показали высокую антибактериальную активность по отношению к грамположительным бактериям *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, сопоставимую с препаратом сравнения – ванкомицином.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых высокоэффективных и безопасных антибактериальных лекарственных средств.

На защиту выносятся:

1. Методики синтеза шестичленных ацеталей 6-метил-2,3,4-трис(гидроксиметил)пиридин-5-ола, их галогенпроизводных и четвертичных фосфониевых солей.
2. Данные по региоспецифичности реакции бромирования 5,6-бис(гидроксиметил)-2,2,8-триметил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридина и кислотного гидролиза 5,6-бис(хлорметил)-2,2,8-триметил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридина.
3. Результаты исследования антибактериальной активности и цитотоксичности четвертичных фосфониевых солей на основе производных пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина. Установленные закономерности взаимосвязи структуры фосфониевых солей с их биологической активностью.
4. Методики синтеза алкенилпроизводных по реакции Виттига моно- и бисфосфониевых солей пиридоксина с бензальдегидом.

Степень достоверности и апробация работы.

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных физико-химических методов масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , элементного анализа и РСА.

Основные результаты диссертационной работы докладывались на VI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012» (Санкт-Петербург, 2012), XI научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2012), Всероссийской конференции "Современные проблемы химической науки и образования" (Чебоксары, 2012), XIX, XX, XXI Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2011, 2012, 2014), VII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев-2013» (Санкт-Петербург, 2013), I Всероссийской конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013), I Всероссийской конференции по медицинской химии

(MedChemRussia-2013) (Москва, 2013), VIII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2014» (Санкт-Петербург, 2014), итоговой научной конференции Казанского федерального университета (Казань, 2014).

Личный вклад автора. Автор принимал участие в постановке цели и задач исследования, анализе литературных данных, выполнении экспериментальной работы, обсуждении результатов и формулировке выводов, подготовке статей и тезисов докладов. Все соединения, представленные в диссертационной работе, синтезированы соискателем лично.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 10 тезисов докладов и получен 1 патент РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 142 страницах машинописного текста, содержит 86 схем, 7 таблиц, 15 рисунков и состоит из введения, трех основных глав, выводов и списка цитируемой литературы, насчитывающего 196 источников.

В первой главе приведен обзор литературы по синтезу и свойствам производных пиридоксина и четвертичных фосфониевых солей. Во второй главе приведены результаты собственных исследований по синтезу и антибактериальной активности производных пиридоксина. В третьей главе представлена экспериментальная часть.

Методы исследования. Соединения получены с использованием различных методов органического синтеза. Состав и структура соединений доказаны с использованием физико-химических методов масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , элементного анализа и РСА. Антибактериальную активность и цитотоксичность определяли с использованием методов работы с клеточными культурами и микроорганизмами.

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и является частью исследования по основному научному направлению Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ «Синтез, строение, реакционная способность и практически полезные свойства органических, элементоорганических и координационных соединений».

Диссертационная работа выполнялась в рамках государственного задания Минобрнауки РФ на выполнение работ «Фундаментальные и прикладные основы создания и применения инновационных лекарственных средств» (2012-2013 гг.), проектной части государственного задания в сфере научной деятельности (по заданию № 12.67.2014/К) «Синтез и оптимизация структуры соединений-лидеров – кандидатов в противоопухолевые, ноотропные, антихолинэстеразные, противомикробные и сердечно-сосудистые лекарственные средства» (2014 – 2016 гг.), стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики (2013-2015 г.), при финансовой поддержке РФФИ (Грант № 14-03-31064 мол_а).

Автор выражает благодарность и признательность научному руководителю к.х.н. Штырлину Ю.Г. и к.х.н. Штырлину Н.В. за постоянную поддержку, всестороннюю помощь и понимание, а также за активное участие при обсуждении работы, к.б.н. Никитиной Е.В. за определение антибактериальной активности, к.б.н. Иксановой А.Г. за определение безопасности соединений, к.ф.-м.н. Гнездилову О.И. и

инженеру Хаярову Х.Р. за съемку ЯМР-спектров, д.х.н. Бердникову Е.А. за помощь в интерпретации ЯМР-спектров, к.х.н. Лодочниковой О.А. за проведение рентгеноструктурного анализа, к.х.н. Мусину Р.З. за съемку масс-спектров, а также к.х.н. Сысоевой Л.П., лаб. Кашаповой И.Г., к.х.н. Стрельнику А.Д., аспиранту Гарипову М.Р., студенту Сапожникову С.В. и всем сотрудникам отдела медицинской химии Научно-образовательного центра фармацевтики за помощь в проведении работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез и антибактериальная активность фосфониевых солей на основе пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина

1.1. Синтез фосфониевых солей на основе пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина

Фосфониевые соли получали реакцией нуклеофильного замещения хлорпроизводных (бромпроизводных) пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина с фосфинами.

Для синтеза широкого ряда хлорпроизводных пиридоксина использовали разнообразные синтетические подходы: введение ацетальной (кетальной) защиты гидроксильных групп для селективной функционализации пиридоксина и его производных, введение дополнительной гидроксиметильной группы в шестое положение пиридинового кольца семичленных ацеталей (кеталей) пиридоксина (нумерация для указания положения заместителей проведена в соответствии с заместительной номенклатурой пиридоксина) реакцией гидроксиметилирования в щелочной среде, проведение перегруппировки N-окисей пиридоксиновых производных для модификации ароматической метильной группы и, наконец, галогенирование гидроксиметильных групп шести- и семичленных ацеталей (кеталей) пиридоксина.

Фосфониевая соль **3** была синтезирована из пиридоксина в две стадии (схема 1).

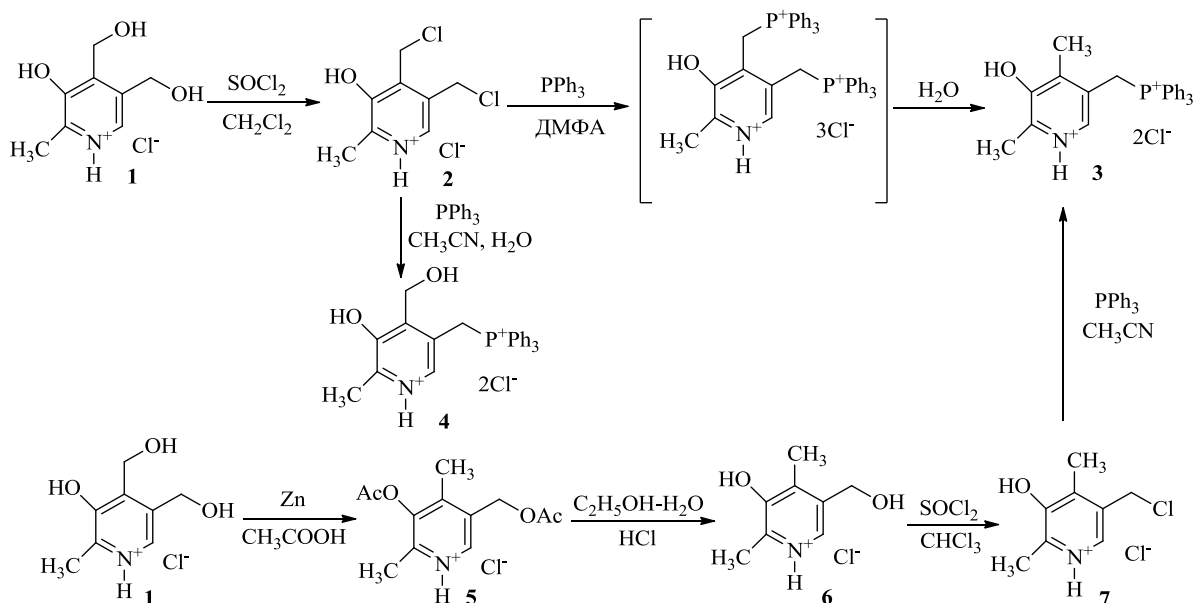


Схема 1

На первой стадии было получено дихлорпроизводное пиридоксина **2** в виде гидрохлорида. На второй стадии для синтеза конечного продукта - четвертичной фосфониевой соли, была проведена реакция соединения **2** с четырехкратным мольным избытком трифенилфосфина. Реакцию проводили в ДМФА при температуре 90 °С в течение 7 часов. Однако вместо ожидаемого биспроизводного была получена монофосфониевая соль по пятому положению пиридинового кольца. По-видимому, на этапе разработки реакционной смеси при экстракции фосфониевой соли в воду происходит селективный гидролиз фосфониевого фрагмента по четвертому положению пиридинового кольца с образованием метильной группы. При использовании 5%-водного ацетонитрила в реакции дихлорпроизводного **2** с трифенилфосфином наблюдается селективный гидролиз хлорметильной группы в четвертом положении пиридинового кольца с образованием монофосфониевой соли **4**. Для однозначного доказательства структуры соединения **3** был проведен встречный синтез в четыре стадии. Монохлорид **7** был получен восстановлением гидроксиметильной группы в четвертом положении пиридинового кольца до метильной с использованием цинка в уксусной кислоте с последующим снятием ацетатных групп в кислой среде и хлорированием гидроксиметильной группы соединения **6** хлористым тионилем. На последней стадии из хлорпроизводного **7** была получена фосфониевая соль **3**.

Еще один способ получения монофосфониевой соли **4** представлен на схеме 2. Фосфониевые соли пиридоксина **10a** и **10б**, содержащие метиленфосфониевую группу в пятом положении пиридинового кольца, получены в три стадии. На первой стадии осуществлялась защита гидроксильных групп в третьем и четвертом положениях пиридоксина с образованием шестичленного ацетала **8a** и кетала **8б**. Далее производилось хлорирование гидроксиметильной группы с использованием хлористого тионила. На последней стадии были проведены реакции хлорпроизводных **9a** и **9б** с избытком трифенилфосфина с образованием соответствующих солей **10a** и **10б**. Последующее снятие кетальной (ацетальной) защиты в кислой среде приводит к монофосфониевой соли **4**.

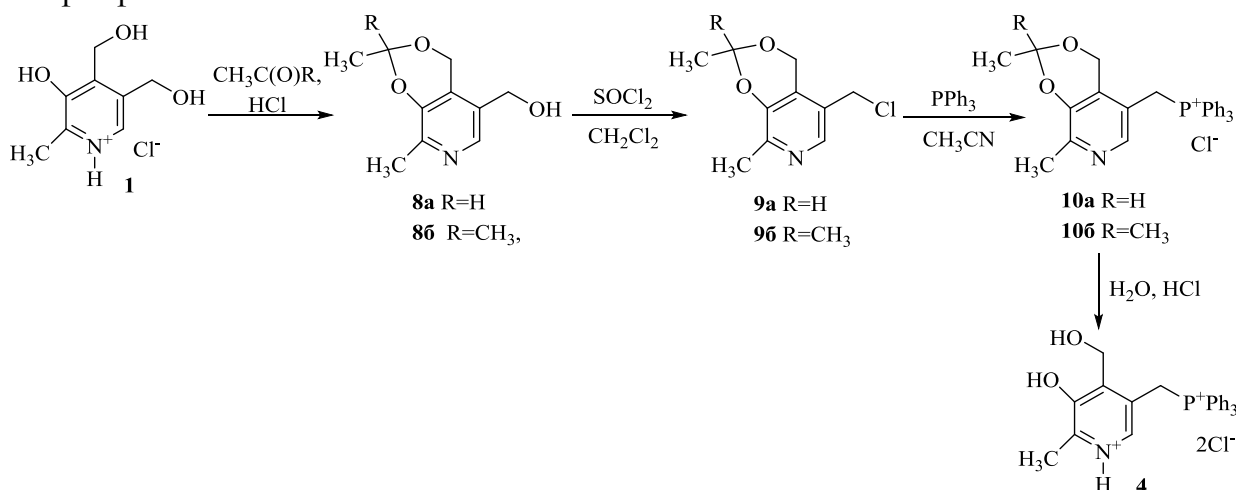


Схема 2

Монофосфониевая соль **16**, содержащая метиленфосфониевый фрагмент в шестом положении пиридоксина, получена шестистадийным синтезом (схема 3). Соединение **13** было синтезировано путем первоначального введения кетальной защиты гидроксиметильных групп пиридоксина с последующим гидроксиметилированием соединения **11** и селективным ацилированием соединения **12**. Далее последовательным взаимодействием с мезилхлоридом и

трифенилфосфином была получена фосфониевая соль **15**. Попытки селективного снятия ацетатной и кетальной защитных групп при различных значениях pH водного раствора не увенчались успехом. Во всех случаях наблюдается одновременное снятие защитных групп с образованием соединения **16**.

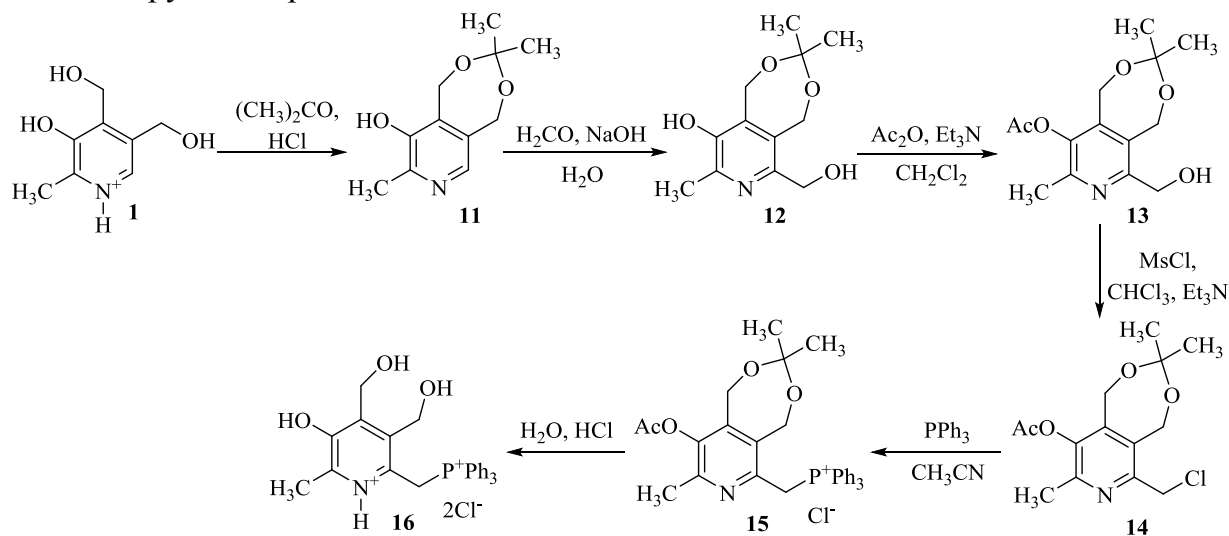


Схема 3

Аналогичная ситуация наблюдалась и при использовании метоксиметильной защиты ароматической гидроксильной группы (схема 4).

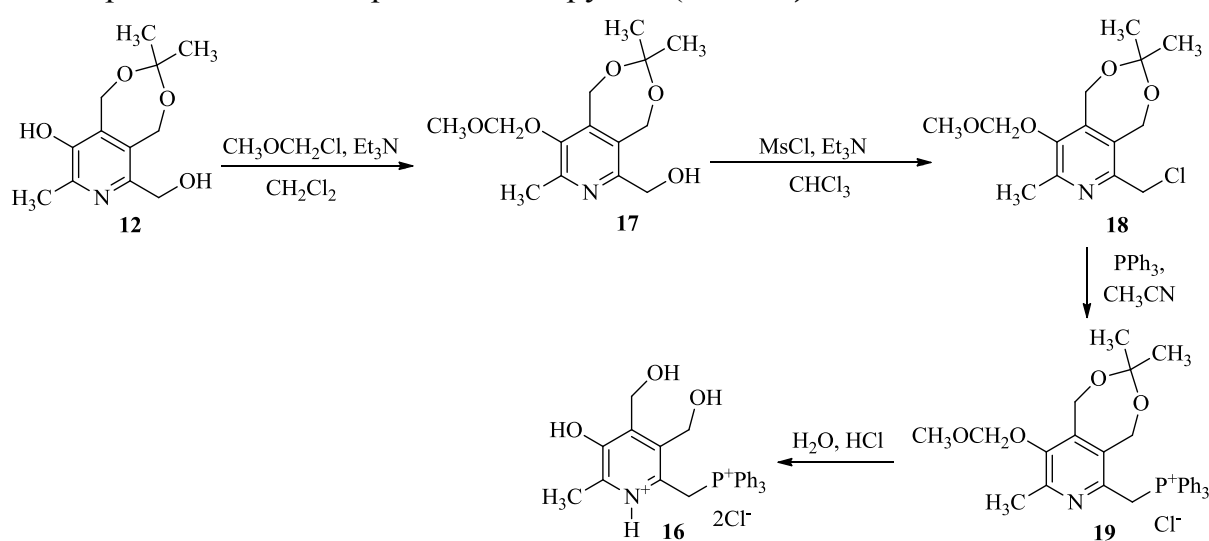


Схема 4

Селективное снятие кетальной защиты с образованием монофосфониевой соли **22** удалось провести при введении мезитатной группы в соединение **12** (схема 5).

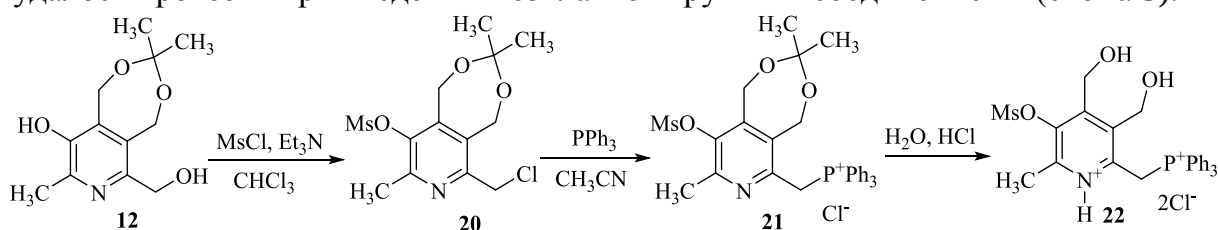


Схема 5

Региоизомерная соединению **16** фосфониевая соль **25**, содержащая метиленфосфониевую группу в пятом положении пиридоксина, была получена по схеме 6. Взаимодействием соединения **12** с хлористым тионилем получено дихлорпроизводное **23**, которое образуется при изомеризации семичленного цикла в

термодинамически более стабильный шестичленный кеталь. Последующая обработка водным раствором кислоты приводит к снятию кетальной защиты и селективному гидролизу хлорметильной группы в шестом положении пиридоксина. Реакция протекает гладко и с количественным выходом. Структура соединения **24** по данным РСА приведена на рисунке 1. Взаимодействием монохлорида **24** с трифенилфосфином получена фосфониевая соль **25** (схема 6).

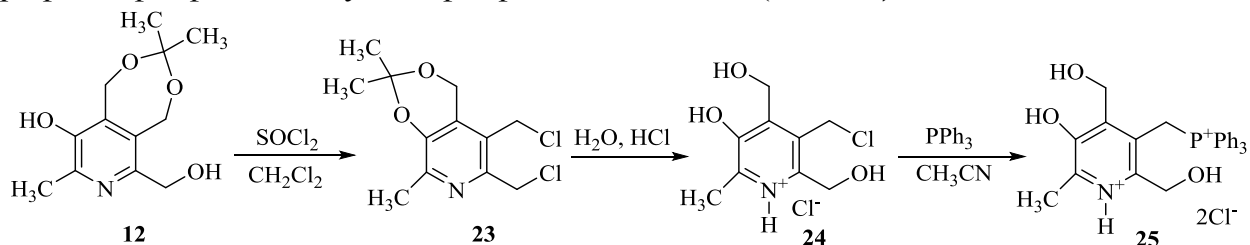
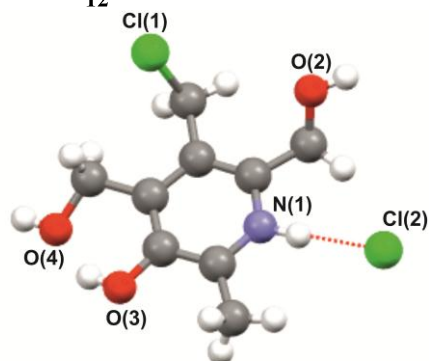


Схема 6

Рисунок 1 – Структура соединения **24** по данным РСА

Для объяснения региоспецифичности реакции кислотного гидролиза соединения **23** были проведены квантово-химические расчеты относительной энергии образования двух возможных карбокатионов (таблица 1). Значительно более высокая стабильность карбокатиона **I** по сравнению с карбокатионом **II** (в рамках механизма мономолекулярного нуклеофильного замещения (S_N1)) согласуется с экспериментальными данными.

Таблица 1 – Относительная энергия образования карбокатионов **I** и **II** по результатам квантово-химических расчетов методом Хартри-Фока с базисным набором 6-31G*

Структура карбокатиона		
ΔE^0 , ккал/моль	- 5.8	0

Синтез монофосфониевой соли **32**, содержащей метиленфосфониевую группу во втором положении пиридинового кольца, был осуществлен первоначальным превращением в кислой среде семичленного кетала **12** в дикеталь **26** с последующим N-оксидированием *m*-хлорпербензойной кислотой (МСПВА). Далее проведена перегруппировка полученного N-оксида **27** в уксусном ангидриде, которая селективно проходит по метильной группе во втором положении пиридинового кольца. На следующей стадии синтеза осуществлено снятие ацетатной защиты метилатом натрия с образованием 2-гидроксиметилпроизводного **29**. Взаимодействием с мезилхлоридом и далее с трифенилфосфином была получена фосфониевая соль **31**, содержащая только один кетальный цикл. Следует отметить, что попытки выделения монофосфониевой соли, содержащей наряду с шестичленным

и семичленный кетальный цикл, оказались неудачными вследствие нестабильности последнего. Гидролиз фосфониевой соли **31** в кислой среде приводит к продукту **32** (схема 7).

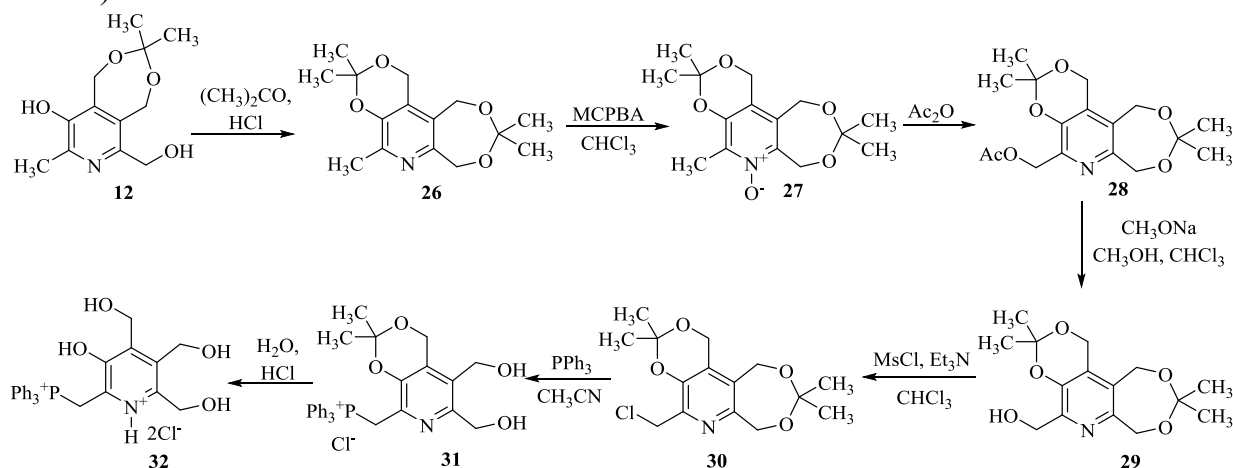


Схема 7

Монофосфониевые соли **3**, **4**, **10a,b**, **15**, **21**, **22**, **25**, **31**, **32** представляют собой бесцветные кристаллические вещества с температурой плавления выше 160 °С. Соединения **16** и **19** плавятся при температуре ниже 90 °С. Состав и структура всех полученных соединений доказаны методами ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{31}P – спектроскопии и масс-спектрометрии.

На следующем этапе были получены бис- и трисфосфониевые соли, содержащие метиленфосфониевые фрагменты в различных положениях пиридинового цикла.

Ацилированием гидроксиметильной группы, N-оксидированием *m*-хлорпербензойной кислотой, перегруппировкой в среде уксусного ангидрида, снятием ацетатной защиты метилатом натрия, хлорированием диола **36** мезилхлоридом и взаимодействием соединения **37** с трифенилфосфином получена бисфосфониевая соль **38**. Снятием кетальной защиты в кислой среде получена соответствующая бисфосфониевая соль **39** (схема 8).

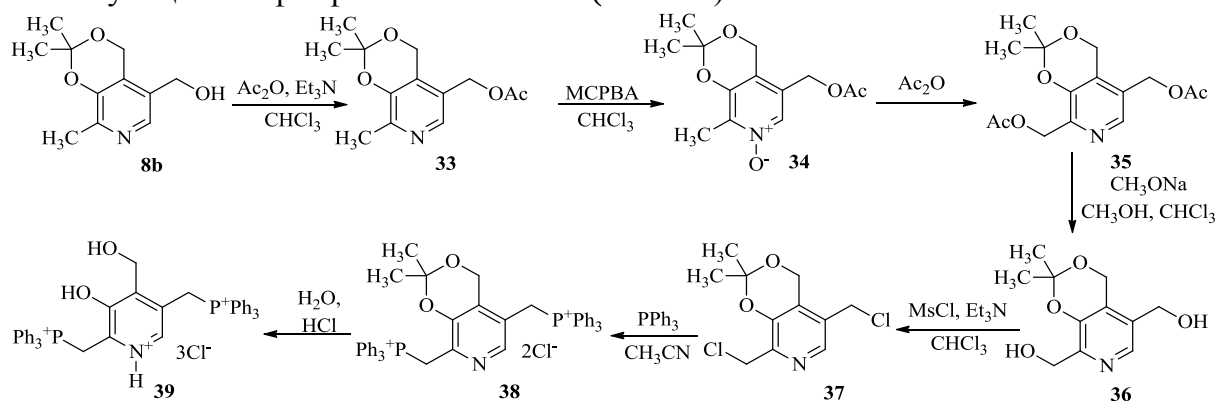


Схема 8

Установлено, что в реакции соединения **23** с трифенилфосфином замена неполярных растворителей (дихлорметан, хлороформ) на диполярные апротонные растворители (ацетонитрил, ацетон) приводит к значительному ускорению реакции и образованию целевого продукта с высоким выходом, что согласуется с $\text{S}_{\text{N}}1$ механизмом реакции. Снятие кетальной защиты в кислой среде протекает мягко и с количественным выходом получается бисфосфониевая соль **41** (схема 9).

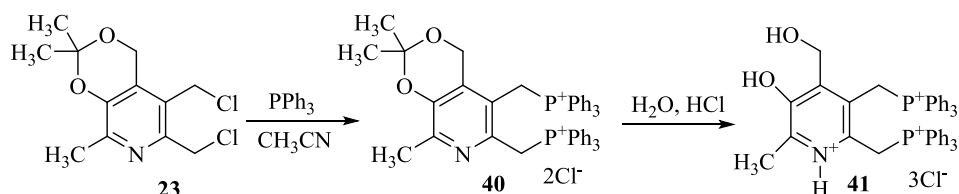


Схема 9

Трифосфониевые соли **48** и **49** были получены последовательно в семь и восемь стадий, соответственно (схема 10). Триол шестичленного кетала **46** и его продукт хлорирования **47** синтезированы из соединения **12** по методикам, аналогичным для вышеописанных моно- и бисфосфониевых солей. Все реакции протекают гладко и с высокими выходами.

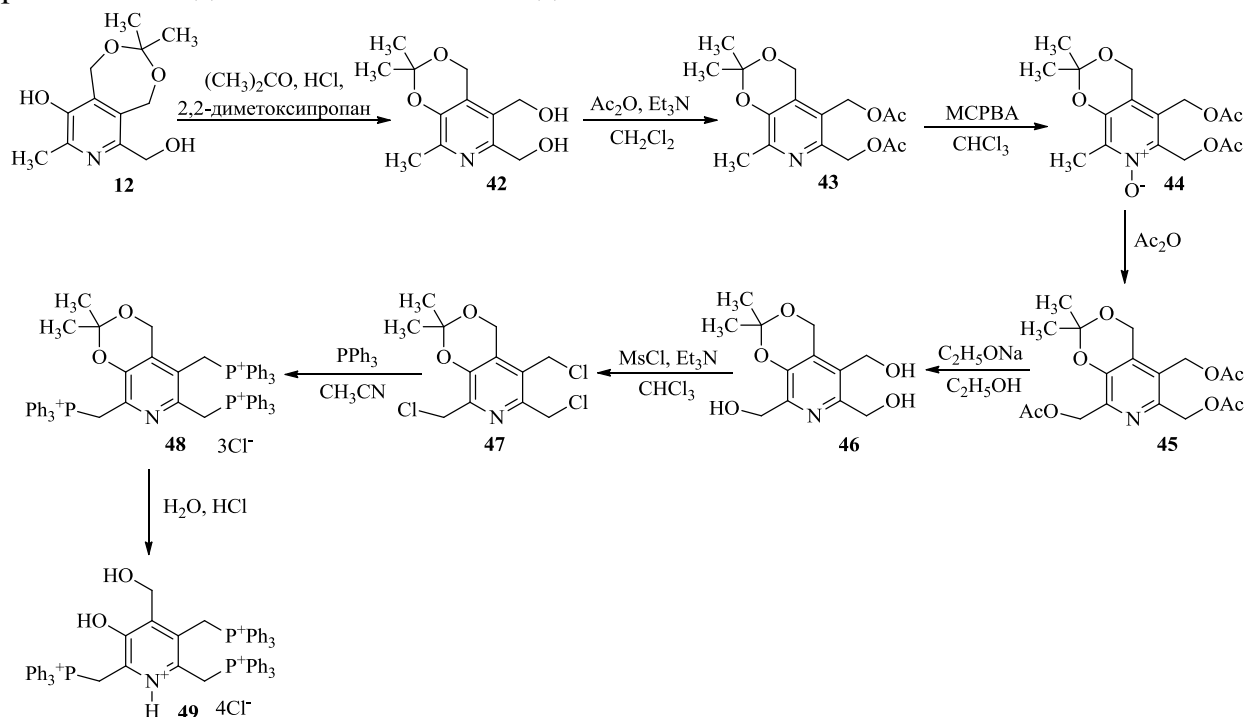


Схема 10

Бис- и трифосфониевые соли **38**, **39**, **40**, **48**, **49** представляют собой бесцветные кристаллические вещества с температурой плавления выше 190°C . Состав и структура всех полученных соединений доказаны методами ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{31}P – спектроскопии и масс-спектрометрии.

На заключительном этапе была предпринята попытка синтеза трифосфониевой соли **52**, содержащей метиленфосфониевые фрагменты в четвертом, пятом и шестом положениях пиридоксина (схема 11). Гидролизом семичленного циклического кетала в кислой среде и последующим хлорированием полученного соединения **50** мезилхлоридом в присутствии небольшого избытка триэтиламина был получен трихлорид **51**. Взаимодействие соединения **51** с избытком трифенилфосфина приводит к образованию неразделимой смеси продуктов. По данным ЯМР ^1H и ^{31}P – спектроскопии реакционной смеси наблюдается образование как целевого, так и региоизомерных моно- и бис- аддуктов. Попытки селективного замещения одного или двух атомов хлора при варьировании мольного соотношения соединения **51** и трифенилфосфина также оказались неудачными и разделить хроматографией индивидуальные продукты не представилось возможным.

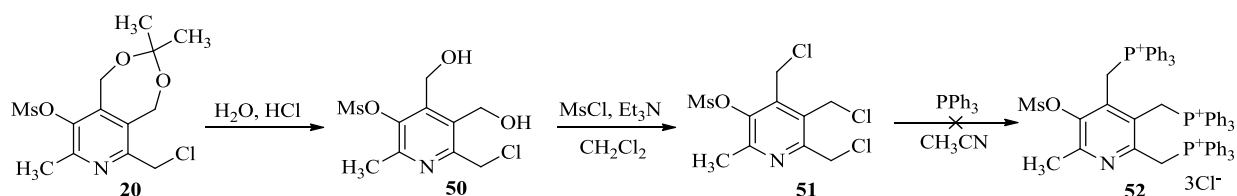


Схема 11

Таким образом, на примере реакций нуклеофильного замещения с трифенилфосфином был разработан синтетический подход, позволяющий селективно модифицировать гидроксиметильные группы во втором, пятом и шестом положениях пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина **12**, что открывает широкие перспективы для синтеза большого ряда соединений с различными функциональными группами.

1.2. Антибактериальная активность фосфониевых солей на основе пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина

Изучение антибактериальной активности соединений проводилось сотрудником научно-образовательного центра фармацевтики к.б.н. Е.В. Никитиной на ряде клинических бактериальных штаммов, полученных из Государственного автономного учреждения здравоохранения «Республиканский Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями Министерства здравоохранения Республики Татарстан», г. Казань.

В таблице 2 представлены значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) фосфониевых солей в сопоставлении с антибиотиком «последней надежды» - ванкомицином.

Все синтезированные соединения имеют узкий спектр действия и проявляют антибактериальную активность, также как и ванкомицин, только на штаммах грамположительных бактерий.

Монофосфониевые соли **10a** и **10б**, содержащие шестичленные циклические кетали (ацетали), не проявляют антибактериальную активность (МИК ≥ 1000 мкг/мл). Монофосфониевые соли **15**, **19**, **21**, содержащие семичленные циклические кетали, бисфосфониевая соль **38** и трисфосфониевая соль **48** оказались более активными (значения МИК варьируются в пределах от 31 до 100 мкг/мл).

Максимальный антибактериальный эффект наблюдается для бисфосфониевой соли **40**, содержащей метиленфосфониевые фрагменты в пятом и шестом положениях пиридоксина. Значение МИК на штаммах *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* составляет 5 мкг/мл и близко к МИК ванкомицина.

Таблица 2 – Результаты исследования антибактериальной активности *in vitro* моно-, бис- и трисфосфониевых солей

Соединение	МИК (мкг/мл)			
	Грамположительные бактерии		Грамотрицательные бактерии	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus spp.</i>
3	500	1000	> 1000	> 1000
4	1000	1000	> 1000	> 1000
10a	1000	1000	> 1000	> 1000
10б	1000	1000	> 1000	> 1000
15	100	100	> 1000	> 1000

16	1000	1000	> 1000	> 1000
19	100	100	> 1000	> 1000
21	31	50	> 1000	> 1000
22	100	100	> 1000	> 1000
25	1000	1000	> 1000	> 1000
31	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
32	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
38	62.5	50	> 1000	> 1000
39	250	250	> 1000	> 1000
40	5	5	> 1000	> 1000
41	1000	1000	> 1000	> 1000
48	50	50	> 1000	> 1000
49	500	500	> 1000	> 1000
Ванкомицин	2.5	2.5	> 1000	> 1000

2. Оптимизация химической структуры

5,6-бис(метилентрифенилфосфоний)-2,2,8-триметил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин дихлорида

Путем варьирования заместителей у ацетального атома углерода шестичленного цикла, заместителей у атомов фосфора метиленфосфониевых групп и природы противоионов была проведена оптимизация химической структуры соединения **40** (рисунок 2).

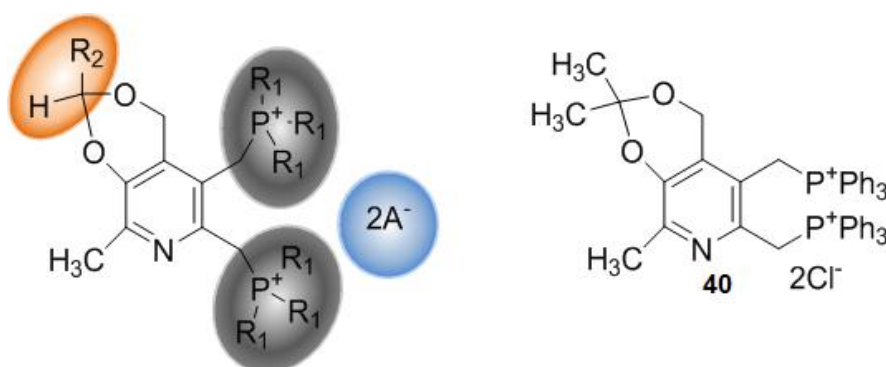
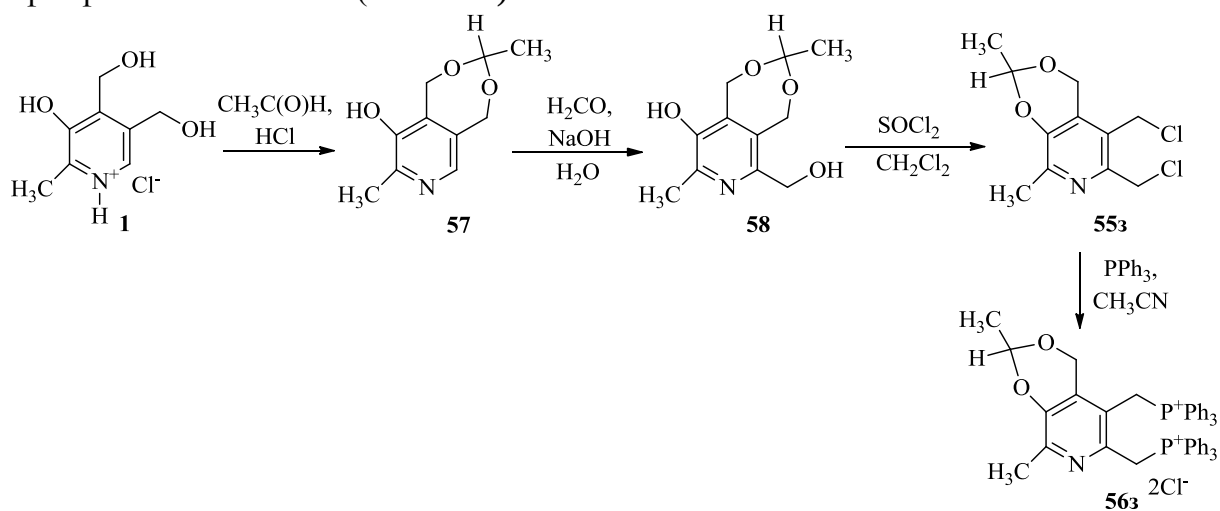
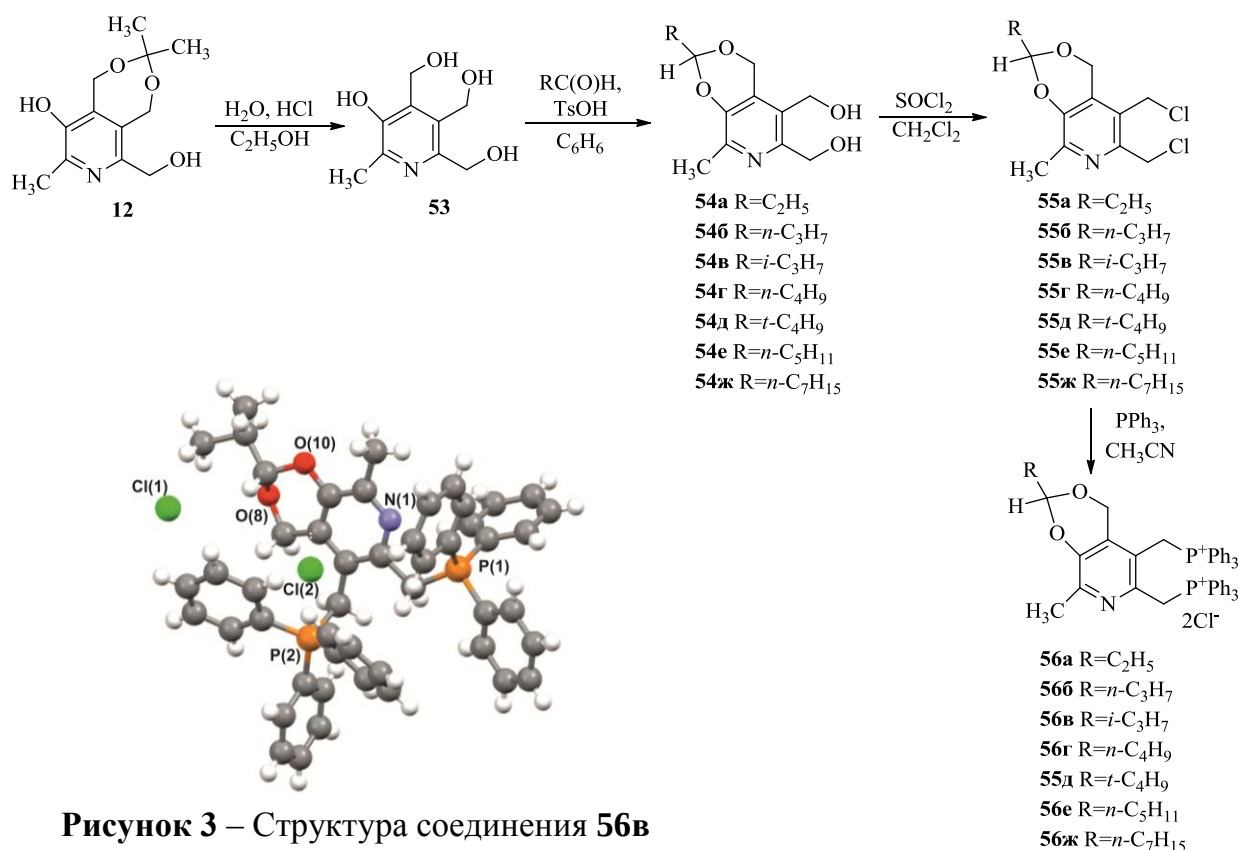


Рисунок 2 – Общая структура бисфосфониевых солей на основе соединения **40**

2.1. Варьирование природы заместителей у ацетального атома углерода бисфосфониевой соли пиридоксина

Синтез бисфосфониевых солей **56а-ж** с различным гидрофильно-липофильным балансом представлен на схеме 12 и включает предварительное снятие семичленной кетальной защиты с гидроксиметильных групп в четвертом и пятом положениях пиридоксина, формирование шестичленного ацетального цикла, хлорирование диолов **54а-ж** и взаимодействие дихлорпроизводных **55а-ж** с трифенилфосфином. В качестве примера на рисунке 3 представлена структура соединения **56в** по данным РСА.



2.2. Варьирование природы заместителей у атомов фосфора в пятом и шестом положениях бисфосфониевой соли пиридоксина

В реакции соединения **23** с избытком триалкил- и триарилфосфинов получены с хорошими выходами бисфосфониевые соли **59а-д**. Снятие кетальной защиты в кислой среде приводит к образованию бисфосфониевых солей **60а-д** (схема 14).

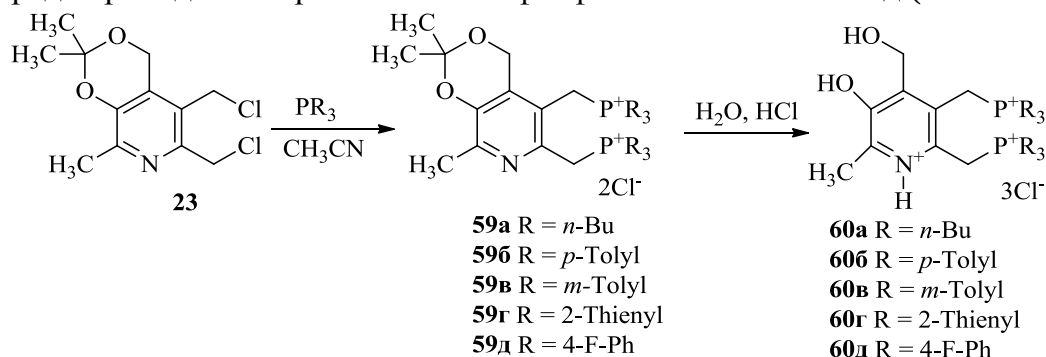


Схема 14

Аналогичным способом получены бисфосфониевая соль **59е**, а после снятия кетальной защиты - бисфосфониевая соль **60е** (схема 15), структуры которых подтверждены методом масс-спектрометрии.

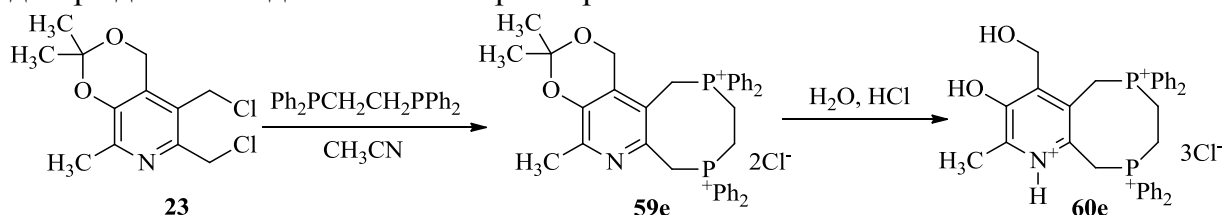


Схема 15

2.3. Варьирование природы противоионов бисфосфониевой соли пиридоксина

Фосфониевая соль **62а** была получена в две стадии. Дибромпроизводное **61** синтезировано взаимодействием соединения **42** с N-бромсукцинимидом (NBS). Было замечено, что при эквимольном соотношении соединения **42** и N-бромсукцинимиды происходит селективное бромирование гидроксиметильной группы в шестом положении пиридоксина (схема 16). Структура соединения **63** по данным РСА представлена на рисунке 4.

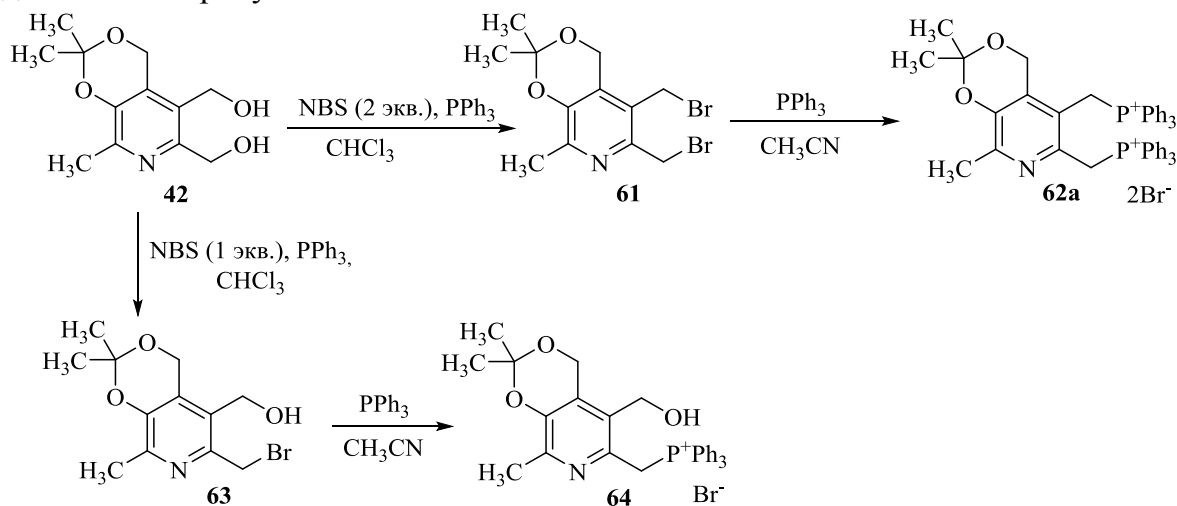


Схема 16

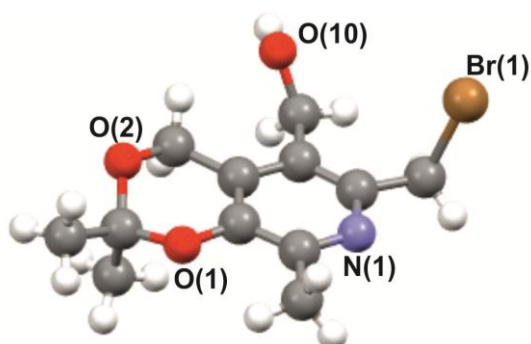


Рисунок 4 – Структура соединения **63** по данным РСА

Важно отметить, что, как и в случае кислотного гидролиза соединения **23** (схема 6, таблица 1), бромирование соединения **42** N-бромсукцинимидом также протекает региоспецифично. Проведенные квантово-химические расчеты показали, что карбкатион **III**, образующийся по механизму S_N1 , также значительно более стабилен по сравнению с другим изомером **IV** (таблица 3).

Таблица 3 – Относительная энергия образования изомерных карбкатионов **III** и **IV** по результатам квантово-химических расчетов методом Хартри-Фока с базисным набором 6-31G*

Структура карбкатиона		
ΔE^0 , ккал/моль	- 4.7	0

Взаимодействием с иодистым калием получена нерастворимая в воде фосфониевая соль **62б**. Аналогичным способом, но уже с выведением из сферы реакции хлорида серебра синтезирована фосфониевая соль **62в** (схема 17).

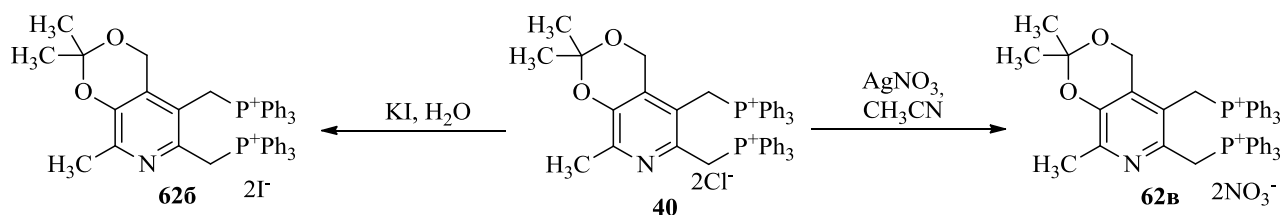


Схема 17

2.4. Антибактериальная активность и цитотоксичность бисфосфониевых солей

Исследование антибактериальной активности проведено в соответствии с разделом 1.2. Изучение цитотоксичности соединений проводилось на эмбриональных клетках почки человека НЕК 293 сотрудником Научно-образовательного центра фармацевтики к.б.н. А.Г. Иксановой. Значения LogP были вычислены с помощью программы Nupur Chem 8.0.8. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты исследований *in vitro* антибактериальной активности и цитотоксичности бисфосфониевых солей

№ соединения	МИК (мкг/мл)				CC ₅₀ (мкг /мл)	LogP
	Грамположительные бактерии		Грамотрицательные бактерии			
	<i>Staphylococ cus aureus</i>	<i>Staphylococ cus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus spp.</i>		
56a	10	10	>1000	>1000	4.0	-0.33
56б	1	1	>1000	>1000	3.0	0.30
56в	10	5	>1000	>1000	2.6	0.17
56г	5	10	1000	>1000	2.0	0.46
56е	5	5	1000	>1000	1.0	0.86
56ж	10	10	1000	>1000	0.5	1.65
56з	12.5	10	>1000	>1000	34.0	-0.90
59a	1.3	1.3	>1000	>1000	200.0	4.02
59б	1	1	>1000	>1000	30.0	0.64
59в	1.3	1.3	1000	>1000	13.0	0.64
59г	100	100	>1000	>1000		0.99
59д	50	50	>1000	>1000		-3.88
59е	125	100	>1000	>1000		-1.21
60a	1000	1000	>1000	>1000		2.83
60б	>1000	>1000	>1000	>1000		-0.54
60в	12.5	12.5	>1000	>1000		-0.54
60г	1000	>1000	>1000	>1000		-0.19
60д	1000	1000	>1000	>1000		-6.34
60е	500	500	>1000	>1000		-2.39
62a	1.3	2.5	>1000	>1000	27.5	0.33
62б	100	100	1000	>1000		0.84
62в	10	10	>1000	>1000		0.32
40	5	5	>1000	>1000	72.0	-0.28
Ванкоми цин	2.5	2.5	>1000	>1000	>1000	

Для всех синтезированных соединений, как и в предыдущем случае (см. таблицу 2), характерен узкий спектр действия в отношении грамположительных бактерий.

Зависимость антибактериальной активности соединений от природы заместителей у ацетального атома углерода является нелинейной и достигает экстремума для ацетала **56б**, содержащего *n*-пропильную группу. Замена фенильных заместителей у атома фосфора в соединении **40** на биоизостерную 2-тиенильную группу приводит к понижению активности (соединение **59г**). По сравнению с фенильными заместителями у атомов фосфора фосфониевые соли с более липофильными фрагментами (*n*-бутил, *m*-толил и *n*-толил) показывают более высокую активность (соединения **59a-в**). Замена противоионов в бисфосфониевых солях приводит к снижению антибактериальной активности в ряду Br⁻ > Cl⁻ > I⁻ > NO₃⁻ (соединения **40**, **62a-в**).

Исследования цитотоксичности синтезированных соединений показали, что они значительно более токсичны по сравнению с ванкомицином.

2.5. Оптимизация структуры бисфосфониевой соли пиридоксина

На заключительном этапе настоящей работы была предпринята попытка оптимизации химической структуры бисфосфониевых солей путем сочетания в молекуле фрагментов, проявивших наибольшую антибактериальную активность.

Фосфониевая соль **65**, содержащая *n*-пропильный заместитель у ацетального атома углерода и *n*-толильные заместители у атома фосфора, получена с хорошим выходом (схема 18).

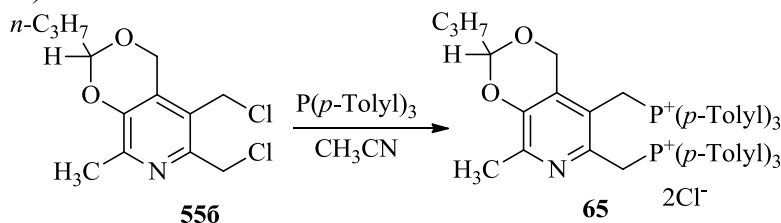


Схема 18

Все синтезированные в разделах 2.1-2.3 и 2.5 фосфониевые соли представляют собой бесцветные кристаллические вещества. Состав и структура полученных соединений доказаны методами ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F – спектроскопии, масс-спектрометрии, в некоторых случаях РСА.

2.6. Антибактериальная активность и цитотоксичность бисфосфониевой соли, содержащей *n*-пропильный заместитель у ацетального атома углерода и *n*-толильные заместители у атома фосфора.

Исследование антибактериальной активности и цитотоксичности *in vitro* соединения **65** проведено согласно разделам 1.2 и 2.4. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты исследований *in vitro* антибактериальной активности и цитотоксичности бисфосфониевой соли **65**

№ соедине ния	МИК (мкг/мл)				CC ₅₀ (мкг /мл)	LogP
	Грамположительные бактерии		Грамотрицательные бактерии			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus spp.</i>		
65	2.5	2.5	1000	1000	1.0	0.99
Ванко мицин	2.5	2.5	>1000	>1000	>1000	

Соединение **65**, содержащее в своей структуре *n*-толильный заместитель у атомов фосфора и *n*-пропильный заместитель у ацетального атома углерода, обладает сопоставимой с ванкомицином антибактериальной активностью, но при этом, однако, уступает другим синтезированным в настоящей работе соединениям.

3. Получение алкенов по реакции Виттига

Фосфониевые соли широко используются в качестве субстратов при получении алкенов по реакции Виттига.

Попытки использования в качестве основания *трет*-бутилата калия или *n*-бутиллития в ТГФ или диоксане оказались неудачными вследствие быстро протекающей реакции гидролиза метиленфосфониевой группы (схема 19).

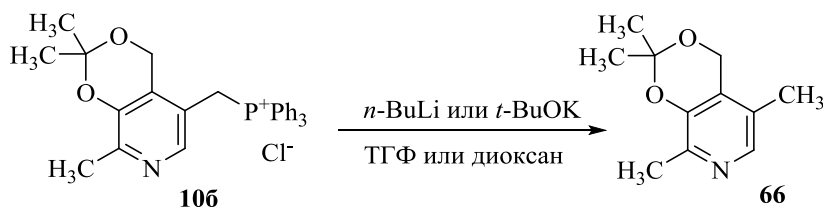


Схема 19

При использовании в качестве основания триэтиламина реакция Виттига фосфониевой соли **10a** с бензальдегидом протекает гладко и с выходом 89% приводит к образованию смеси *E*- и *Z*- изомеров **67** и **68** в соотношении 4:3 (схема 20).

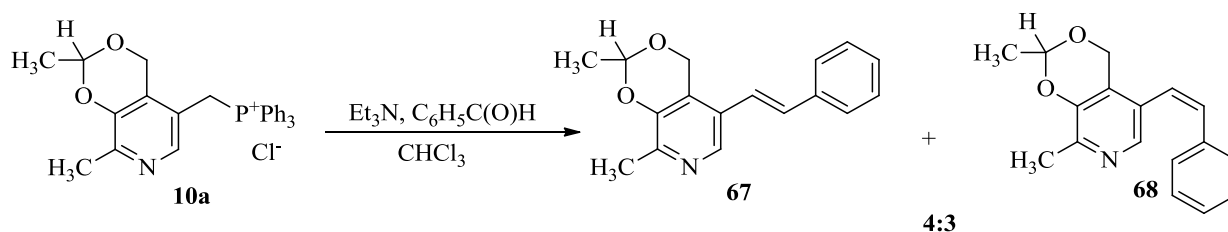


Схема 20

Использование этой же методики для реакции Виттига бензальдегида с бисфосфониевой солью **40** не приводит к целевому продукту. Более продуктивной оказалась методика с использованием в качестве основания гидроксида натрия. При кипячении в хлороформе в течение 60 часов образуется смесь алкенилпроизводных пиридоксина с общим выходом 52%. Методом колоночной хроматографии удалось разделить полученную смесь на моно- и бисалкенилпроизводные пиридоксина. Продукт **71** находится в форме *транс*-изомера, в то время как бисалкенильные продукты представляют смесь *Z,E*- и *E,E*- изомеров в соотношении 4:3 (схема 21).

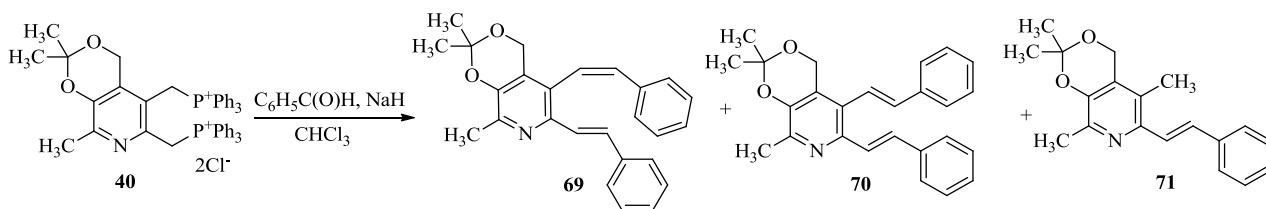


Схема 21

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Синтезировано 72 новых соединения на основе производных пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина, структура которых доказана методами ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , масс-спектрометрии и РСА.
2. Предложены подходы к синтезу ряда шестичленных ацеталей 6-метил-2,3,4-трис(гидроксиметил)пиридин-5-ола и подобраны условия проведения реакции галогенирования (хлорирования, бромирования) для гидроксипроизводных пиридоксина.
3. Реакции бромирования 5,6-бис(гидроксиметил)-2,2,8-триметил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридина и кислотного гидролиза 5,6-бис(хлорметил)-2,2,8-триметил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридина протекают региоспецифично по шестому положению пиридоксина. Экспериментальные данные согласуются с результатами квантово-химических расчетов стабильности региоизомерных карбкатионов в рамках механизма мономолекулярного нуклеофильного замещения ($\text{S}_{\text{N}}1$).
4. Разработан удобный способ получения широкого ряда четвертичных фосфониевых солей на основе производных пиридоксина и 6-гидроксиметилпиридоксина.
5. Некоторые четвертичные фосфониевые соли на основе производных 6-гидроксиметилпиридоксина проявляют высокую антибактериальную активность на штаммах грамположительных бактерий, таких как *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, сопоставимую с антибиотиком «последней надежды» - ванкомицином. Установлена взаимосвязь структуры фосфониевых солей на основе производных пиридоксина с их антибактериальной активностью.
6. Разработаны подходы к синтезу алкенилпроизводных по реакции Виттига моно- и бисфосфониевых солей пиридоксина с бензальдегидом.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Shtyrlyn, N.V. Synthesis of novel 6-substituted sulfur-containing derivatives of pyridoxine / N.V. Shtyrlyn, R.S. Pavelyev, M.V. Pugachev, L.P. Sysoeva, R.Z. Musin, Yu.G. Shtyrlyn // Tetrahedron Letters – 2012. – V.53, Iss. 31. – P. 3967-3970.
2. Pugachev, M.V. Synthesis and antibacterial activity of novel phosphonium salts on the basis of pyridoxine / M.V. Pugachev, N.V. Shtyrlyn, E.V. Nikitina, L.P. Sysoeva, T.I. Abdullin, A.G. Iksanova, A.A. Ilaeva, E.A. Berdnikov, R.Z. Musin, Yu.G. Shtyrlyn // Bioorg. Med. Chem. – 2013. – V. 21, Iss. 14. – P. 4388-4395.
3. Pugachev, M.V. Bis-phosphonium salts of pyridoxine: the relationship between structure and antibacterial activity / M.V. Pugachev, N.V. Shtyrlyn, S.V. Sapozhnikov, L.P. Sysoeva, A.G. Iksanova, E.V. Nikitina, R.Z. Musin, O.A. Lodochnikova, E.A. Berdnikov, Yu.G. Shtyrlyn // Bioorg. Med. Chem. – 2013. – V. 21, Iss. 23. – P. 7329-7341.
4. Пат. 2466728 РФ, МПК C07D213/67, C07F9/54, A61P31/00. Фосфониевые соли на основе производных пиридоксина / Ю.Г. Штырлин, М.В. Пугачев, Н.В. Штырлин; ФГАОУ ВПО КФУ. – Опубл. – 20.11.2012.
5. Пугачев, М.В. Синтез фосфониевых солей на основе производных пиридоксина / М.В. Пугачев, Н.В. Штырлин // VI Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012». Тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2012. – С. 90-91.
6. Пугачев, М.В. Синтез четвертичных фосфониевых солей на основе производных пиридоксина / М.В. Пугачев, Н.В. Штырлин // XIX Международная

научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Тезисы докладов. – Москва, 2012. – С. 373.

7. Штырлин, Н.В. Синтез и антибактериальная активность фосфониевых солей на основе ацеталей пиридоксина / Н.В. Штырлин, М.В. Пугачев, Ю.Г. Штырлин // Всероссийская конференция «Современные проблемы химической науки и образования». Тезисы докладов. – Чебоксары, 2012. – Т.2, С. 204-205.

8. Пугачев, М.В. Синтез моно- и бисфосфониевых солей на основе производных пиридоксина / М.В. Пугачев, Н.В. Штырлин // XI Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского федерального университета «Материалы и технологии XXI века». Тезисы докладов. – Казань, 2012. – С. 56.

9. Пугачев, М.В. Синтез новых антибактериальных препаратов на основе фосфорсодержащих производных пиридоксина / М.В. Пугачев, Н.В. Штырлин, С.В. Сапожников // VII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев-2013». Тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2013. – С. 47-48.

10. Штырлин, Н.В. Синтез аммонийных и фосфониевых солей на основе пиридоксина / Н.В. Штырлин, М.В. Пугачев, С.В. Сапожников // Первая всероссийская конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств». Тезисы докладов. – Москва, 2013. – С. 135.

11. Пугачев, М.В. Селективный синтез фосфониевых солей на основе 6-гидроксиметилпиридоксина / М.В. Пугачев // XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Тезисы докладов. – Москва, 2013. – С. 1.

12. Штырлин, Н.В. Синтез и антибактериальная активность фосфониевых солей на основе пиридоксина / Н.В. Штырлин, М.В. Пугачев, Ю.Г. Штырлин // Первая российская конференция по медицинской химии (MedChemRussia-2013). Тезисы докладов. – Москва, 2013. – С. 275.

13. Пугачев, М.В. Синтез монофосфониевой соли на основе 4-дезоксипиридоксина / М.В. Пугачев, Н.В. Штырлин // XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Тезисы докладов. – Москва, 2014. – С. 52.

14. Сапожников, С.В. Синтез и антибактериальная активность фосфониевых и аммонийных солей на основе пиридоксина / С.В. Сапожников, М.В. Пугачев, Н.В. Штырлин // VIII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2014». Тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2014. – С. 86-87.