

На правах рукописи



ХАЗИЕВ РАИЛЬ МАРАТОВИЧ

**СИНТЕЗ И ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДОКСИНА**

02.00.03 - Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2021

Работа выполнена на кафедре органической и медицинской химии Химического института им. А.М. Бутлерова и отделе медицинской химии научно-образовательного центра фармацевтики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель:

Штырлин Никита Валерьевич

кандидат химических наук, старший научный сотрудник НОЦ фармацевтики ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Официальные оппоненты:

Бурилов Александр Романович

доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией элементоорганического синтеза им. А.Н. Пудовика ИОФХ им. А.Е. Арбузова - обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань.

Марьясов Максим Андреевич

кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры органической и фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону

Защита диссертации состоится «9» декабря 2021 года в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета КФУ.02.01 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» <http://www.kpfu.ru> и на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации <https://vak.minobrnauki.gov.ru/>. Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно-педагогических кадров.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета КФУ.02.01,
кандидат химических наук



Якимова Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Туберкулез – инфекционное заболевание, с которым человечество борется не одно тысячелетие. В настоящее время туберкулез занимает девятое место среди основных причин смертности в мире. Согласно оценкам ВОЗ в 2020 году число умерших от туберкулеза составило 1.2 миллиона человек, а число вновь заболевших около 10 миллионов, причем порядка 500 тысяч из них заболели туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) — формой туберкулеза, вызываемой бактериями, нечувствительными к самым эффективным препаратам первого ряда - изониазиду и рифампицину.

Успех лечения МЛУ-ТБ составляет около 50% и требует длительной терапии (от 12 месяцев и более) с использованием большого количества препаратов первого и второго ряда. Неуклонный рост и распространение резистентных форм туберкулёза, наблюдаемый в последнее время, становится одной из важнейших проблем здравоохранения, поэтому поиск и направленный синтез высокоактивных и безопасных противотуберкулезных препаратов, эффективных, прежде всего, в отношении резистентных штаммов является практически значимой и актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования. Разработка новых противотуберкулезных препаратов, обладающих низкой токсичностью и высокой антимикобактериальной активностью в отношении, прежде всего, резистентных штаммов, остается важнейшей задачей органической и медицинской химии. На основе фундаментальных исследований, проводимых последние два десятилетия в научно-образовательном центре фармацевтики Казанского федерального университета, был разработан новый перспективный подход к созданию высокоэффективных и безопасных инновационных лекарственных средств на основе пиридоксина (витамина В₆). При этом, к началу настоящей работы исследование противотуберкулезных свойств производных пиридоксина было представлено в литературе лишь единичными публикациями, а систематические исследования отсутствовали.

Цели и задачи работы. Целью настоящего диссертационного исследования является синтез широкого ряда соединений на основе производных пиридоксина, содержащих противотуберкулезные фармакофорные фрагменты и исследование их биологической активности. Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие задачи:

- разработка методик синтеза изоникотиноилгидразонов и гидразидов на основе производных витамина В₆;
- разработка подходов к синтезу адамантановых, этан-1,2-диаминовых и пиперазиновых производных на основе витамина В₆;
- проведение первичного скрининга противотуберкулезной активности синтезированных соединений *in vitro* с целью выявления наиболее активных соединений;
- исследование противотуберкулезной активности и токсичности *in vivo* наиболее активных соединений, полученных по результатам первичного скрининга.

Научная новизна работы. Впервые синтезирован широкий ряд изоникотиноилгидразонов, гидразидов, а также адамантановых, этан-1,2-диаминовых и пиперазиновых производных на основе витамина В₆. Показано, что изоникотиноилгидразоны по второму и пятому положениям пиридоксина в растворе

ДМСО существуют в виде *E*-изомеров, в то время как изоникотиноилгидразоны по шестому положению - в виде смеси *E*- и *Z*-изомеров. Изучено влияние УФ-облучения и температуры на взаимные переходы *E*- и *Z*-изомеров.

Предложен удобный способ получения 3-гидрокси-5-гидроксиметил-2,4-диметилпиридин-6-карбальдегида, ключевой стадией которого является селективный гидрогенолиз ацетоксиметильной группы в четвертом положении 5-гидрокси-2,3,4-трис(ацетоксиметил)-6-метилпиридина под действием цинка в уксусной кислоте. Предложены методики селективного ацетилирования гидроксиметильных групп в пятом и шестом положениях 6-гидроксиметилпиридоксина. Показана возможность получения замещенных по второму и шестому положению аминометильных производных пиридоксина путем алкилирования первичных аминов ацетоксиметильными производными пиридоксина.

Скрининг противотуберкулезной активности и токсичности синтезированных соединений *in vitro* и *in vivo* позволил выявить перспективного кандидата в противотуберкулезное лекарственное средство.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны синтетические подходы, позволившие получить широкий ряд ранее неописанных в литературе изоникотиноилгидразонов, гидразидов, а также адамантановых, этан-1,2-диаминовых и пиперазиновых производных на основе витамина В₆. Установлено, что некоторые из производных пиридоксина, содержащих фрагменты адамантана, обладают сопоставимой с противовирусным препаратом амантадином активностью в отношении вируса гриппа Н₃Н₂. В результате скрининга противотуберкулезной активности и токсичности *in vitro* и *in vivo* выявлен перспективный кандидат в лекарственное средство, обладающий высокой противотуберкулезной активностью в отношении штаммов с множественной лекарственной устойчивостью и более низкой токсичностью по сравнению с коммерческими препаратами изониазидом и моксифлоксацином.

Методология и методы исследования. Целевые соединения получены с использованием различных методов классического органического синтеза. Состав и структура соединений доказаны с помощью методов ЯМР-спектроскопии (¹Н, ¹³С, NOESY), масс-спектрометрии высокого разрешения, а в некоторых случаях - рентгеноструктурного анализа и ИК-спектроскопии. Исследование противотуберкулезной активности и токсичности синтезированных соединений *in vitro* проводилось с использованием валидированных биологических методов: метода REMA, пролиферативного МТТ-теста. Исследования *in vivo* регламентировались соответствующими нормативными документами.

Положения, выносимые на защиту:

- методики синтеза изоникотиноилгидразонов и гидразидов на основе производных витамина В₆;
- методики синтеза адамантановых, этан-1,2-диаминовых и пиперазиновых производных на основе витамина В₆;
- методики селективного окисления гидроксиметильных групп в пятом и шестом положениях 6-гидроксиметилпиридоксина;
- методики получения 2- и 6-аминометильных производных пиридоксина путем алкилирования первичных аминов ацетоксиметильными производными пиридоксина;
- результаты исследования противотуберкулезной активности и токсичности синтезированных соединений *in vitro* и *in vivo*.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в постановке целей и задач исследования, интерпретации полученных результатов, самостоятельно выполнил синтез соединений и провел анализ литературных данных. Кроме того, автор участвовал в написании публикаций по материалам работы.

Степень достоверности. Достоверность положений, выносимых на защиту, а также выводов диссертации подтверждена использованием современных методов идентификации химической структуры соединений и выполнением биологических исследований в контролируемых и воспроизводимых условиях с использованием необходимого числа повторностей.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на III Российской конференции по медицинской химии «МедХим-Россия 2017» (Казань, 2017), XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» (Москва, 2020), Международной научно-практической конференции «Современные проблемы химии, фармакологии и фармации» (Чебоксары, 2020), XV Всероссийской молодежной научно-инновационной школы «Математика и математическое моделирование» (Саров, 2021).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликованы три статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и входящих в базы данных Scopus и Web of Science, четыре тезиса докладов на российских и международных конференциях и подана заявка на патент РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 157 страницах машинописного текста, содержит 32 рисунка, 77 схем, 13 таблиц. Диссертация состоит из введения, трех основных глав, заключения и списка литературы, насчитывающего 167 источников.

Благодарности: Автор выражает благодарность и признательность научному руководителю, к.х.н. Штырлину Н.В., а также директору Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета, д.х.н. Штырлину Ю.Г. за постоянную поддержку и понимание, а также за ценные советы и активное участие при обсуждении работы, к.х.н. Агафоновой М.Н., д.х.н. Виноградовой Т.И., к.б.н. Штро А.А., за помощь в проведении биологических экспериментов, н.с. Гришаеву Д.Ю. за съемку масс-спектров, инженеру Хаярову Х.Р. и к.х.н. Гнездилову О.И. за съемку ЯМР-спектров, к.х.н. Исламову Д.Р. за проведение рентгеноструктурного анализа, к.х.н. Гилязетдинову Э.М. и Штырлину В.Г. за помощь в исследовании комплексообразующих свойств, а также всем сотрудникам научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета за помощь в проведении работы. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 18-73-00169.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В рамках диссертационной работы была поставлена задача по разработке методов синтеза соединений на основе пиридоксинового скаффолда с противотуберкулезными фармакофорными фрагментами (гидразоны изоникотиновой кислоты, гидразиды, адамантанамины, производные этан-1,2-диамина), с целью скрининга этих соединений на противотуберкулезную активность.

Предпосылки к использованию пиридоксина в качестве скаффолда при разработке противотуберкулезных средств следующие:

- 1) Пиридоксин - кофактор ферментных систем микобактерий. Наличие его фрагмента в составе молекулы, может не позволить им задействовать все потенциально имеющиеся в их распоряжении механизмы выработки резистентности;
- 2) Наличие у пиридоксина собственных систем активного транспорта. Как следствие, включение в состав лекарственной молекулы распознаваемого фрагмента пиридоксина способно обеспечить улучшенное проникновение через различные биологические барьеры;
- 3) Наличие у производных пиридоксина большого числа функциональных групп доступных для химической модификации противотуберкулезными фармакофорами, а также для введения различных заместителей. Это позволяет влиять на гидрофильно-липофильный баланс соединений, изменять фармакокинетические свойства вещества, увеличивать его биодоступность и уменьшать побочные эффекты.

Методология синтеза изоникотиноилгидразонов и гидразидов на основе производных пиридоксина заключалась во введении фармакофорного фрагмента изониазида в различные положения пиридоксина (рисунок 1).

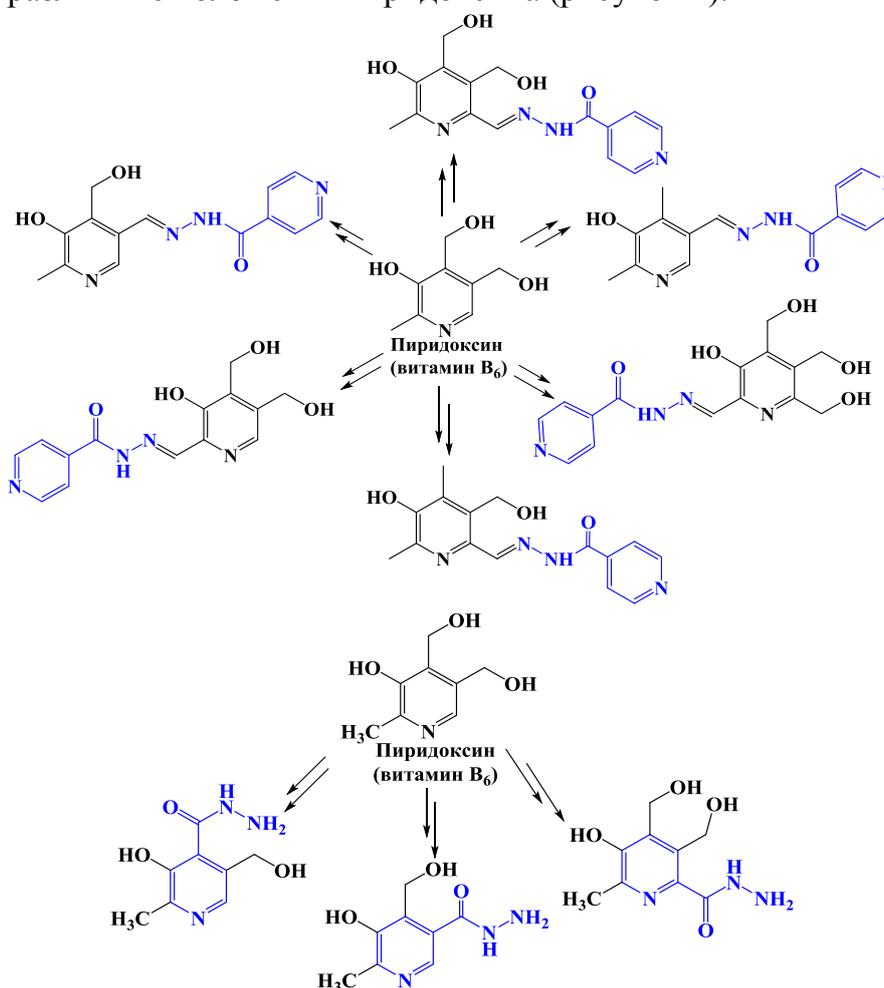


Рисунок 1. Методология синтеза изоникотиноилгидразонов и гидразидов на основе производных пиридоксина

Методология синтеза моно- и диаминов на основе производных пиридоксина представлена на рисунке 2.

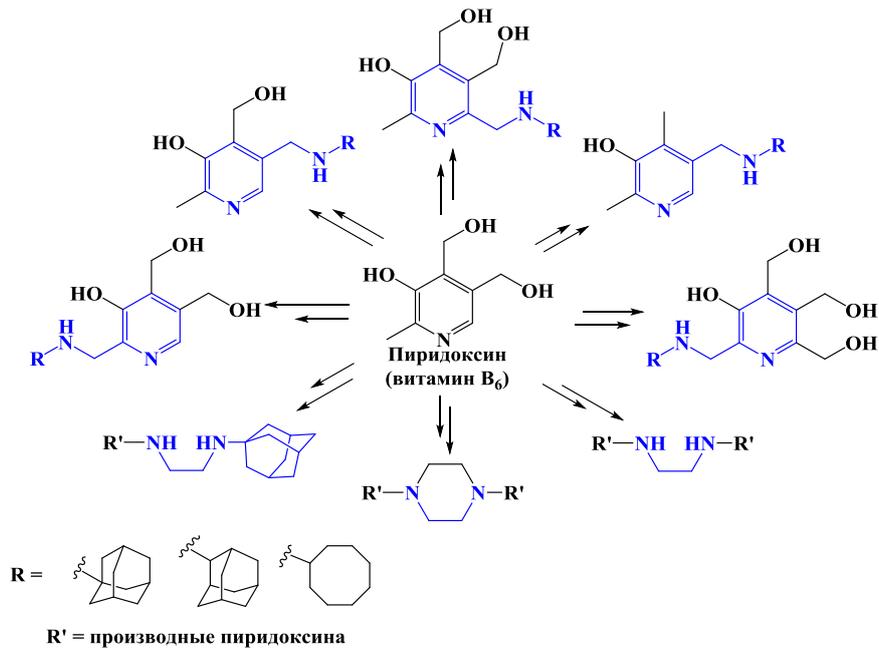


Рисунок 2. Методология синтеза моно- и диаминов на основе производных пиридоксина

1. Синтез изоникотиноилгидразонов на основе производных пиридоксина

Первая часть исследования заключалась в разработке методов синтеза гидразонов изоникотиновой кислоты на основе производных пиридоксина и изучении их физико-химических свойств. Для получения изоникотиноилгидразонов в первую очередь необходимы альдегиды, поэтому все цепочки синтезов сводились к получению этих промежуточных продуктов (в качестве окислителя использовался активированный диоксид марганца).

Изоникотиноилгидразон **4** был синтезирован из пиридоксина в три стадии (схема 1). На первой стадии, в реакции пиридоксина с ацетоном в присутствии избытка хлороводорода (25% от массы раствора), образовывался шестичленный кеталь **2**. Далее, гидроксиметильная группа окислялась до альдегидной под действием диоксида марганца в хлороформе. На последнем этапе проводилось снятие кетальной защиты альдегида **3** в водной уксусной кислоте. Полученный полупродукт, без выделения, реагировал с изониазидом, образуя целевой изоникотиноилгидразон **4**.

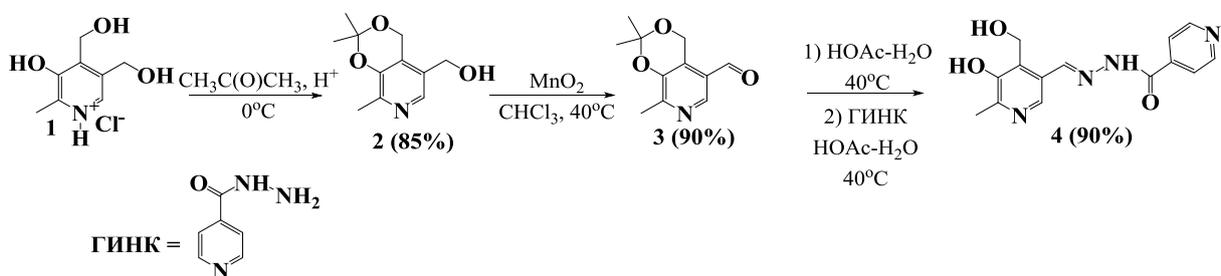


Схема 1

Схожим образом в 4 стадии был синтезирован изоникотиноилгидразон **8** на основе 4-дезоксипиридоксина **6** (схема 2).

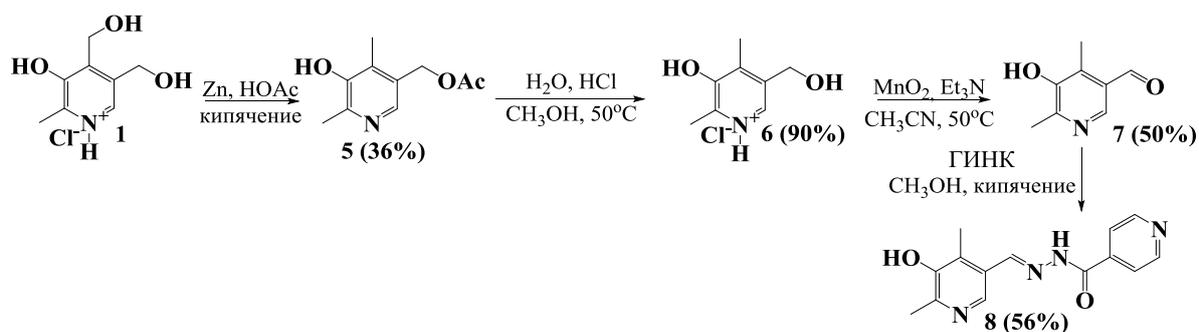


Схема 2

По данным ЯМР ^1H , гидразоны **4** и **8** существуют в виде *E*-изомеров. Это подтверждается характерными химическими сдвигами амидных протонов, которые проявляются в области ~ 12 м.д. (для *Z*-изомеров, согласно литературным данным, они наблюдаются в более слабых полях спектра ЯМР, при 15-16 м.д.)

Синтез следующего изоникотиноилгидразона **12**, на основе семичленного кетала 6-гидроксиметилпиридоксина **10**, представлен на схеме 3.

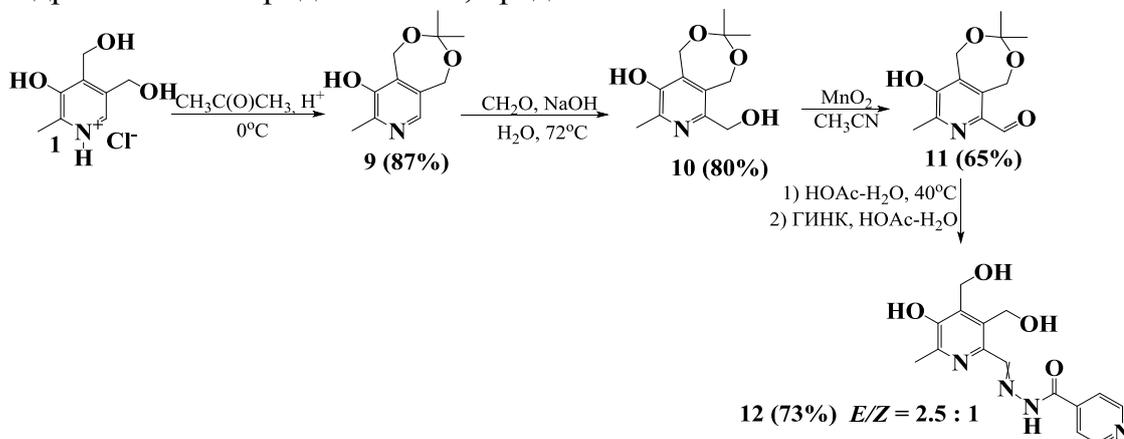


Схема 3

В отличие от изоникотиноилгидразонов **4** и **8**, гидразон **12**, по данным спектра ЯМР ^1H , наблюдается в виде смеси *E*- и *Z*-изомеров в соотношении 2.5:1. Попытки смещения равновесия в сторону *Z*-изомера в растворах ДМСО и метанола под действием УФ-облучения ($\lambda=180\text{-}270$ нм) оказались безуспешны из-за осмоления реакционной смеси. На основе литературных данных, мы полагаем, что это обусловлено образованием *o*-пиридинонметидной структуры, которая склонна к реакциям самоконденсации. Не принесло результата и выдерживание раствора гидразона **12** над силикагелем, повышение температуры раствора, а также протонирование пиридинового атома азота пиридоксина.

Для демонстрации возможности изомеризации изоникотиноилгидразонов по шестому положению пиридоксина под действием УФ-облучения была выбрана тактика защиты всех способных к образованию пиридинонметидов функциональных групп. Для этого была осуществлена кетальная защита гидроксиметильных групп и *tert*-бутоксикарбонильная (Вос) – для ароматической гидроксигруппы.

Взаимодействие альдегида **13** с иониазидом в метаноле приводит к получению гидразона **14** в виде *E*-изомера (схема 4). При проведении реакции в кипящем хлороформе в течение суток наблюдается образование смеси *E*- и *Z*-изомеров **14** и **15** в соотношении 1:1. Аналогичная картина наблюдается при выдерживании раствора соединения **14** в хлороформе под действием УФ-облучения.

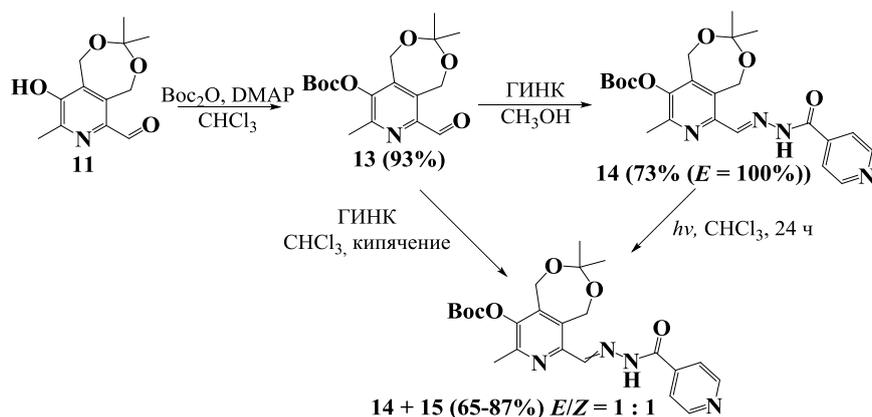


Схема 4

Также взаимодействием альдегида **11** и изониазида в метаноле был синтезирован гидразон **16**, в котором ароматическая гидроксигруппа оставалась открытой, а гидроксиметильные группы были защищены семичленным кетальным циклом. Как и в предыдущем случае, продукт был выделен в виде *E*-изомера (схема 5). Изомеризация соединения **16** под действием УФ-облучения (180-270 нм) в течение 50 часов в метаноле позволила выделить *Z*-изомер **17** почти со 100%-конверсией. Установлено, что в растворе ДМСО этот изомер через 2 месяца полностью переходит в термодинамически более стабильный *E*-изомер **16**.

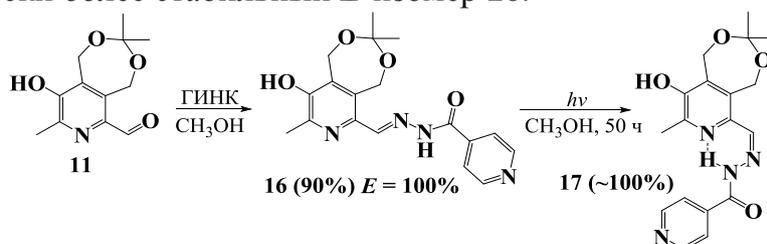


Схема 5

Если все предыдущие изоникотинолгидразоны получались из ранее известных в литературе альдегидов, то альдегид **18** (схема 6) для следующего изоникотиноилгидразона, был синтезирован нами впервые. Из 6-гидроксиметилпиридоксина **19** с выходом 38% было получено соединение **20**, а затем кислотным гидролизом - диол **21**. На рисунке 3 приведена структура соединения **21** по данным РСА.

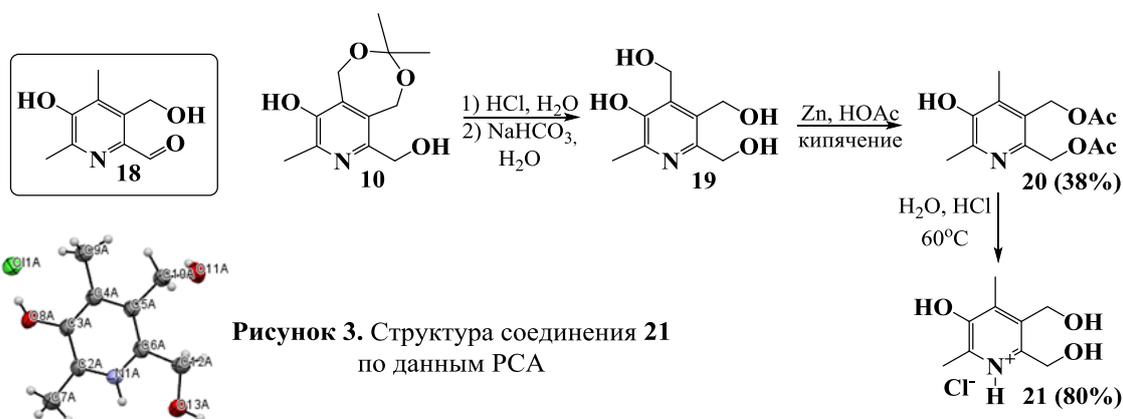
Рисунок 3. Структура соединения **21** по данным РСА

Схема 6

Методом ТСХ также был обнаружен промежуточный продукт этой реакции – соединение **22**, которое можно выделить из реакционной смеси или же получить

независимо, кипячением 6-гидроксиметилпиридоксина **19** в уксусной кислоте (схема 7). Селективный и практически количественный гидрогенолиз ацетоксигруппы по четвертому положению соединения **22** протекает в мягких условиях: в течение 8 часов при комнатной температуре под действием 5 грамм-эквивалентов цинка. Ацетоксигруппа в *para*-положении к ароматической гидроксигруппе подвергается гидрогенолизу значительно труднее: требуется длительное кипячение и большой избыток цинка. Для доказательства гидрогенолиза ацетоксигрупп в четвертом и шестом положениях пиридоксина из ацетата **23** получен диол **24**, структура которого подтверждена с помощью ЯМР NOESY.

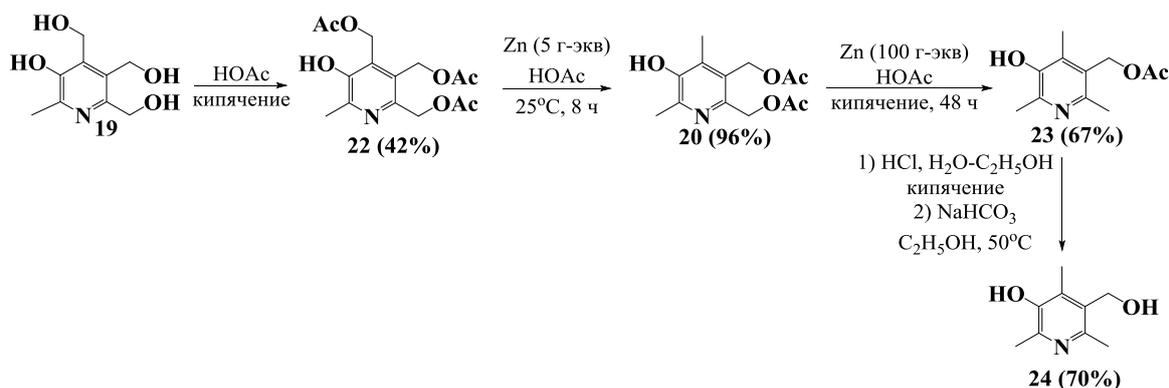


Схема 7

Необходимо отметить, что полностью ацелированное соединение **25**, полученное этерификацией соединения **19** по Стеглиху, подвергается гидрогенолизу значительно медленнее и не селективно, образуя 2,4,6-триметил-3,5-диацетоксипиридин **26** (схема 8). Его структура доказана посредством получения диола **24**.

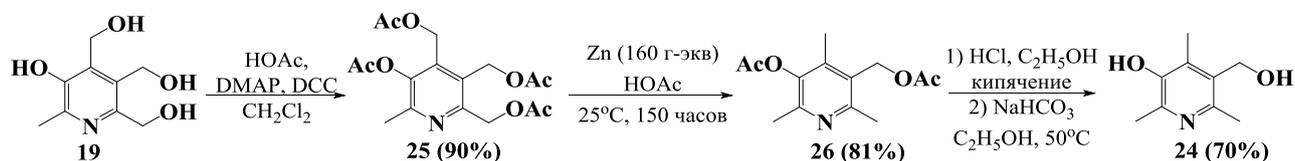


Схема 8

Окислением соединения **21** диоксидом марганца в смеси ацетонитрил-этанол был получен целевой альдегид в виде гемиацетала **18а** (схема 9). Побочным продуктом этой реакции является γ -лактон **27**. Синтез изоникотиноилгидразона **28** проводился конденсацией гемиацетала **18а** и изониазида в метаноле при кипячении. Целевой продукт образовывался в виде смеси *E*- и *Z*- изомеров в соотношении 2:1.

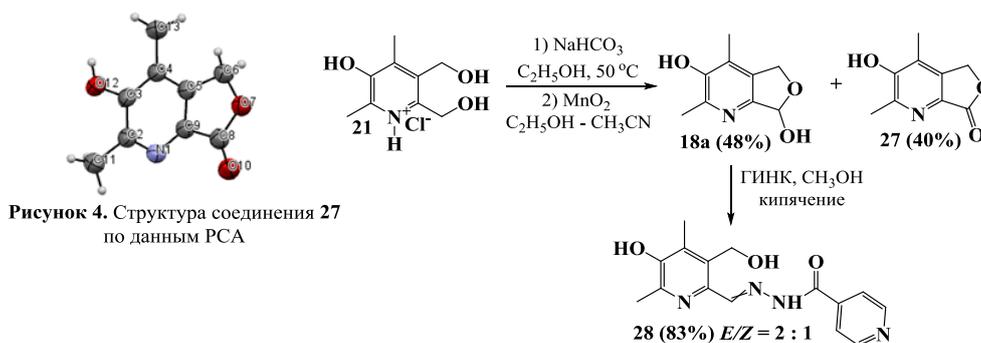


Рисунок 4. Структура соединения 27 по данным РСА

Схема 9

С целью оптимизации метода синтеза гемиацетала **18a** (схема 9) был опробован подход с использованием диацетата **20** (схема 10), ацетокси-группа которого в *орто*-положении к пиридиновому атому азота, оказалась чувствительной к кислотному гидролизу: кипячение в 0.1 н растворе соляной кислоты в течение 30 минут позволило с хорошим выходом получить соединение **29** (структура доказана методом ЯМР NOESY). Дальнейшие процедуры не представляли сложности: окисление образовавшегося спирта **29** диоксидом марганца до альдегида **30**, затем удаление ацетатной группы в щелочной среде и взаимодействие с изониазидом приводило к образованию целевого гидразона **28**.

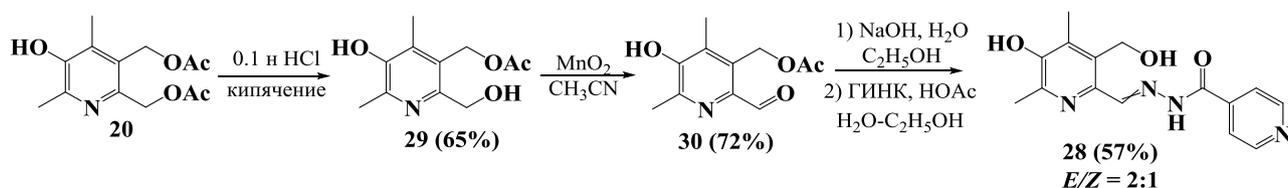


Схема 10

На следующем этапе были синтезированы изоникотиноилгидразоны **36** и **42** по второму положению пиридоксина (схема 11). Ключевой стадией синтеза является реакция Бокельгейде, в результате которой *N*-оксиды производных пиридоксина **32** и **38** перегруппировываются в среде уксусного ангидрида до ацетатов **33** и **39**. Целевые продукты **36** и **42** были выделены в виде *E*-изомеров.

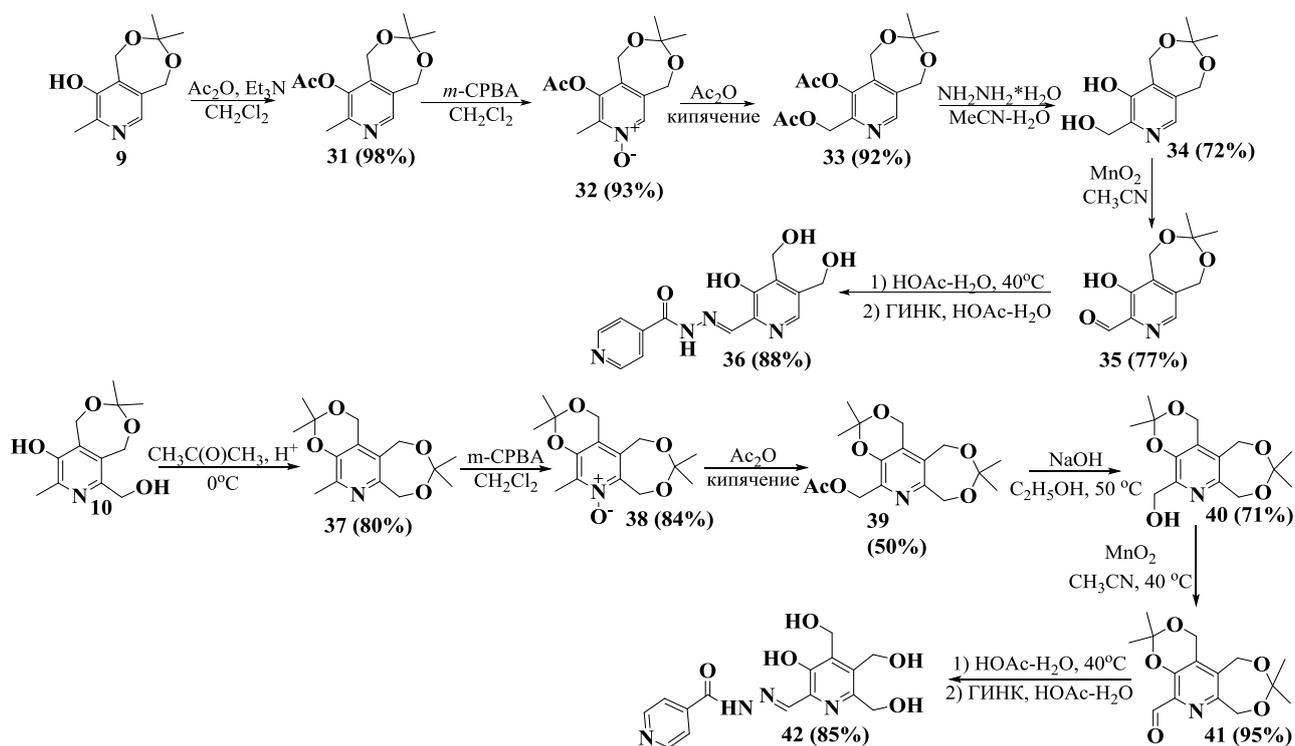


Схема 11

Следует отметить существенный слабopольный сдвиг сигналов протонов ароматических гидроксильных групп гидразонов **36** и **42** (11.89 и 11.88 м.д., соответственно) по сравнению с 5 и 6-замещенными гидразонами **4**, **8** и **12** (8-10 м.д.). Мы полагаем, что это обусловлено образованием внутримолекулярных водородных связей между протоном ароматической гидроксильной группы и атомом азота иминного фрагмента -ОН...N_{C=N}.

2. Синтез гидразидов на основе производных пиридоксина

Вторым типом структур, запланированных к получению в диссертационной работе, стали гидразиды на основе производных пиридоксина.

Получение гидразидов **45** и **49** осуществлялось по литературным методикам посредством внутримолекулярной этерификации карбоксильной и соседней спиртовой группы с образованием γ -лактонов **44** и **48** с последующим гидразинолизом (схема 12).

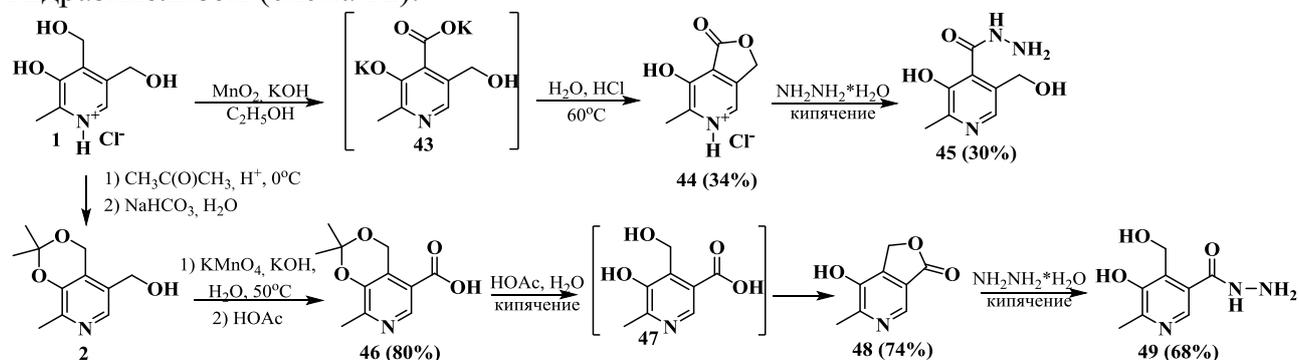


Схема 12

В отличие от гидразидов **45** и **49**, методика получения гидразида по шестому положению пиридоксина **54** (схема 13) в литературе была не описана. Поскольку гидразинолиз γ -лактонов **44** и **48** протекает достаточно легко, то мы также решили взять за основу соответствующий лактон.

По аналогии с методикой получения γ -лактона **27** из диола **21** (при действии диоксида марганца (см. схему 9)), окисление диола **50** диоксидом марганца в хлороформе приводило к селективному получению лактона **51** (схема 13). В ЯМР ^1H спектре реакционной смеси, помимо основного продукта, также был обнаружен изомерный лактон **52** в количестве около 10 %. Структуры лактонов **51** и **52** по данным РСА представлены на рисунках 5 и 6. Дальнейшее взаимодействие лактона **51** с гидразингидратом приводило к получению гидразида **53**. Однако, дальнейшее удаление кетальной защиты даже в слабокислых и нейтральных условиях ($\text{pH} = 4-7$) не позволило получить целевое соединение **54**: вместо него образовывался лактон **55**. Попытки гидразинолиза этого соединения в различных условиях путем варьирования температуры и времени реакции успехом не увенчались.

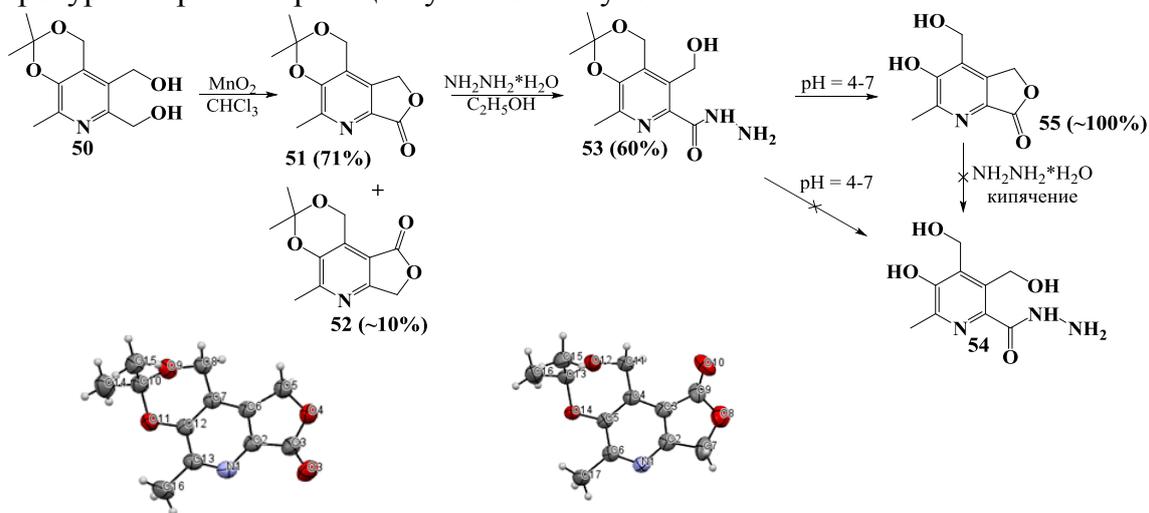


Рисунок 5. Структура соединения **51** по данным РСА

Рисунок 6. Структура соединения **52** по данным РСА

Схема 13

В процессе работы, мы решили подробнее остановиться на стадии окисления диола **50** в γ -лактон **51**. При проведении реакции окисления в течение 1 часа с последующей колоночной хроматографией были выделены две фракции - смесь гемиацеталей **56** и **57** (суммарный выход 52%, соотношение 2.7:1) и смесь лактонов **51** и **52** (суммарный выход 38%, соотношение 19:1) (схема 14).

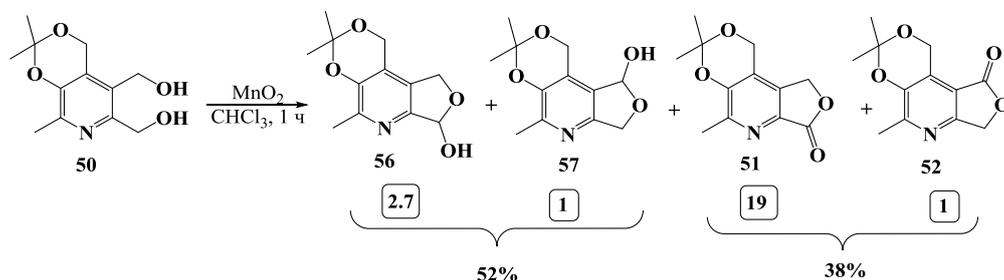


Схема 14

Для установления спектро-структурной корреляции полученных соединений были проведены встречные синтезы изомеров **56** и **57**.

Синтез гемиацетала **56** осуществляли путем предварительной защиты гидроксиметильной группы в шестом положении (схема 15). В качестве защиты использовали ацетатную группу: высокого выхода продукта **58** удается достичь дробным добавлением небольшого избытка уксусного ангидрида в течение нескольких дней. Структура соединения **58** была подтверждена методом РСА и приведена на рисунке 7. Дальнейшее окисление гидроксиметильной группы диоксидом марганца и удаление на последней стадии ацетатной группы карбонатом калия приводило к получению гемиацетала **56**.

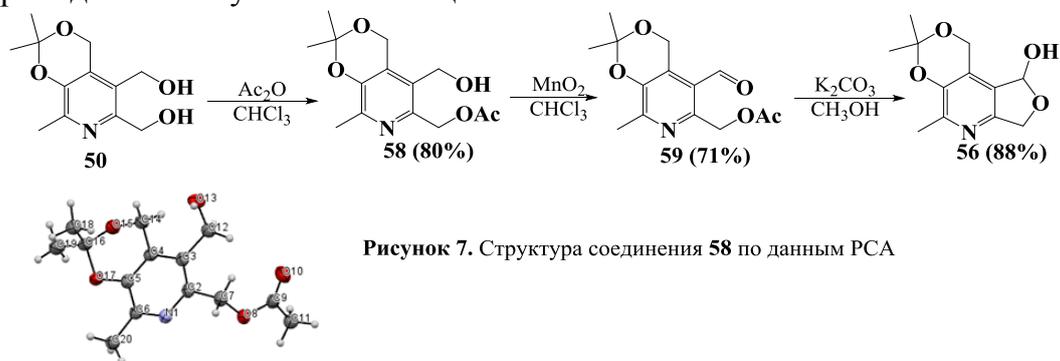
Рисунок 7. Структура соединения **58** по данным РСА

Схема 15

Защита ацетатной группой была применена и для получения гемиацетала **57** (схема 16). С использованием уксусной кислоты, DCC и DMAP из трех возможных ди- и моноацетатов удается выделить моноацетат **60** с выходом 35 % и деацетилированием в условиях, аналогичных реакциям на схеме 15, получить гемиацеталь **57**.

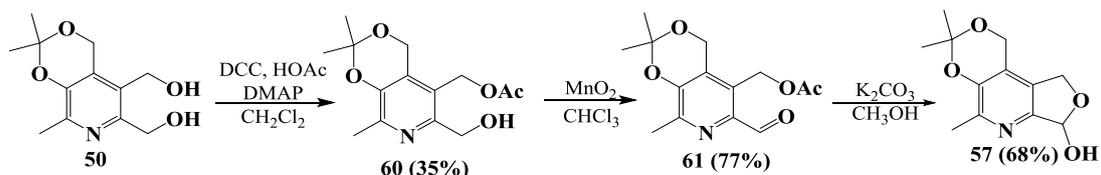


Схема 16

Представляло интерес более подробно рассмотреть реакцию окисления гемиацетала **57** диоксидом марганца в хлороформе (схема 17).

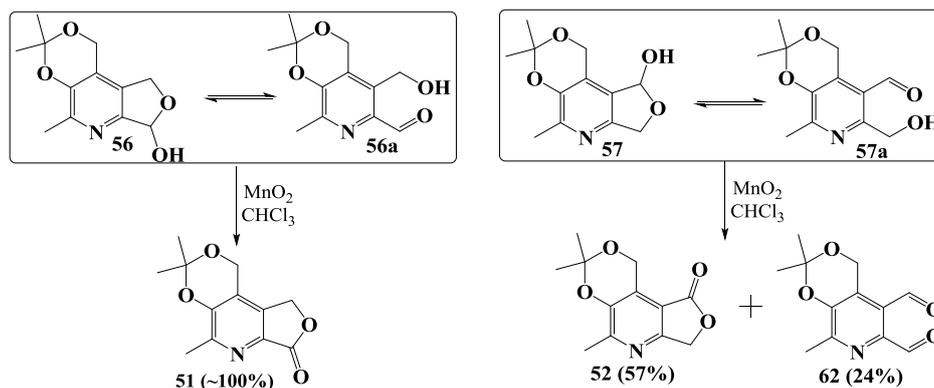


Схема 17

Оказалось, что наряду с соединением **52** образуется еще один продукт реакции - диальдегид **62**, выделенный в количестве 24%. При окислении гемиацетала **56** в тех же условиях единственным продуктом оказался лактон **51**.

В спектрах ЯМР ¹H гемиацеталей **56** и **57** в CDCl₃, помимо сигналов циклических форм, присутствуют сигналы гидроксиальдегидов **56a** и **57a** (соотношение таутомерных форм **56-56a** 2:1, **57-57a** – 3:1). При переходе к более полярному растворителю DMSO-*d*₆ наблюдается значительное смещение равновесия в сторону гемиацетальной формы. Существенный сдвиг в сторону циклической формы наблюдается и в дейтерометаноле.

3. Синтез производных пиридоксина, содержащих адамантановые и циклооктиламиновые фрагменты

Для получения производных пиридоксина, содержащих адамантановый фрагмент, использовались реакции различных адамантиламинов (1-адамантиламин и 2-адамантиламин), а также их биоизостерного аналога циклооктиламина, с электрофильными производными пиридоксина – ацетатами, хлоридами и альдегидами. Важнейшей структурной особенностью данных соединений являлось наличие диаминового фрагмента (противотуберкулезный фармакофор), в котором один из атомов азота был включен в состав пиридинового цикла пиридоксина, а другой связан с другим фармакофором – адамантаном, который помимо противотуберкулезной активности может способствовать появлению у подобных соединений также и противовирусных свойств.

Синтез соединений **64a-в** основывался на восстановительном аминировании альдегида **3** 1- и 2-адамантилминами и циклооктиламином (схема 18). Промежуточные имины без выделения обрабатывались борогидридом натрия в метаноле с получением соединений **63a-в**. На последней стадии удаляли кетальную защиту с получением производных **64a-в**. С целью проверки влияния липофильности на противотуберкулезную активность, на основе альдегида **65** было получено соединение **66г**, содержащее пентильный заместитель у ацетального атома углерода.

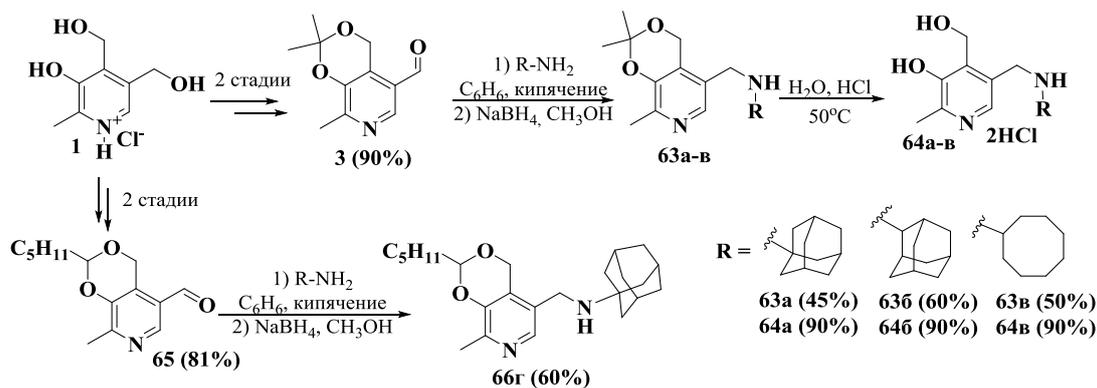


Схема 18

Аналогичные производные были синтезированы на основе 4-дезоксипиридоксина **6** (схема 19). Синтез осуществлялся первоначальным хлорированием гидроксиметильной группы 4-дезоксипиридоксина **6** тионилхлоридом. Затем аминирование полученного хлорпроизводного **67** (схема 19) приводило к образованию целевых производных **68a-в** с выходами 25-42 %.

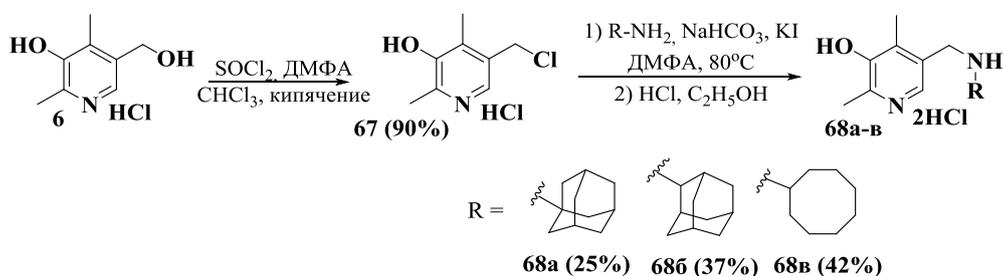


Схема 19

При получении 6-аминометильных производных пиридоксина, помимо восстановительного аминирования, хорошо зарекомендовал себя способ введения аминотетильной группы посредством взаимодействия амина с промежуточным *para*-пиридинометидным интермедиатом **70**. В качестве предшественника такого интермедиата был использован диацетат **69** (схема 20). Взаимодействие с двукратным мольным избытком первичного амина в метаноле при комнатной температуре с последующим кислотным гидролизом приводило к получению соединений **72a-в**.

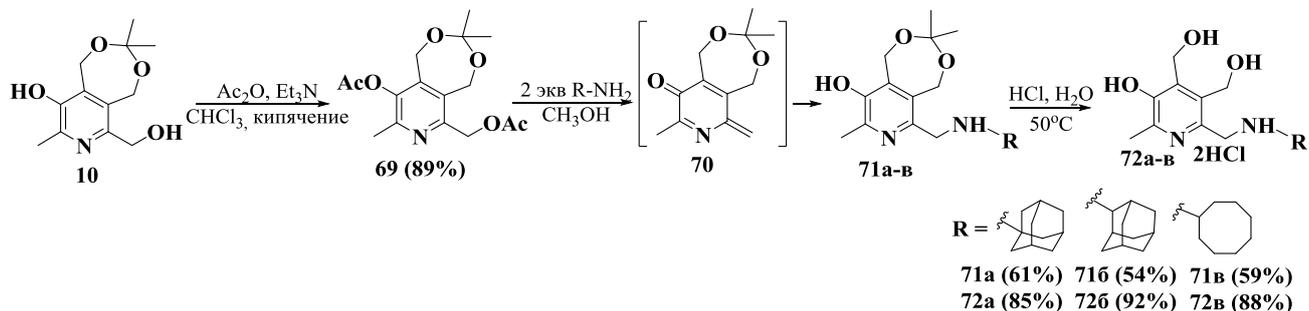


Схема 20

На схеме 21 представлен предполагаемый механизм образования производных **71a-в**. На первой стадии образуется моноацетат **73**. Далее проходит отщепление ацетокси-группы с формированием *n*-пиридинометида **70**, который в реакции со вторым молекулой амина образует целевые продукты **71a-в**.

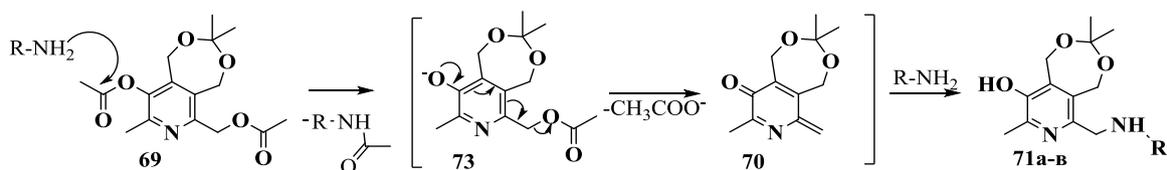


Схема 21

В доказательство представленного на схеме 21 механизма реакции, можно привести следующие аргументы:

1. При порционном добавлении адамантан-1-амина к диацетату **69** из реакционной смеси можно выделить промежуточный моноацетат **73**. Данное соединение также было получено прямым взаимодействием уксусного ангидрида и соединения **10** в этилацетате (схема 22). Далее, взаимодействие полученного моноацетата **73** с одним молем адамантан-1-амина в метаноле приводило к образованию продукта **71a** с выходом 77% и метилового эфира **74** с выходом 17%. При замене метанола на ацетонитрил выход целевого продукта составил 92% (схема 22).

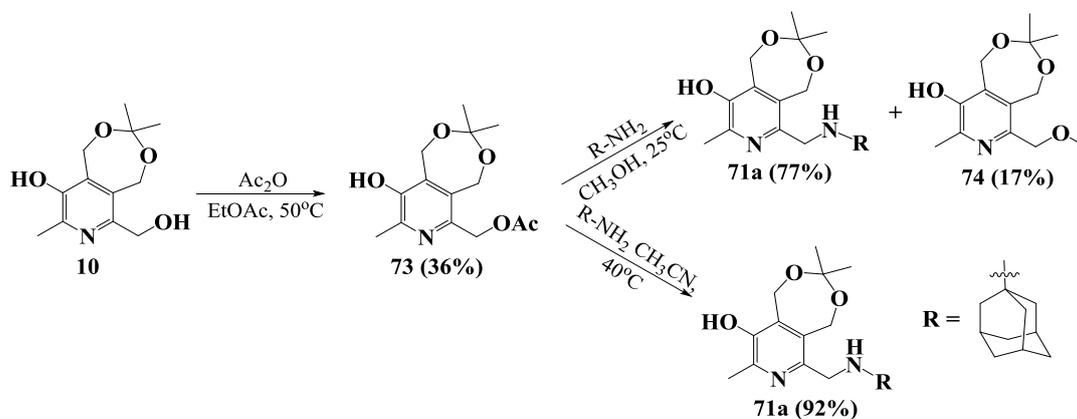


Схема 22

2. Введение защиты ароматической гидроксильной группы и проведение реакции в условиях, аналогичных приведенным на схеме 20, не приводит к образованию целевого продукта и сопровождается омылением ацетата **76** с образованием соединения **75** (схема 23).

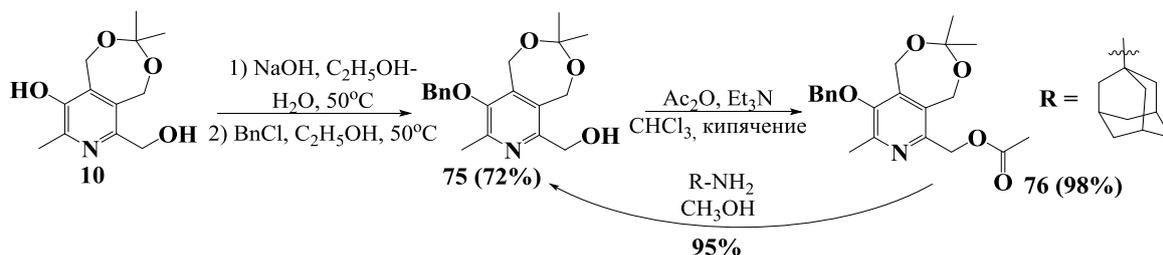


Схема 23

Следующим типом целевых соединений стали производные пиридоксина, в которых аминоадамантановый и циклооктиламиновый фрагменты присутствовали во втором положении (схемы 24 и 25). Получение соединений **78a-b** осуществлялось через *орто*-пиридинометидный интермедиат **77**, который образовывался из диацетата **33**. На завершающем этапе проводился гидролиз семичленного кетала в кислой среде с образованием целевых продуктов **79a-b** (схема 24).

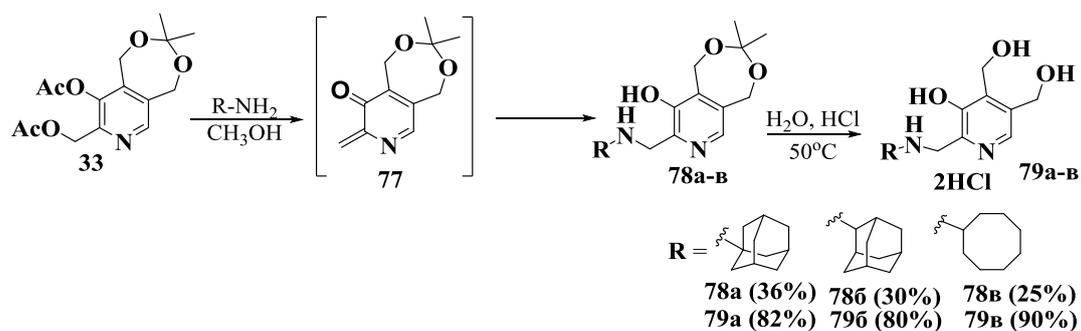


Схема 24

Соединения **80а-в** получали из альдегида **41**, вовлечением последнего в реакцию с аминами в присутствии *n*-толуолсульфокислоты и последующим восстановлением образующихся иминов боргидридом натрия в метаноле при 25 °С. На последней стадии одновременным снятием шести- и семичленных кетальных циклов в кислой среде получали соединения **81а-в** (схема 25).

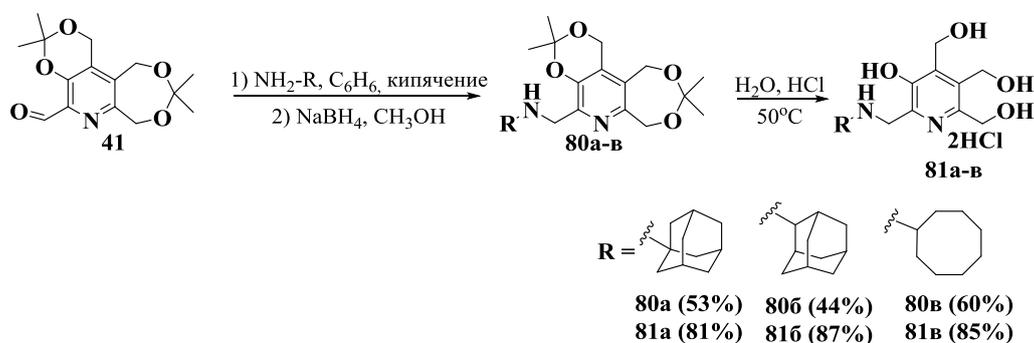


Схема 25

4. Синтез производных пиридоксина, содержащих фрагменты этан-1,2-диамина и пиперазина

Из литературных данных известно, что производные этан-1,2-диамина являются одним из перспективных классов соединений для разработки противотуберкулезных средств. Поэтому, в рамках настоящей работы была поставлена задача по синтезу производных пиридоксина, содержащих в своем составе этилендиаминовые, а также биоизостерные им пиперазиновые фрагменты, которые также обладают противотуберкулезными свойствами.

Синтез симметричных производных этан-1,2-диамина на основе производных пиридоксина по пятому положению проводили по реакции восстановительного аминирования (схема 26). Образующиеся при взаимодействии альдегидов **3** и **7** с этан-1,2-диамином имины, без выделения, обрабатывали борогидридом натрия с получением диаминов **82** (переводили в гидрохлорид) и **83**. Для последнего проводилось удаление шестичленного кетального цикла в кислой среде с получением гидрохлорида **84**.

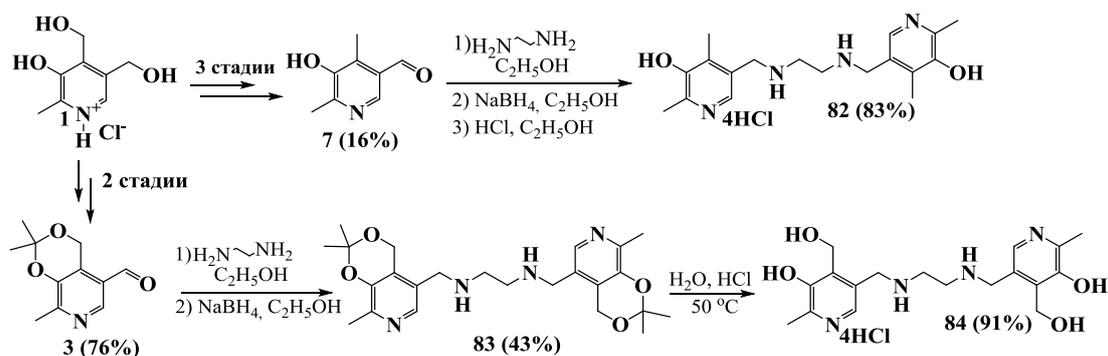


Схема 26

Использование аналогичного подхода для получения производного этилендиамина на основе 6-карбальдегидпиридоксина **11** оказалось затруднительным. Напротив, мезилатная защита ароматической гидроксильной группы позволила провести реакцию с этилендиамином с получением целевого бис-имина **86** (схема 27). Дальнейшее восстановление этого соединения борогидридом натрия привело к бис-диамину **87**. Однако попытка снятия мезилатной защиты в щелочной среде оказалась неудачной вследствие осмоления реакционной смеси. По этой причине нам удалось получить только соединение **89** удалением кетальной защиты в кислой среде.

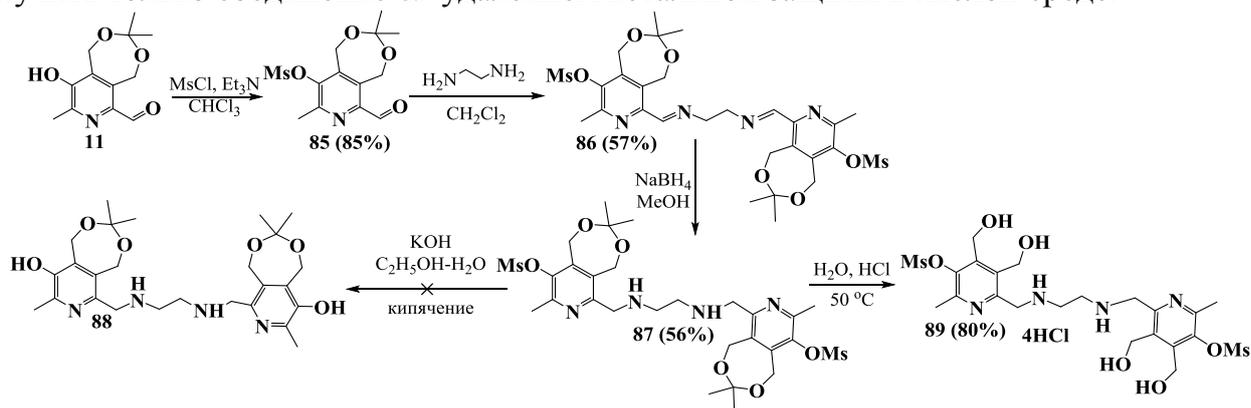


Схема 27

Алкилированием пиперазина двумя молями галопроизводного пиридоксина **67** и последующим подкислением было получено соединение **93**. Алкилирование использовалось и для синтеза соединений **91** и **95**, которые затем, удалением кетальных групп в кислой среде, переводились в гидрохлориды **92** и **96** (схема 28).

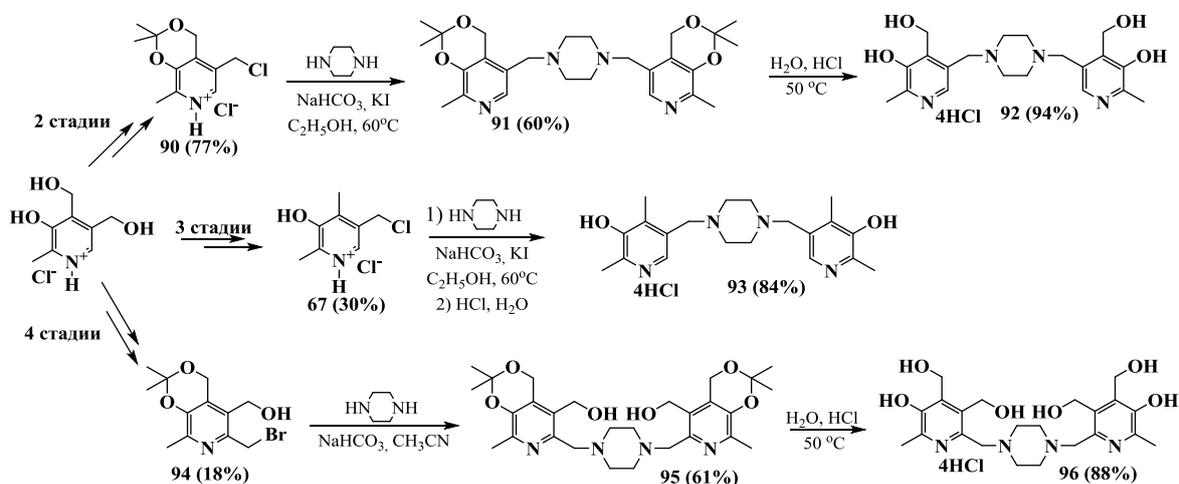
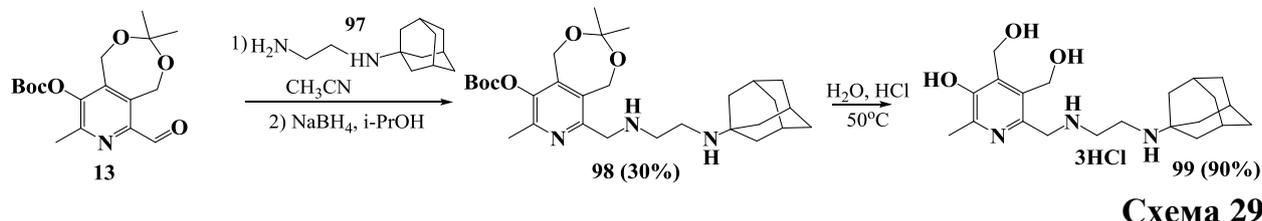
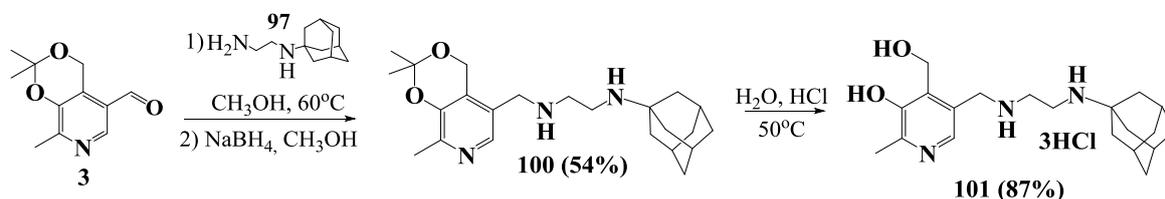


Схема 28

Также были синтезированы несимметричные производные этан-1,2-диамина, в которых один из фрагментов является производным пиридоксина, а другой - адамантана. Соединение **98** синтезировалось путем восстановительного аминирования альдегида **13** N-(1-адамантил)этилендиамином **97**, полученным по литературной методике. На последнем этапе в кислой среде удалялась кетальная защита с получением продукта **99** (схема 29).



Аналогичным способом происходило получение производных **100** и **101** из альдегида **3** (схема 30).



5. Исследование противотуберкулезной активности синтезированных соединений *in vitro*

Первоначальный скрининг противотуберкулезной активности синтезированных соединений *in vitro* на штамме *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv выполнялся в ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» (СПб НИИФ) под руководством д.м.н. Виноградовой Т.И. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) исследуемых соединений определяли с помощью метода REMA. В качестве препаратов сравнения использовали препараты изониазид, рифампицин, этамбутол и моксифлоксацин.

Результаты исследования показали, что лишь 4 соединения обладают значимой активностью, причем изоникотиноилгидразон **12** оказался наиболее активным с величиной МИК равным 0.62 мкг/мл (таблица 1).

Таблица 1. Данные по противотуберкулезной активности наиболее активных из синтезированных соединений на штамме *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

Соединение	МИК, мкг/мл
4	5.0
8	5.0
12	0.62
84	5.0
Изониазид	0.062
Рифампицин	0.125
Этамбутол	1.25
Моксифлоксацин	0.19

Для соединения **12** была проведена оценка противотуберкулезной активности на трех клинических штаммах *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью из коллекции штаммов ФГБУ «СПб НИИФ». На всех трех штаммах величина МИК соединения **12** составила 2.5 мкг/мл, что представляет особенный интерес, поскольку все эти штаммы устойчивы к изониазиду и еще (минимум) к пяти препаратам первого и второго ряда.

6. Исследование противовирусной активности соединений, содержащих фрагмент адамантана

Из литературных данных известно, что многие аминокислотные производные адамантана обладают высокой противовирусной активностью. Наличие в составе ряда из синтезированных в работе соединений аминокислотных фрагментов подтолкнуло нас к исследованию их противовирусной активности. Исследования проводили на штамме гриппа подтипа H3N2 (A/Aichi/2/68) в ФГБУ "НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева" под руководством к.б.н. А.А. Штро. Эксперименты проводили на культурах клеток MDCK с определением величин эффективной концентрации препарата, которая снижает титр вируса на 50 % (IC_{50}), цитотоксичности (CC_{50}) и индекса селективности (SI , CC_{50}/IC_{50}).

Наибольшую активность проявили соединения **64a** ($IC_{50} = 88$ мкг/мл, $CC_{50} = 941$ мкг/мл, $SI = 10.6$), **72б** ($IC_{50} = 52$ мкг/мл, $CC_{50} = 509$ мкг/мл, $SI = 9.7$) и **72в** ($IC_{50} = 68$ мкг/мл, $CC_{50} = 549$ мкг/мл, $SI = 8.1$), эффективность которых сопоставима с активностью амантадина ($IC_{50} = 70$ мкг/мл, $CC_{50} = 606$ мкг/мл, $SI = 8.7$). В то же время ни одно из полученных соединений не смогло превзойти римантадин по противовирусной активности и селективности ($IC_{50} = 1$ мкг/мл, $CC_{50} > 500$ мкг/мл, $SI > 500$).

7. Исследование токсичности и противотуберкулезной активности соединения **12** *in vitro* и *in vivo*

Для соединения **12** дополнительно была проведена оценка токсичности *in vitro* на 4 условно-нормальных клеточных линиях (WI38 – эмбриональные клетки легкого человека, HEK 293 – эмбриональные клетки почки человека, Ch.L – клетки печени, MSK – мультипатентные клетки) с использованием МТТ-теста (таблица 2). Исследования были проведены в отделе доклинических исследований НОЦ фармацевтики КФУ под руководством к.б.н. Агафоновой М.Н.

Таблица 2. Значения CC_{50} соединения **12** на различных клеточных линиях.

Соединение	CC_{50} (мкг/мл)			
	HEK-293	MSK	Ch.L	WI38
12	14.06 ± 0.76	21.52 ± 1.04	8.46 ± 0.83	5.12 ± 0.92
Изониазид	6.45 ± 0.45	7.16 ± 0.92	2.04 ± 0.68	1.70 ± 0.42
Этамбутол	7.92 ± 0.94	14.78 ± 1.09	4.22 ± 0.72	4.06 ± 1.04
Моксифлоксацин	10.98 ± 0.52	13.25 ± 1.14	6.14 ± 1.04	4.76 ± 0.39

Как показали результаты исследования соединение **12** является существенно менее токсичным (в 1.5-3 раза) в сравнении с референсными противотуберкулезными препаратами, что позволяет предполагать его меньшую нефро- и гепатотоксичность в экспериментах *in vivo*.

Далее, для соединения **12** проводилось исследование острой токсичности на мышах линии ICR (CD-1) при внутрижелудочном введении в отделе доклинических исследований НОЦ фармацевтики КФУ под руководством к.б.н. Агафоновой М.Н.. При введении соединения **12** в дозе 2000 мг/кг не наблюдалось гибели животных. Таким образом, величина ЛД₅₀ составляет более 2000 мг/кг и соединение **12** при внутрижелудочном введении мышам существенно менее токсично, чем изониазид (ЛД₅₀ 170 мг/кг) и моксифлоксацин (ЛД₅₀ 500 мг/кг).

Оценка терапевтической эффективности соединения **12** была исследована в релевантной модели *in vivo* на мышах-самцах линии C57black/6 в СПб НИИФ под руководством д.м.н. Виноградовой Т.И. (таблица 3). Введение изучаемых соединений животным проводили ежедневно, начиная с четвертого дня после заражения. Длительность курса лечения составила 5 недель (время, когда в контрольной группе зараженных животных без лечения смертность достигла 70%).

Таблица 3. Показатели тяжести течения туберкулезной инфекции у мышей C57black/6, зараженных *M. tuberculosis H37Rv*, через 5 недель от начала лечения

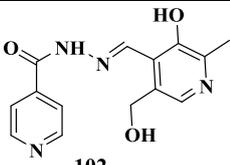
№ гр.	Название препарата, доза, путь введения	Летальность (%)	Число колоний микобактерий в легких (КОЕ× 10 ³)
1	Зараженные животные без лечения	70.0	129.57±4.33
2	12 (10 мг/кг, per os)	10.0	8.86±0.83
3	Моксифлоксацин (7 мг/кг, per os)	0	41.60±5.85
4	Изониазид (10 мг/кг, подкожно)	0	0.89±0.34

При анализе показателей терапевтической эффективности соединения **12** наблюдалось значительное уменьшение летальности (10%) в сравнении с контрольной группой (70%). Эффективность гидразона **12** значительно превосходила таковую для моксифлоксацина и лишь немного уступала изониазиду.

8. Исследование комплексообразующих свойств соединения **12**

Из литературы известно, что вследствие высокой комплексообразующей способности с ионами Fe(III) близкий структурный аналог соединения **12** - изоникотиноилгидразон 4-пиридоксаля **102** – не смог пройти полный цикл клинических исследований по причине возникновения у пациентов анемии. Поэтому для синтезированного в настоящей работе изоникотиноилгидразона **12** было важно исследовать комплексообразующую способность с ионами Fe(III). С этой целью на кафедре неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ, под руководством к.х.н., доц. Штырлина В.Г., методом спектрофотометрии было исследовано комплексообразование соединения **12** с ионами Fe(III) в сравнении с соединением **102** (таблица 4).

Таблица 4. Условные ступенчатые константы образования (lgK₂) комплексов железа (III) с соединениями **12** и **102** при pH 6.0 (MES-буфер (0.01 M), T = 25.0±0.1 °C)

Соединение	lgK ₂	ε ₅₀₀ , M ⁻¹ cm ⁻¹
12	2.86 ± 0.07	9150
	3.82 ± 0.07	2060

Следует подчеркнуть, что представленные в Таблице 4 константы равновесий являются условными, поскольку они явно не учитывают отрыв протонов от лигандов и относятся к общей их концентрации. Тем не менее, рассчитанные таким образом константы строго передают относительную стабильность обоих комплексов в одних и тех же условиях. Относительная стабильность комплексов **12** и **102** с Fe(III) четко выражается путем сравнения условных констант образования второй ступени ($\lg K_2$).

Таким образом, соединение **12** имеет значительно меньшую комплексообразующую способность с ионами Fe(III) по сравнению с изоникотиноилгидразоном 4-пиридоксала **102**, что позволяет надеяться на отсутствие у пациентов побочного эффекта анемии при его клиническом использовании.

Обобщая результаты исследования противотуберкулезной активности и токсичности *in vitro* и *in vivo* синтезированных в диссертационной работе соединений можно сделать вывод, что изоникотиноилгидразон 6-карбальдегида пиридоксина **12** является перспективным кандидатом в противотуберкулезное лекарственное средство и заслуживает прохождения официальных доклинических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны методики синтеза 83 новых производных пиридоксина, структуры которых доказаны методами ЯМР ^1H , ^{13}C , масс-спектрометрии, а в ряде случаев - двумерной ЯМР-спектроскопии, РСА и ИК-спектроскопии.
2. Показано, что изоникотиноилгидразоны по второму и пятому положениям пиридоксина в растворе ДМСО существуют в виде E-изомеров, в то время как изоникотиноилгидразоны по шестому положению - в виде смеси E- и Z-изомеров. Показано влияние УФ-облучения и температуры на взаимные переходы E- и Z-изомеров.
3. Предложен способ получения 3-гидрокси-5-гидроксиметил-2,4-диметилпиридин-6-карбальдегида, ключевой стадией которого является селективный гидрогенолиз ацетоксиметильной группы в четвертом положении 5-гидрокси-2,3,4-трис(ацетоксиметил)-6-метилпиридина под действием цинка в уксусной кислоте.
4. Разработаны методики селективного окисления гидроксиметильных групп в пятом и шестом положениях 6-гидроксиметилпиридоксина.
5. Показана возможность получения 2- и 6-аминометильных производных пиридоксина путем алкилирования первичных аминов ацетоксиметильными производными пиридоксина.
6. Установлено, что некоторые из производных пиридоксина, содержащие фрагменты адамантана, обладают сопоставимой с противовирусным препаратом амантадином активностью в отношении вируса гриппа H3N2.
7. По результатам скрининга противотуберкулезной активности синтезированных соединений *in vitro* выявлено четыре активных соединения. Дальнейшие углубленные исследования противотуберкулезной активности и токсичности *in vitro* и *in vivo* позволили выявить перспективного кандидата в противотуберкулезное лекарственное средство.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Хазиев, Р.М. Синтез гидразидов на основе производных пиридоксина и исследование их антимикобактериальной активности / Р.М. Хазиев, Н.В. Штырлин,

О.А. Лодочникова, Н.В. Волобуева, Р.В. Честнова, А.П. Алексеев, Е.И. Романова, К.В. Балакин, Ю.Г. Штырлин // Журн. орг. химии. – 2018. – Т. 54, Вып. 3. – С. 421-425.

2. **Khaziev, R.** Synthesis and antimicrobial activity of adamantyl substituted pyridoxine derivatives / R. Khaziev, N. Shtyrlin, R. Pavelyev, R. Nigmatullin, R. Gabbasova, D. Grishaev, A. Shtro, A. Galochkina, Y. Nikolaeva, T. Vinogradova, O. Manicheva, M. Dogonadze, O. Gnezdilov, E. Sokolovich, P. Yablonskiy, K. Balakin, Yu. Shtyrlin // Lett. Drug Des. Discov. – 2019. – V. 16, N. 2. – P. 1360-1369.
3. Shtyrlin, N.V. Isonicotinoyl hydrazones of pyridoxine derivatives: synthesis and antimycobacterial activity / N.V. Shtyrlin, **R.M. Khaziev**, V.G. Shtyrlin, E.M. Gilyazetdinov, M.N. Agafonoiva, K.S. Usachev, D.R. Islamov, A.E. Klimovitskii, T.I. Vinogradova, M.Z. Dogonadze, N.V. Zabolotnykh, E.G. Sokolovich, P.K. Yablonskiy, Yu.G. Shtyrlin // Med. Chem. Res. – 2021. – V. 30, Iss. 4. – P. 952-963.

Заявка на патент

4. Заявка на пат № 2021121081 РФ, С07D 213/67, С07D 213/02, А61Р 31/06. Противотуберкулезное средство на основе производного пиридоксина / Ю.Г. Штырлин, П.К. Яблонский, Н.В. Штырлин, Е.Г. Соколович, Т.И. Виноградова, Р.М. Хазиев, М.Н. Агафонова, В.Г. Штырлин, М.З. Догонадзе, Н.В. Заболотных; ФГАОУ ВО КФУ, ФГБУ СПб НИИФ. – дата регистрации. – 16.07.2021.

Тезисы докладов конференций

5. Dzyurkevich, M.S. Synthesis of new pyridoxine derivatives by the reactions of acetyl ester group with various nucleophiles / M.S. Dzyurkevich, A.A. Palenova, K.O. Filippova, **R.M. Khaziev**, N.V. Shtyrlin, R.S. Pavelyev, Yu.G. Shtyrlin // 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry. – Тез. докл. – Казань, 2017. – С. 19.
6. Хазиев, Р.М. Синтез и антимикобактериальная активность изоникотиноил гидразонов на основе витамина В₆ / **Р.М. Хазиев**, Н.В. Штырлин, М.Н. Агафонова, Т.И. Виноградова, М.З. Догонадзе, Е.Г. Соколович, Ю.Г. Штырлин // «Современные проблемы химии, технологии и фармации»: Материалы междунар. науч.- практ. конф. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2020. – С. 346-348.
7. **Хазиев, Р.М.** Синтез и биологические свойства производных витамина В₆, содержащих адамантановые фрагменты / **Р.М. Хазиев**, Н.В. Штырлин, Р.Р. Нигматуллин // XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2020”. – Тез. докл. – Москва, 2020.
8. Гилязетдинов, Э.М. Комплексообразование железа(III) с пиридоксिनными производными изоникотиноилгидразонов / Э.М. Гилязетдинов, М.А. Ахмед, **Р.М. Хазиев**, Н.В. Штырлин, М.С. Бухаров, Н.Ю. Серов, В.Г. Штырлин // XV Всероссийская молодежная научно-инновационная школа «Математика и математическое моделирование». – Тез. докл. м Саров, 2021. – С. 4-5.