

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого»
(ФГБОУ ВПО «ТГПУ им. Л.Н. Толстого»)

Кафедра химии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**Синтез, строение и свойства новых 3,5-динитро-1,4,5,6-
тетрагидропиридин-2-аминов**

Выполнена:

студенткой 5 курса

группы «850191»

очной формы обучения

специальности «Химия»

со специализацией «Химия

окружающей среды и

химическая экспертиза»

факультета естественных наук

Блохновой Юлией

Михайловной

Тула - 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Литературный обзор. Методы синтеза и свойства нитропиридинов	6
1.1. Синтез нитропиридинов	8
1.1.1 Получение нитропиридинов из алифатических соединений	8
1.1.2 Нитрование пиридина и его гомологов.....	9
1.1.3. Нитрование amino- и гидроксипроизводных пиридина.....	11
1.1.4. Особенности нитрования пиридин-1-оксидов.....	18
1.1.5. Окисление аминопиридинов.....	20
1.1.6. Реакции элиминирования в синтезе нитропиридинов.....	21
ГЛАВА 2. Синтез 3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-аминов.....	23
ГЛАВА 3. Исследование биологической активности и цитотоксичности синтезированных соединений	34
3.1. Компьютерная оценка спектра биологической активности синтезированных соединений.....	34
3.2. Оценка цитотоксичности синтезированных соединений	39
ГЛАВА 4. Экспериментальная часть.....	41
4.1. Синтез исходных соединений и подготовка растворителей.....	41
4.1.1. Синтез и очистка 2-гидрокси-3,5-динитропиридина (1).....	41
4.1.2. Синтез и очистка 2-хлор-3,5-динитропиридина (4).....	41
4.1.3. Синтез и очистка 3,5-динитропиридин-2-амина (5а).....	42
4.1.4. Синтез и очистка N-бутил-3,5-динитропиридин-2-амина (5б).....	42
4.1.5. Синтез N-(R)-3,5-динитропиридин-2-аминов (5в-д).....	42
4.1.6. Подготовка реагентов и растворителей.....	43
4.2. Синтез гидридных σ -аддуктов на основе N-(R)-3,5-динитропиридин-2- аминов.....	43
4.3. Общая методика синтеза 3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2- аминов, исходя из гидридных аддуктов 2-амино-3,5-динитропиридинов.....	44

4.4. Определение цитотоксичности соединений с помощью реагента CellTiter-Glo (Promega).....	47
4.5. Физико-химические методы исследований.....	48
ВЫВОДЫ.....	50
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	51

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В НАУЧНЫХ
И УЧЕБНЫХ ЦЕЛЯХ.**

ВВЕДЕНИЕ

Химия гетероциклических соединений привлекает внимание огромного числа исследователей. На долю гетероциклов приходится более 50% от общего объема публикаций по органической химии. Такое внимание обусловлено тем, что среди синтезированных гетероциклов найдены лекарственные препараты, обладающие нейролептическим и обезболивающим эффектами, пестициды, красители, поверхностно-активные вещества и т.д. Гетероциклические соединения широко распространены в природе.

Одна из причин широкого использования гетероциклических соединений — возможность тонко манипулировать их структурой для достижения необходимых модификаций свойств. Многие гетероциклы могут быть отнесены к одной из нескольких широких групп структур, которые обладают сходными свойствами, но имеют и значительные внутрigrупповые различия, в том числе вариации кислотности и основности, полярности, различную чувствительность к атаке электрофилом или нуклеофилом.

Известно, что многие производные пиридина обладают разносторонней биологической активностью. Так, пиридин является структурным фрагментом многих алкалоидов, например, никотина и анабазина, а также витаминов группы В.

Целью данной работы является разработка способов получения новых производных тетрагидропиридина, установление их структуры и свойств.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Разработка методов получения и синтез новых производных тетрагидропиридина на основе анионных аддуктов 3,5-динитропиридинов.
2. Установление структуры и свойств исходных, промежуточных и целевых продуктов современными физико-химическими методами.

3. Исследование спектра биологической активности и цитотоксичности синтезированных соединений с помощью системы PASS-online.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В НАУЧНЫХ
И УЧЕБНЫХ ЦЕЛЯХ.**

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР МЕТОДЫ СИНТЕЗА И СВОЙСТВА НИТРОПИРИДИНОВ

Пиридины - одни из самых распространенных гетероциклов, производные которых широко применяются в фармацевтике, агрохимии, а также в производстве новых материалов [1]. Пиридиновое и пиперидиновое кольца являются очень распространенными структурными элементами и находятся в многочисленных природных биологически активных веществах (рис.1.1). Так, пиридин- и пиперидин-содержащие алкалоиды представляют собой обширный класс природных соединений с уникальной структурой и широким спектром биологических свойств [2-4]. Многие из этих алкалоидов обладают активностью, связанной с лечением рака, неврологических расстройств и других заболеваний, и продолжают быть ценными объектами исследований, стимулирующими открытие новых лекарств [5-9].

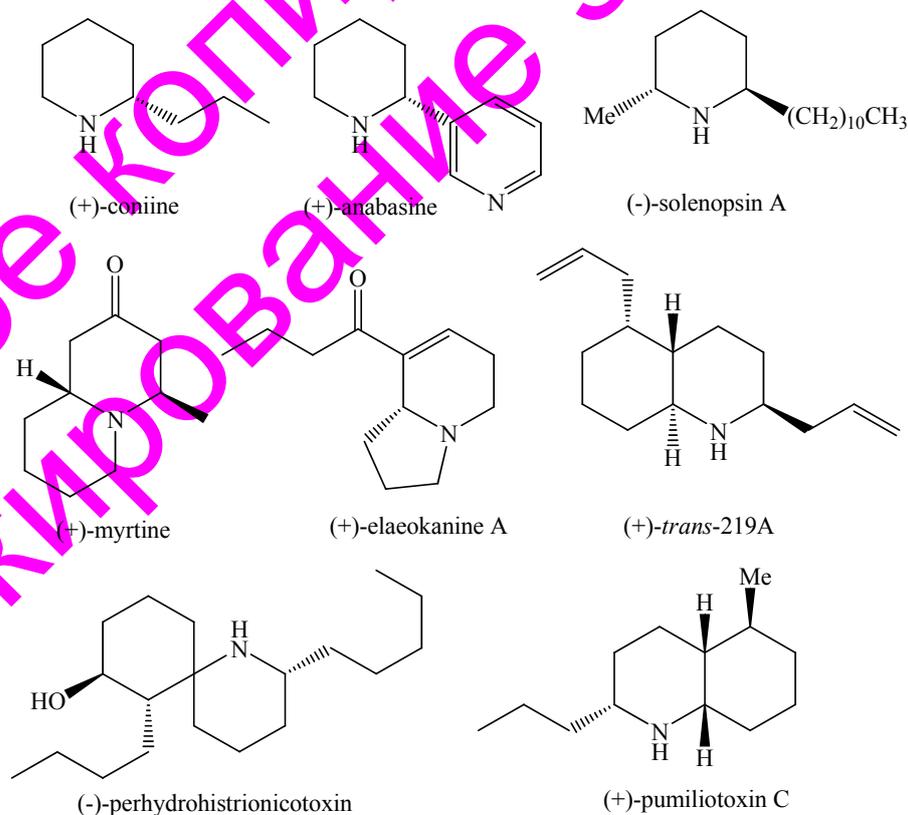


Рис.1.1. Пиперидин-содержащие природные вещества.

Также пиридины являются удобными прекурсорами в синтезе оптически активных дигидро- и тетрагидропиридинов, а также пиперидинов,

которые, в свою очередь, представляют интерес в качестве промежуточных соединений в синтезе алкалоидов [10, 11], NADH-моделей [12, 13] и важных биологически активных веществ [14-18]. Аналогично пиридинам, дигидропиридины и тетрагидропиридины являются важными билдинг-блоками в синтезе пиперидинов путем восстановления или нуклеофильного присоединения [19-21].

Многочисленные производные пиридинов выступают в качестве лекарств (рис 1.2), гербицидов и фунгицидов [22, 23]. Некоторые препараты, лидирующие в мировых продажах, такие как эзомепразол, пиоглитазон и эзопиклон, представляют собой лишь малую часть огромного разнообразия лекарственных средств, в структуре которых содержатся производные пиридина [24]. Значительное количество вновь утвержденных за последние годы лекарств являются природными соединениями пиридина или его синтетическими производными [25].

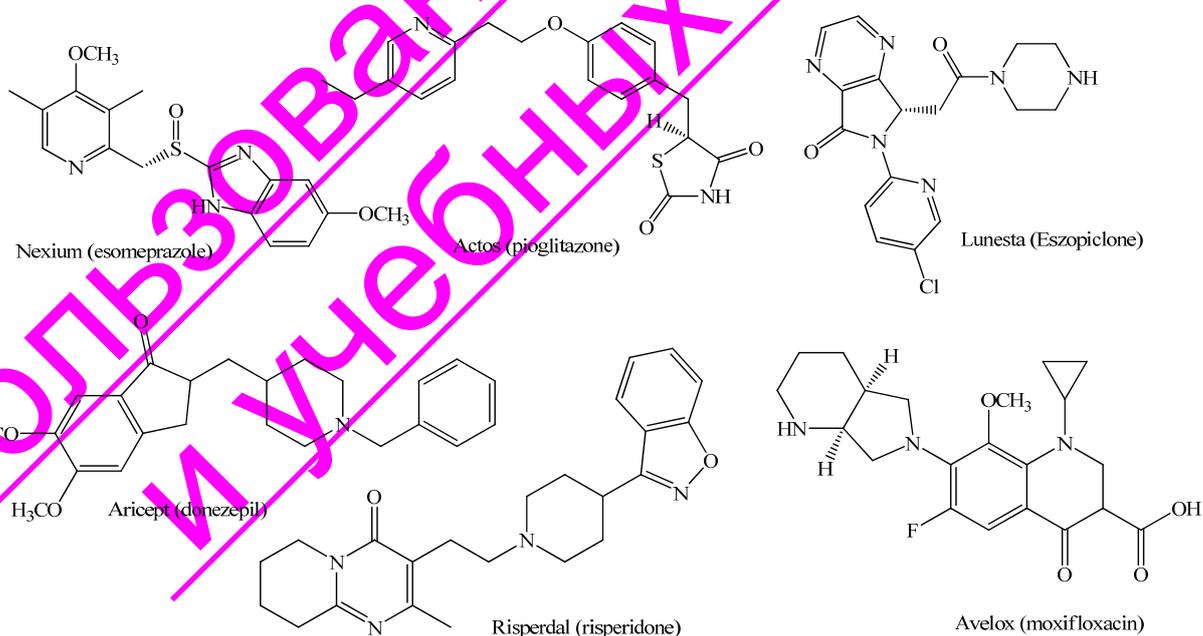


Рис. 1.2. Пиридин и пиперидин-содержащие лекарственные препараты

Высокоэффективные методы синтеза пиридинов и энантиомеров пиперидинов будут продолжать пользоваться высоким спросом. Стереоселективное получение функциональных производных пиперидинов с несколькими заместителями в определенных положениях все еще остается

существенной синтетической проблемой и, в связи с высокой значимостью этих структур, является актуальной задачей [15, 26].

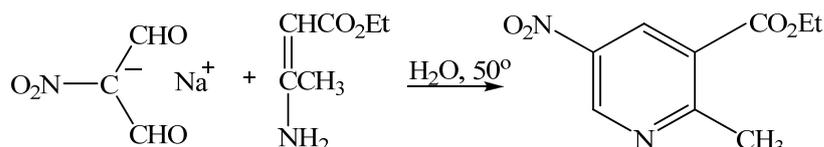
В настоящее время накоплен достаточно обширный фактический материал, посвященный химии производных пиридина, однако, нитропроизводные пиридина описаны гораздо менее подробно. В литературе встречаются публикации, охватывающие химию нитропиридинов, но они носят разрозненный характер. Таким образом, данный обзор обобщает и систематизирует результаты экспериментальных исследований нитропроизводных пиридина, начиная с первой половины XX в. и до настоящего времени.

1.1. Синтез нитропиридинов

1.1.1. Получение нитропиридинов из алифатических соединений

Первые работы, направленные на разработку методов получения производных нитропиридина из алифатических соединений были проведены в середине XX века [27]. Одной из первых реакций, предложенной Фанта П.Е., была конденсация натрийнитромалонового альдегида с этиловым эфиром β -аминокротоновой кислоты, которая протекает при обычных условиях и сопровождается образованием этил-2-метил-5-нитроникотината (схема 1.1). Каталитическое восстановление продукта конденсации приводит к amino- и гидроксиламино- производным. Цианоамидные соединения также взаимодействуют с нитроальдегидом [28].

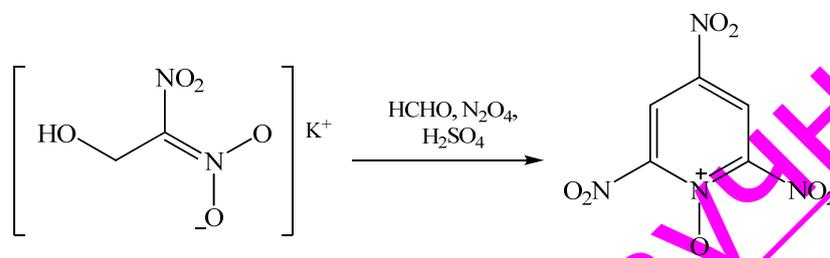
Схема 1.1



Гандерман и Алес [29] изучили ступенчатую реакцию 2,2-динитроэтилата калия с формальдегидом, оксидом азота (IV) и разбавленной серной кислотой. Анализируя спектральные данные, они пришли к выводу,

что продуктом реакции является 2,4,6-тринитропиридин-1-оксид (схема 1.2). Аналогично протекает реакция и при использовании нитроацетонитрила калия, при этом образуется 2,4,6-трицианопиридин-1-оксид.

Схема 1.2



1.1.2. Нитрование пиридина и его гомологов

Незамещенные пиридины устойчивы к нитрованию, которое осуществляется только в жестких условиях. Это объясняется образованием положительных ионов пиридиния в нитрующей смеси, что приводит к значительному снижению электронной плотности по всему кольцу, особенно в положениях 2 и 4.

Первым прямое нитрование пиридина осуществил Фридель [27, 30] в 1912 году. Он получил 3-нитропиридин с выходом 15 % под действием нитрата калия и дымящей серной кислоты при температуре 330°C. Кирпал и Рейтер [31] повторили нитрование, предложенное Фриделем, однако не смогли получить целевой продукт с выходом более, чем 1 %. Интересно отметить, что в ходе исследований им удалось выявить каталитическое влияние железа на этот процесс.

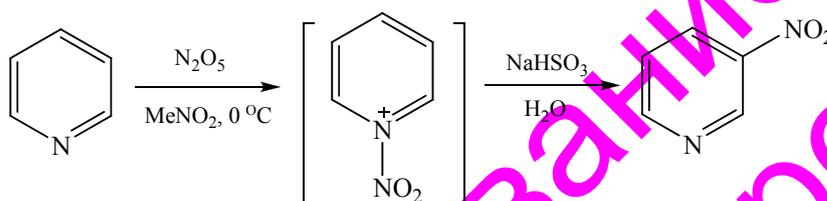
Ден Хертог и Оверхофф [32] не смогли повторить результаты последних исследований. Они пытались повторить нитрование при тех же условиях, но получили смесь, состоящую из 2- и 3-нитропиридинов, при этом доля 2-изомера увеличивалась при более высоких температурах.

Использование диоксида азота и хлорида алюминия в процессе нитрования, как известно, приводит к образованию соединений диоксида азота и пиридина [33]. При обработке пиридина диоксидами азота и углерода 3-нитропиридин образуется уже при температуре 115-120°C [34], что

указывает на более активное протекание данного процесса. Отмечено, что опасность взрыва наступает при более высоких температурах (300-330°C), либо при взаимодействии с жидким диоксидом азота при комнатной температуре.

Позже Бакк с сотрудниками успешно осуществили нитрование пиридина [35-38]. Наиболее эффективный метод получения 3-нитропиридина с выходом 77 % описан им в работе [38] (схема 1.3).

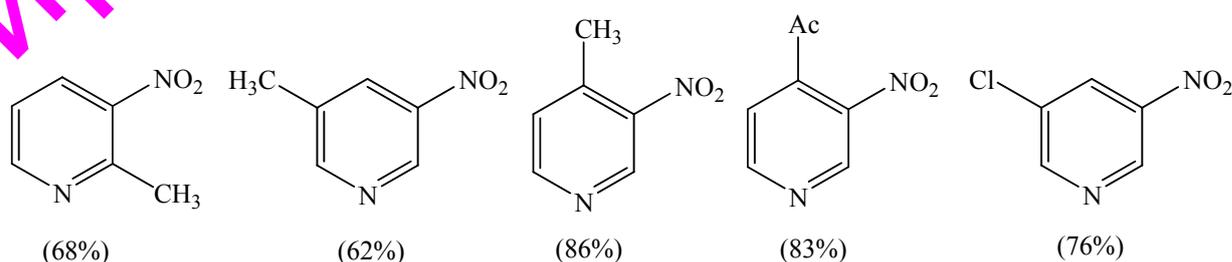
Схема 1.3



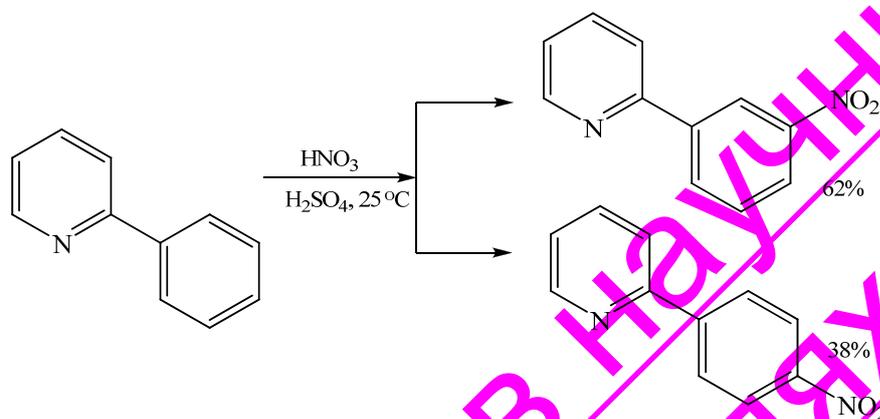
Сузуки с сотрудниками также исследовали нитрование пиридина в описанных выше условиях [39]. Однако добиться повышения выхода 3-нитропиридина в исследуемой реакции удалось только группе исследователей во главе с Катрицким, которые предложили использовать в качестве нитрующей смеси азотную кислоту и трифторуксусный ангидрид. Данный метод позволил получить 3-нитропиридин с выходом 83% [40].

Нитрование алкилпиридинов протекает легче по сравнению с незамещенным пиридином за счет положительного индукционного эффекта алкильных групп. Исходя изданных работ [41, 42] следует, что 2-пиколин нитруется с трудом и низким выходом, в то время как 2,6-лутидин начинает реагировать ниже $100\text{ }^\circ\text{C}$, а 2,4,6-коллидин нитруется еще легче. Катрицким с сотрудниками были получены с достаточно высокими выходами разнообразные метил-, ацил- и хлорпроизводные 3-нитропиридина при использовании HNO_3 /трифторуксусный ангидрид (TFAA) [40] (схема 1.4).

Схема 1.4



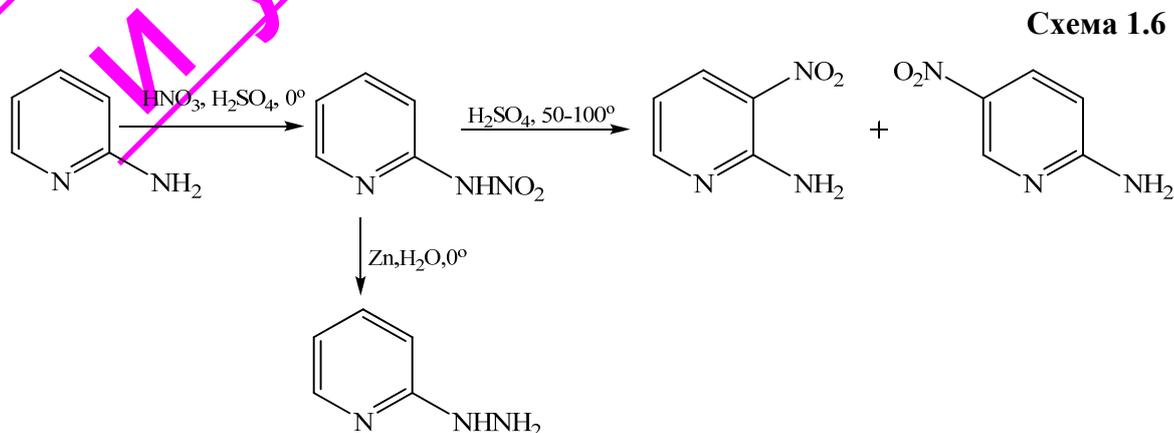
Нитрование 2- и 4-фенилпиридинов происходит исключительно в бензольное кольцо [43]. Так, при нитровании 2-фенилпиридина азотной кислотой в среде серной кислоты при 25°C образуется два изомерных нитропродукта [44] (схема 1.5).



1.1.3. Нитрование amino- и гидроксипроизводных пиридина

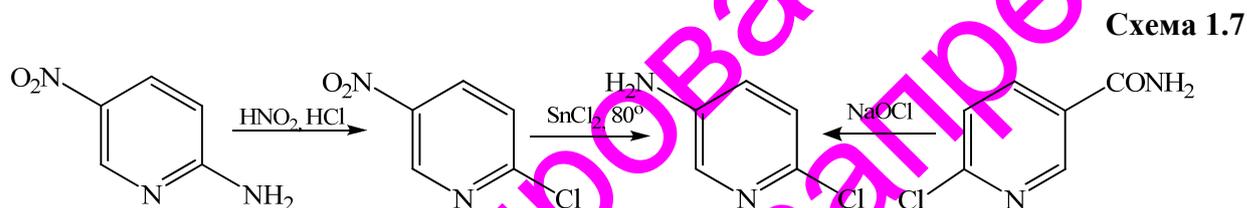
Аминопиридины очень легко взаимодействуют с нитрующими агентами. Продукты, полученные в результате этих реакций, являются наиболее ценными соединениями для синтеза большого количества разнообразных производных.

Нитрование 2-аминопиридина при низких температурах с легкостью приводит к образованию 2-нитроаминопиридина, при обработке которого концентрированной серной кислотой при температуре 50-100°C образуется смесь, состоящая из 2-амино-3-нитро- и 2-амино-5-нитропиридинов, последний из которых является преобладающим (схема 1.6) [45-49].

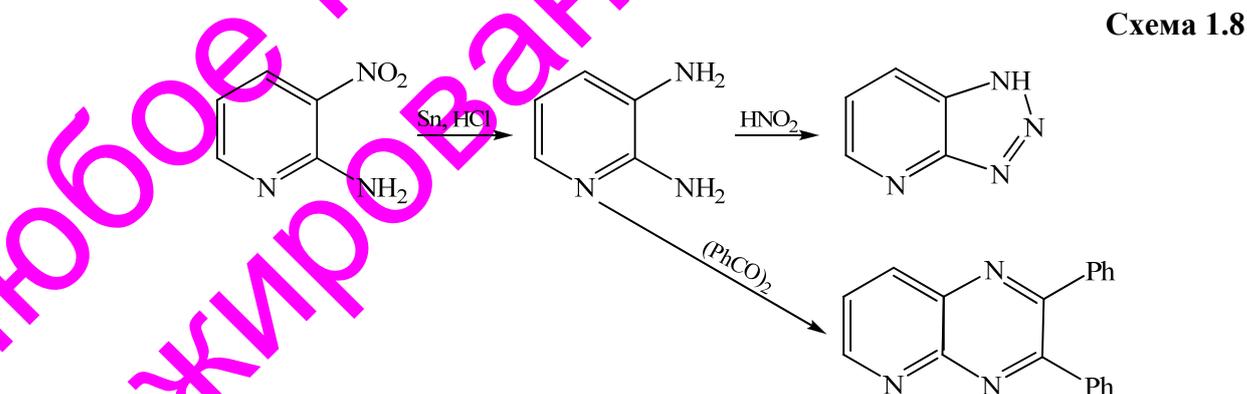


В работе [50] показано, что данная перегруппировка протекает только под действием H_2SO_4 . Нитрование при высоких температурах приводит напрямую к изомерам аминонитропиридина.

Чичибабин и Разоренов [47] получили нитроаминопиридин с последующим восстановлением его до 2-гидразинопиридина (схема 1.6). Кроме того, ими было установлено строение изомерных нитро-2-аминопиридинов химическим способом, заключающимся в следующем: 2-амино-5-нитропиридин был преобразован в 5-амино-2-хлорпиридин, который в свою очередь был получен встречным синтезом из известного 6-хлорникотинамида (схема 1.7).



Другой изомер был восстановлен до диамина, проявляющего характерные для *o*-диаминов свойства, в частности, при взаимодействии с азотистой кислотой и другими реагентами (схема 1.8) [51].

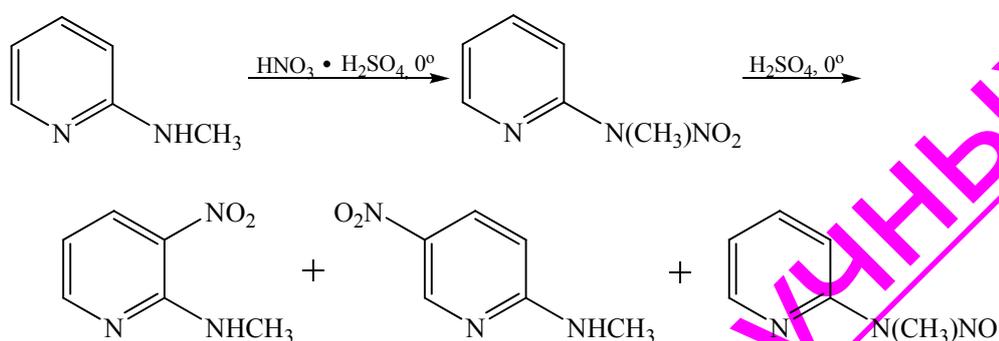


При нитровании диаминопиридинов образуются нитроаминопиридины, которые подвергаются изомеризации с образованием 2-амино-3,5-динитропиридина [47, 52, 53].

2-(*N*-метиламино)пиридин проходит аналогичную серию преобразований, однако в процессе изомеризации наблюдается также и

частичное восстановление до 2-(N-нитрозо-N-метиламино)пиридина (схема 1.9).

Схема 1.9



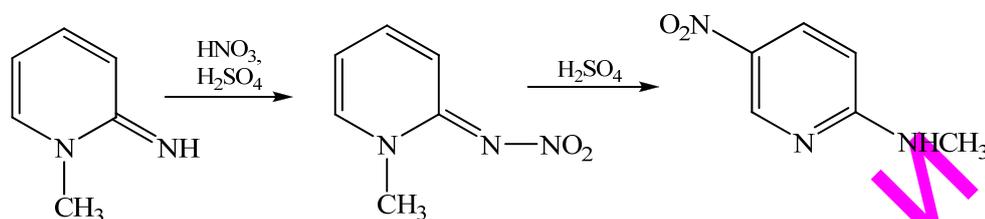
Нитрование N-метиламинонитропиридинов происходит через образование N-метилнитроаминонитросоединений, которые, в свою очередь, перегруппировываются с образованием N-метиламинодинитропиридина [53]. Нитрование N-алкиламинопиридинов в ряде случаев может осуществляться и без образования промежуточного N-алкилнитроаминориридина. Так, Чичибабин [54, 55] получил смесь 5- и 3-нитро-2-(N,N-диметиламино)пиридинов из 2-(N,N-диметиламино)пиридина. Очевидным является, что данная реакция протекает без образования промежуточного нитроамин. Последующее нитрование указанных выше изомеров также приводит к динитро-(N,N-диметиламино)пиридинам.

1,2-дигидро-2-имино-1-метилпиридин в мягких нитрующих условиях дает нитроимин. Первоначально, продуктом изомеризации считался 5-нитро-1,2-дигидро-2-имино-1-метилпиридин. Однако последующие исследования показали, что на заключительной стадии реакции происходит внутримолекулярная перегруппировка метильной группы, сопровождающаяся образованием 2-(N-метиламино)-5-нитропиридина (схема 1.10) [53, 56].

При нитровании 6-амино-5-этил-2-пиколина образуется смесь нитроамин и 3-нитросоединения [57], при этом, интересно отметить, что нитроамин не подвергается изомеризации. Аналогично 3-аминопиридин

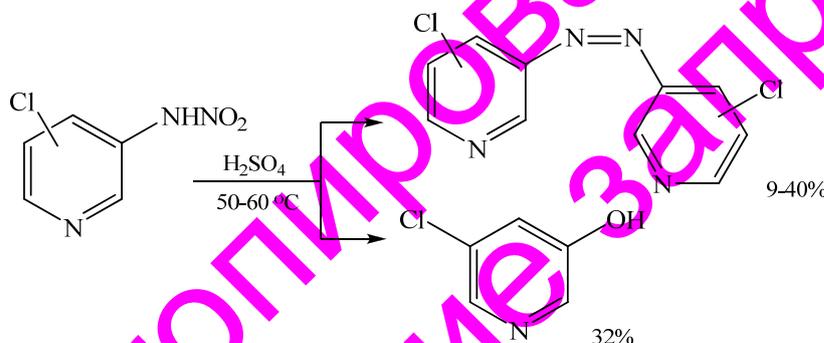
образует нитроамин, который также не изомеризуется, однако подвергается гидролизу с образованием 3-гидроксипиридина при обычных условиях [58].

Схема 1.10



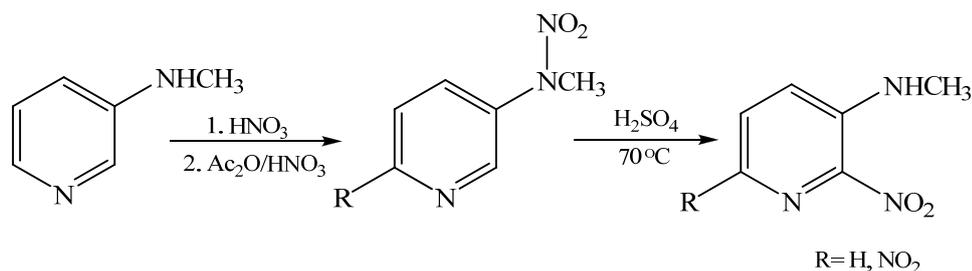
В результате попыток по перегруппировке 2- и 4-хлор-3-нитроаминопиридинов получены симметричные азопиридины, а в случае 5-изомера - образуется 5-хлор-3-оксипиридин [59] (схема 1.11).

Схема 1.11



При осуществлении низкотемпературного нитрования 3-(N-метиламино)пиридина образуется нитроамин, превращающийся в ходе перегруппировки в 3-(N-метиламино)-2-нитропиридин (схема 1.12). 4-Амино-3-нитропиридин получают перегруппировкой 4-нитроаминопиридина при обработке серной кислотой. При соответствующих условиях нитрования может быть получен 4-нитроамино-3-нитропиридин. Кроме того при изомеризации последнего может быть получен 4-амино-3,5-динитропиридин в более жестких условиях [60, 61].

Схема 1.12



В реакции нитрования 2,2'-дипиридиламина при температуре 20°C получают смесь моно- и полинитросоединений. Основным продуктом реакции при 0°C является 5-нитро-2,2'-дипиридиламин, в тоже время при 100°C с хорошим выходом образуются 3,3'- и 5,5'-динитро-2,2'-дипиридиламины [62]. При обработке серной кислотой нитрата 4,4'-дипиридиламина он переходит в 3-нитро-4,4'-дипиридиламин, а нитрование свободного амина с дымящей азотной и серной кислотами приводит к 3,3'-динитро-4,4'-дипиридиламину [63].

В работе [64] приводятся данные об образовании тетранитропроизводного, полученного при обработке 2,2'-диамино-5,5'-бипиридина холодной нитрующей смесью. К сожалению, сведения по исследованию структуры синтезированного соединения в работе отсутствуют.

При наличии в молекуле пиридина гидрокси-группы, обладающей положительным мезомерным эффектом, процесс нитрования значительно облегчается. Так, нитрование 2-гидроксипиридина происходит легко с образованием смеси 3- и 5-нитро-2-гидроксипиридинов [65] (схема 1.13).

Схема 1.13



При действии избытка нитрующей смеси на 2-гидроксипиридин Чичибабин и Шапиро получили вещество с температурой плавления 286°C, которое было описано как 3,5-динитро-2-пиридинол. Дальнейшие исследования данного процесса, проведенные Берри, Невболдом и Спрингом [66] показали, что в данной реакции может быть получена смесь 2-гидрокси-3-нитропиридина и 2-гидрокси-3,5-динитропиридина в виде натриевой соли. Однако Такахаши и Ямамото [67] удалось воспроизвести эксперимент, проведенный Чичибабиным и Шапиро, и получить вещество с температурой

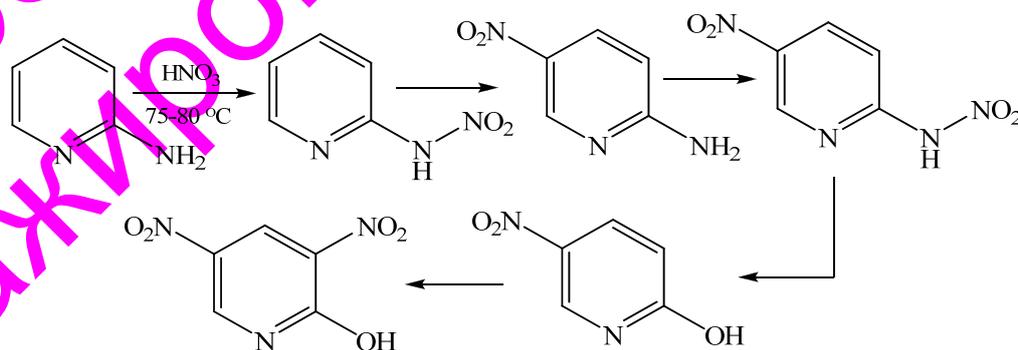
плавления 289°C. При дальнейшем нитровании смеси 2-гидрокси-3-нитропиридина и 2-гидрокси-3,5-динитропиридина образуется динитросоединение с температурой плавления 175°C. Плэжек [68] для подтверждения данных работы Берри, Невболда и Спринга получил динитро-2-пиридинол с температурой плавления 176°C и превратил его в известный 3,5-диаминопиридин.

В качестве препаративного метода получения 2-гидрокси-3,5-динитропиридина Башкиром Э. А. предложена реакция нитрования 2-гидроксипиридина дымящей азотной кислотой в 27%-ом олеуме при 80-85 °С, при этом выход продукта составил 83% [69].

Позже Фаляхов И.Ф. с сотрудниками разработал способ получения 2-гидрокси-3,5-динитропиридина из доступного 2-аминопиридина. Реакция протекает под действием концентрированной азотной кислоты при 75-85 °С, в течение 3-х часов с выходом около 80% (схема 1.14) [70].

3-Гидроксипиридин, в отличие от 2-гидроксиизомера, очень чувствителен к нитрующим агентам, а при температуре выше 50°C пиридиновое кольцо разрушается. Из 3-гидроксипиридина был получен мононитропродукт (3-гидрокси-2-нитропиридин) с выходом 50% при контролируемых условиях [71-73].

Схема 1.14

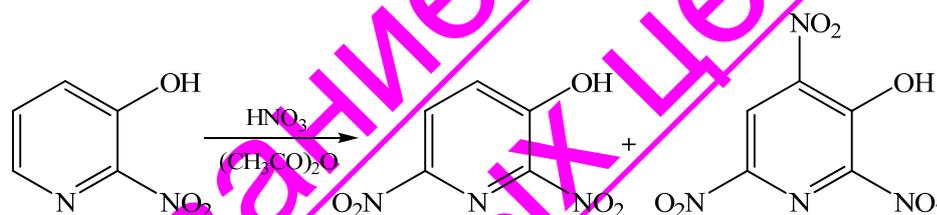


В свою очередь 3-гидрокси-2-нитропиридин при взаимодействии с дымящей азотной кислотой и уксусным ангидридом дает 3-гидрокси-2,6-динитропиридин с невысоким выходом. В этой реакции в качестве побочного продукта образуется 2,4,6-тринитро-3-пиридинол [74]. Ведель и Мурманн

[75] при нитровании 3-ацетоксипиридина получили 2-нитропиридинол-3, представляющий собой продукт гидролиза.

Позже Фаляхов И. Ф. с сотрудниками также получили 3-гидрокси-2-нитропиридин нитрованием 3-гидроксипиридина, при этом было установлено, что реакция протекает легче, чем с 2-гидроксипроизводным [76]. При обработке полученного моонитропроизводного концентрированной азотной кислотой в уксусном ангидриде при температуре 30-50 °С образуется смесь 3-гидрокси-2,6-ди- и 3-гидрокси-2,4,6-тринитропиридина (схема 1.15). Было показано, что соотношение продуктов зависит от условий проведения реакции. Так, выход 3-гидрокси-2,4,6-тринитропиридина в зависимости от условий синтеза может составлять от 40 до 70% [76].

Схема 1.15

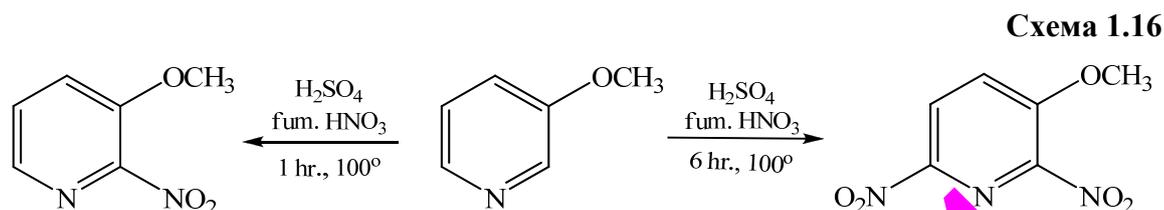


Нитрование 4-гидроксипиридина приводит к 4-гидрокси-3-нитропиридину и 4-гидрокси-3,5-динитропиридину [77, 78]. Аналогичное 3-нитрование происходит с 2,4- и 2,6-пиридиндиолами [78-84].

2-Метоксипиридин был преобразован в 5-нитросоединение при температуре 100°С с довольно высоким выходом [85]. Изомерный же 1-метил-2-(1*H*)-пиридон не приводит к 1-метил-5-нитро-2(1*H*)-пиридону, из чего следует, что в ходе этого процесса не происходит миграции метильной группы, как в случае с пиридонимином.

3-Алкоксипиридины нитруются до моонитропроизводных при комнатной температуре. Кенигс [86] при нитровании 3-этоксипиридина получил 3-этоксипиридин-6-нитро. Однако ДенХертог вскоре [87] доказал, что это вещество не 3-этоксипиридин-6-нитро, а 3-этоксипиридин-2-нитро. Бернштейну [88] при нитровании 3-метоксипиридина в зависимости от

продолжительности проведения синтеза удалось получить 3-метокси-2-нитропиридин и 3-метокси-2,6-динитропиридин (схема 1.16).



При нитровании 2,3'-дипиридилового эфира образуется исключительно 5-нитросоединение [89]. Нитрование 3,5-диалкоксипиридина протекает легко, сопровождается образованием преимущественно динитропроизводных с достаточно высоким выходом. Так, Кенигс [86] при нитровании 3,5-диэтоксипиридина в мягких условиях получил 3,5-диэтокси-2,6-динитропиридин с выходом 60%. Интересно отметить, что Ден Хертогу [90] удалось в аналогичных условиях выделить мононитросоединение.

Среди галогенпиридинов только 3-изомеры подвергаются нитрованию с образованием 3-галоген-5-нитропиридинов [91]. Де Селмс повторил нитрование 2-метил- и 2-хлор-3-пиридинола. При этом ввод нитрогруппы был осуществлен в 4- и 6- положения. Было подтверждено, что при электрофильном нитровании 3-гидроксипиридина, получается 2-нитро-3-пиридинол и 2,6-динитро-3-пиридинол [92]. Это, пожалуй, единичный пример образования 4-нитроизомера, за исключением нитрования пиридин-1-оксидов.

1.1.4. Особенности нитрования пиридин-1-оксидов

Работы Очаи в Японии и Ден Хертога в Европе показали интересное поведение пиридин-1-оксида в реакции нитрования. В отличие от пиридина, оксиды легко замещаются и с хорошим выходом преобразуются в 4-нитропиридин-1-оксид. Хотя замещение происходит преимущественно в положение 4, 2-нитропродукт при этом также образуется с одновременным дезоксигенированием [93]. Реакция легко протекает также и гомологами пиридин-оксида, но не идет в том случае, если в четырех положениях

находятся метильные заместители. Нитрование 4-оксипиридин-1-оксида сопровождается образованием 3-нитро- и 3,5-динитропроизводных [94, 95].

Интересные результаты были получены в работе [96], авторы которой показали, что при нитровании 2-(N,N-диметиламино)пиридин-1-оксида в мягких условиях образуется только 2-(N,N-диметиламино)-5-нитропиридин-1-оксид, даже следовых количеств 4-нитроизомера в реакционной смеси обнаружено не было.

3,5-Диэтоксипиридин-1-оксид легко вступает в реакции замещения и при нитровании в мягких условиях дает соответствующее 2-нитропроизводное. При более жестких условиях продукт реакции представляет собой 3,5-диэтокси-2,6-динитропиридин. Нитрование в положение 4 осуществляется только лишь при наличии одного алкоксизаместителя [97, 98].

Процесс дезоксигенирования легко осуществляется под действием различных агентов, например, таких как трихлорид фосфора, трихлорид серы, тионилхлорид и ацетилхлорид. Так, при получении 4-нитропиридина процесс нитрования осуществлялся в присутствии треххлористого фосфора в хлороформе. При этом в качестве побочных продуктов были обнаружены 4-хлорпиридин и 1-(4-пиридил)-4(1H)-пиридон [99].

Кронке и Шеферг [100] использовали для дезоксигенирования 4-нитропиридин-1-оксида нитрозилсерную кислоту, при этом выход 4-нитропиридина составил 90%, в то время как при использовании традиционного агента – $\text{PCl}_3 / \text{CHCl}_3$ выход не превышает 70%.

Кроме того Кронке и Шеферг наблюдали и одновременный процесс нитрования и дезоксигенирования. Так, при обработке пиридин-1-оксида концентрированной серной кислотой и дымящей азотной кислотой при температуре от 130° до 165°C образуется 4-нитропиридин с 71%-ным выходом. Дополнительной иллюстрацией возможности одновременного протекания процессов нитрования и дезоксигенирования является получение 4-нитро-3-пиколина с выходом 81% из 3-пиколин-1-оксида, 3-бром-4-

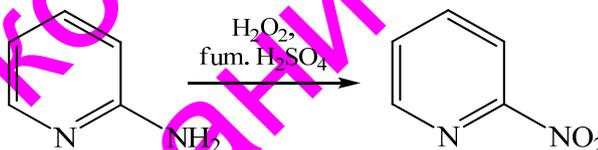
нитропиридина с выходом 75% из 3-бромпиридин-1-оксида при обработке последнего оксидом азота и серной кислотой при температуре от 150° до 200°С.

Однако Талик Т. и Талик З. показали, что N-оксидная функция сохраняется при проведении нитрования в более мягких условиях. Так, ими были получены 3-хлор-4-нитропиридин-1-оксид (84.5%) и 3-иод-4-нитропиридин-1-оксид (56.4%) при проведении нитрования под действием нитрующей смеси на кипящей водяной бане [101].

1.1.5. Окисление аминопиридинов

Нитропиридины могут быть получены с хорошим выходом окислением аминопиридинов. Так, авторами работ [102, 81] 2-нитропиридин и его гомологи были получены при обработке аминосоединения пероксидом водорода и серной кислотой, а также другими подобными окислителями (схема 1.17).

Схема 1.17



Вон Шик, Бинц и Шульц в работе [103] показали возможность получения 3-нитропиридина из аминосоединения. Вили и Хартман [81] этим же способом получили только 3,3'-азоксидипиридин. Окисление 3-пиридиндиазониумсульфата дает 3-нитросоединение с очень низким выходом [103].

Путем окисления 4-аминопиридина был получен 4-нитропиридин с высоким выходом [104], но более легко его можно получить из 4-нитропиридин-1-оксида. 4-Аминопиколин был окислен до 4-нитропиколина [105, 106].

В работах [107, 108] описан синтез 4-нитротетрафторпиридина путем окисления соответствующих аминокислот надсерной кислотой. 4-

нитротетрафторпиридин представляет собой жидкость с температурой кипения (от 152 до 154°), которая заметно ниже, чем у 2-нитропиридина (256°) и 3-нитропиридина (216°).

При окислении перокситрифторацетиловой кислотой 2-аминопиридина и 2-амино-5-бромпиридина с низким выходом образуется 2-нитропиридин-1-оксид и 5-бром-2-нитропиридин-1-оксид [109].

1.1.6. Реакции элиминирования в синтезе нитропиридинов

В данном разделе литературного обзора приведены результаты нескольких работ, в которых нитропиридины были получены путем удаления различных заместителей из структуры производных нитропиридинов. Так, 3-нитропиридин был получен дезаминированием 2-гидразино-5-нитропиридина, исходным соединением для получения которого был использован 2-хлор-5-нитропиридин (схема 1.18) [110, 111].

Схема 1.18

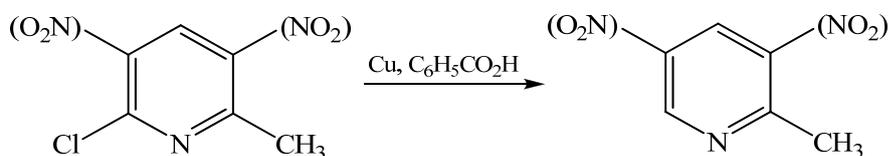


Аналогичная обработка 2-гидразино-3,5-динитропиридина дает 3,5-динитропиридин [68].

Баумгартен, Су и Кригер [112] при получении ряда нитропиколинов с помощью различных методов провели удаление галогена и гидразиногруппы.

Метод Смита (схема 1.19), суть которого в замещении галоида водородом в присутствии медно-бензойных кислот при температуре 160-180°С дал нитропиридины с выходом в диапазоне 27-80% [112, 113].

Схема 1.19



Метод Блатта-Тристама, связанный с обработкой исходного соединения йодидом натрия и муравьиной кислотой при 100°C, не оказался эффективным. Успешным было получение 5-нитро-2-пиколина из 6-хлор-2-пиколина с выходом 25% [112].

Алкил-5-пиридинмалоновый эфир был преобразован в 2-алкил-5-нитропиридин путем его обработки серной кислотой при температуре 110°C [114].

Любое копирование и
тиражирование запрещено

ГЛАВА 2. СИНТЕЗ 3,5- ДИНИТРО-1,4,5,6- ТЕТРАГИДРОПИРИДИН-2- АМИНОВ

Одним из перспективных классов гетероциклических соединений являются тетрагидропиридины. Это обусловлено тем, что последние входят в качестве структурного фрагмента в состав многих биологически активных соединений, обладающих антимикробными, антиоксидантными [115], противовоспалительными [116], обезболивающими [117] свойствами. Поэтому расширение круга данных соединений является актуальной задачей.

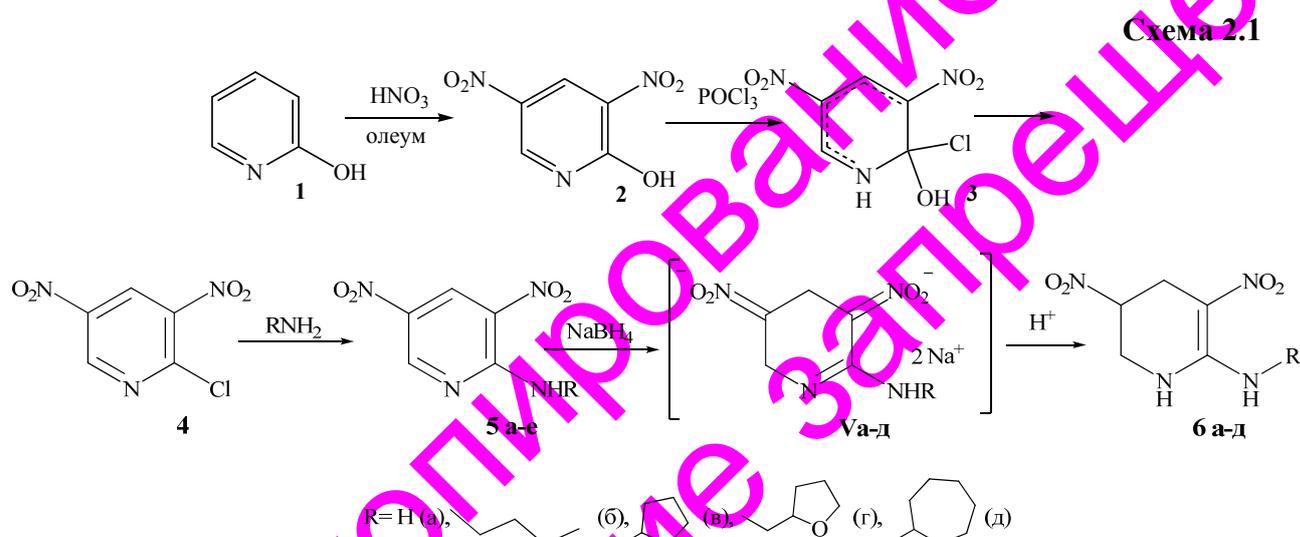
В настоящее время существуют различные подходы к синтезу тетрагидропиперидинов: из пиперидина и его производных [118], конденсацией первичных аминов [119], из нитрилов [120], из азидов [121] и др.

Нами предложена методика синтеза производных тетрагидропиридинов действием NaBH_4 на соответствующие 3,5-динитропиридины с последующей обработкой разбавленной ортофосфорной кислотой.

В качестве объекта исследования нами был выбран 2-гидрокси-3,5-динитропиридин **2**, который был получен нитрованием товарного 2-гидроксипиридина **1** дымящей азотной кислотой в олеуме по методике [69]. Затем по литературной методике [69] был синтезирован 2-хлор-3,5-динитропиридин **4** действием на 2-гидрокси-3,5-динитропиридин хлорокисью фосфора и диметилформамидом.

Для увеличения структурного разнообразия целевых продуктов были получены исходные N-(R)-3,5-динитропиридин-2-амины **5a-d** взаимодействием 2-хлор-3,5-динитропиридина **4** с аммиаком и различными первичными аминами в изопропанол в присутствии карбоната калия. Реакцию проводили в абсолютном спирте для предупреждения гидролиза 2-хлор-3,5-динитропиридина.

Природа нуклеофила оказывает влияние на выход аминопроизводных **5**. Так, использование аммиака и бутиламина позволяет получать более высокие выходы целевых соединений (97 и 90% соответственно). Циклоалифатические амины реагируют несколько медленнее, вероятно, вследствие стерических затруднений, и выход соединений **5 в-д** составил 82-85%.



На следующей стадии при действии раствора NaBH_4 на растворы 2-R-3,5-динитропиридинов **5а-д** в смеси ДМФА-этанол происходило восстановления связей пиридинового кольца с образованием двухзарядных промежуточных гидридных σ -комплексов **V**. Затем реакционную смесь подкисляли разбавленной ортофосфорной кислотой до pH 4, в результате чего целевые продукты синтеза - N-(R)-3,5-динитро-1,2,3,4-тетрагидропиридин-2-амины **6а-д** выпадали из реакционного раствора в виде кристаллических осадков. Выход продуктов составил 77-85%.

Структура полученных соединений **6а-д** была доказана методами ЯМР и ИК спектроскопии. В ИК спектрах анализируемых веществ наблюдаются интенсивные полосы антисимметричных и симметричных колебаний нитрогрупп при 1551-1568 и 1322-1355 cm^{-1} соответственно. Колебания связи $\text{C}=\text{C}$ фиксируются по поглощению при 1615-1637 cm^{-1} .

В спектре ЯМР ^1H N-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина **6d** в ДМСО- d_6 (рис. 2.1) в наиболее слабом поле при δ 11.05 м.д. фиксируется дублетный сигнал протона NH аминного заместителя. Далее наблюдаются широкий сигнал протона NH пиридинового кольца при δ 7.72 м.д. и синглетный сигнал протона H^5 (δ 5.20 м.д.), связанный с атомом углерода нитрогруппы. Дублетные линии в сильном поле при δ 3.83 м.д. и 3.61 м.д. следует отнести к экваториальным и аксиальным протонам H^6 (2J 14.7 Гц), а дублетные сигналы при δ 3.43 м.д. и 2.98 м.д. – к протонам H^4 (2J 17.6 Гц).

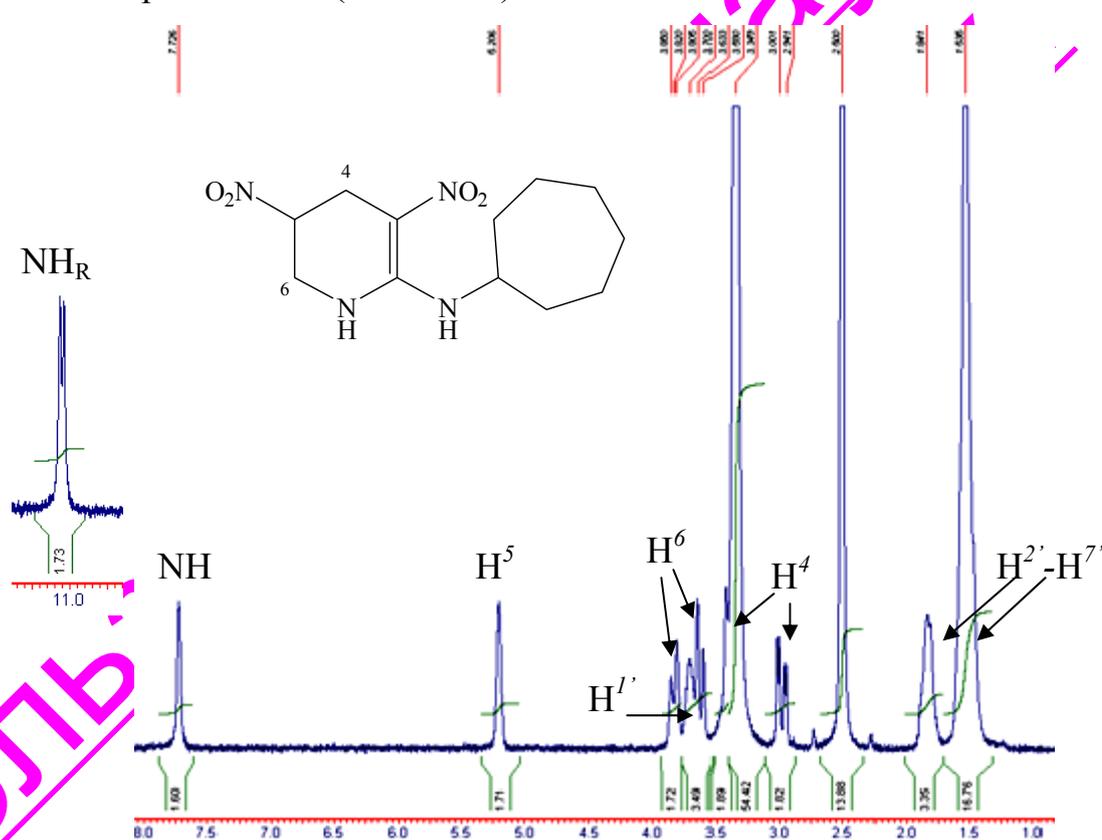


Рис. 2.1. Спектр ^1H ЯМР (300.13 МГц, в ДМСО- d_6) N-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина (**6d**)

Справедливость отнесения сигналов в спектрах ЯМР подтверждается методами двумерной гомо- (*COSY*) и гетероядерной (*HMBC*, *HSQC*) корреляционной спектроскопии (табл. 2.2).

Химические сдвиги в спектре ЯМР ^{13}C (рис. 2.2) четвертичных атомов углерода C^2 и C^3 (152.5 и 101.9 м.д. соответственно) однозначно определяются по отсутствию корреляционных пиков в спектре *HSQC* (рис.

2.3). Различить эти сигналы помогает наличие констант ${}^3J_{\text{H}^a, \text{e}/\text{C}^2}$, H^5/C^3 , которые обнаруживают себя через соответствующие корреляционные пики в спектре *HMBC* (рис. 2.4). Атом углерода C^5 ($\delta_{\text{C}} 76.7$ м.д.) легко определить, так как он имеет один кросс-пик в *HSQC* спектре с соответствующим протоном. Правильность отнесения подтверждают корреляционные пики в спектре *HMBC* NH/C^5 , H^a/C^5 , H^b/C^5 . Также по двумерному спектру *HSQC* могут быть определены связанные с протонами тетрагидропиридинового цикла прямыми константами J_{CH} сигналы атомов C^4 ($\delta_{\text{C}} 27.2$ м.д.) и C^6 ($\delta_{\text{C}} 42.2$ м.д.). Различить эти сигналы можно по кросс-пикам $\text{H}^b, \text{e}/\text{NH}$ в *HMBC* спектре.

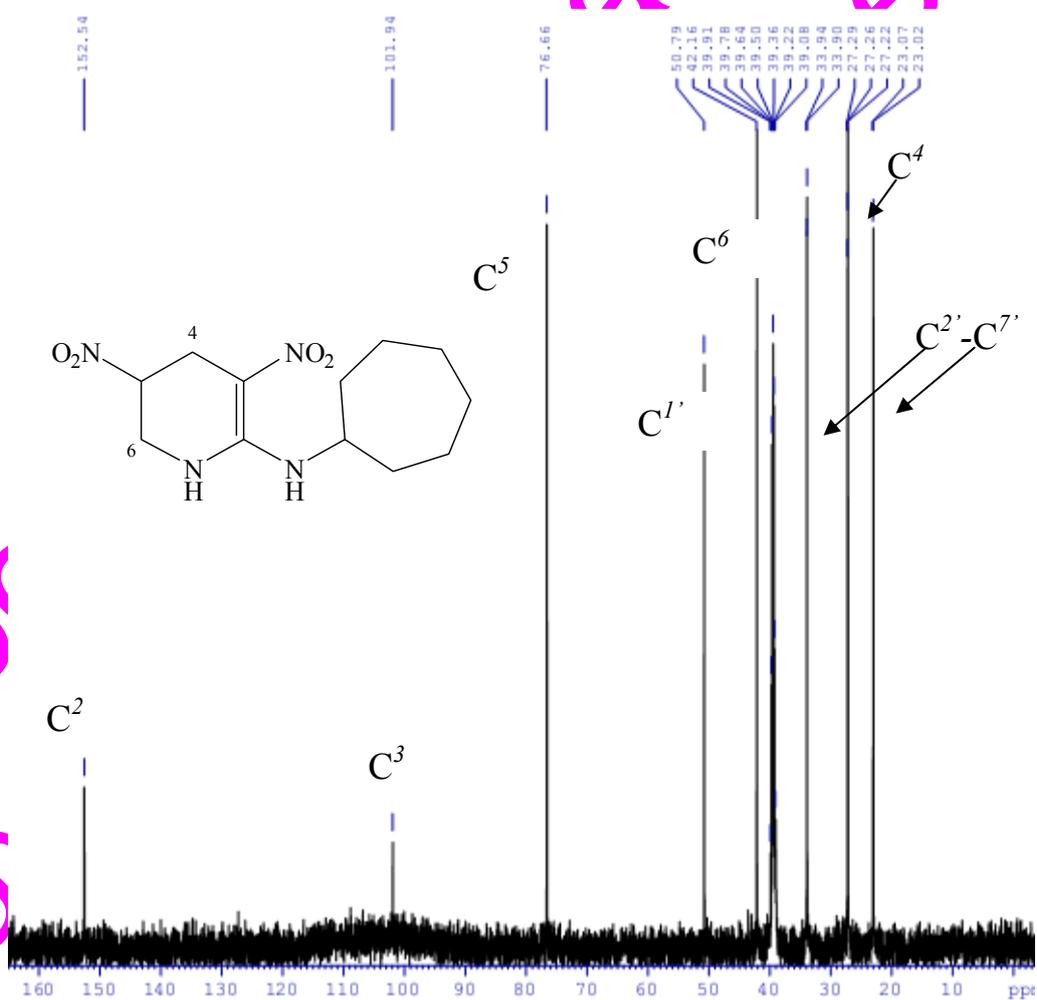


Рис. 2.2. Спектр ${}^1\text{H}$ ЯМР (300.13 МГц, в $\text{DMSO-}d_6$) *N*-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина (**6d**)

В *COSY*-спектре исследуемого соединения (рис. 2.5) наиболее интенсивными являются кросс-пики, соответствующие геминальным

(H^4_a/H^4_e , H^6_a/H^6_e), вицинальным ($H^4_a, e/H^5$, $H^6_a, e/H^5$, $H^6_a, e/NH$) и аллильной (H^4_e/H^6_e) КССВ. Дальняя константа 4J обусловлена расположением связей в одной плоскости (W -взаимодействие). Дублетный сигнал аксиального протона H^4 дополнительно расщеплен дублет дублетов от взаимодействия с протоном H^5 с константой 3J 5.4 Гц.

Значение данной константы позволяет различить протоны H^4_a и H^4_e . Нами были вычислены константы 3J H^4_a/H^5 и H^4_e/H^5 по уравнению Карплуса-Ботнера-Бая (1) [122].

$${}^3J = 7 - \cos\varphi + 5 \cos 2\varphi \quad (1)$$

Значения для двугранных углов φ между протонами H^4_a/H^5 и H^4_e/H^5 получены в результате расчета наиболее устойчивой конформации анализируемого соединения методом РМЗ (табл. 2.1).

Представленные в таблице данные, свидетельствуют в пользу вицинального взаимодействия H^4_a/H^5 , так как наблюдаемая экспериментальная величина этой вицинальной константы 3J качественно близка к теоретическому значению.

Таблица 2.1

Значения вицинальной константы взаимодействия протонов $H^4_a, e/H^5$ в *N*-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амине (6д)

Взаимодействия протонов	Диэдрический угол, град. (РМЗ)	3J (теоретическое)	3J (экспериментальное)
H^4_e/H^5	67.55	3.08	5.4
H^4_a/H^5	-46.83	6.00	

Таблица 2.2

Корреляционные пики в HSQC, HMBC и COSY спектрах *N*-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амин (6д)

№ атома	δ_N , м.д.	δ_C , м.д.	HSQC	HMBC	COSY
NH	7.72 ш.с	-	-	-	NH/H^4_e NH/H^6_e
2	-	152.5	-	H^4_a/C^2 , $H^6_a, e/C^2$	-
3	-	101.9	-	NH/C^3 , H^4_a/C^3 , H^5/C^3 , H^6_a/C^3	-

4	3.41 д, 2.98 д.д	27.2	$H^{a,e}/C^4$	$H^5/C^4,$ H^6_a/C^4	$H^4_a/H^4_{e_2},$ $H^4_{a,e}/H^5,$ H^4_e/H^6_e
5	5.20 с	76.7	H^5/C^5	$NH/C^5,$ $H^4_a/C^5,$ H^6_a/C^5	$H^5/H^4_{a,e},$ $H^5/H^6_{a,e}$
6	3.83 д, 3.61 д	42.2	$H^6_{a,e}/C^6$	$H^4_{a,e}/C^6$	$H^6_a/H^6_e,$ $H^6_e/H^4_{e_2},$ $H^6_{a,e}/H^5,$ $H^6_{a,e}/NH$

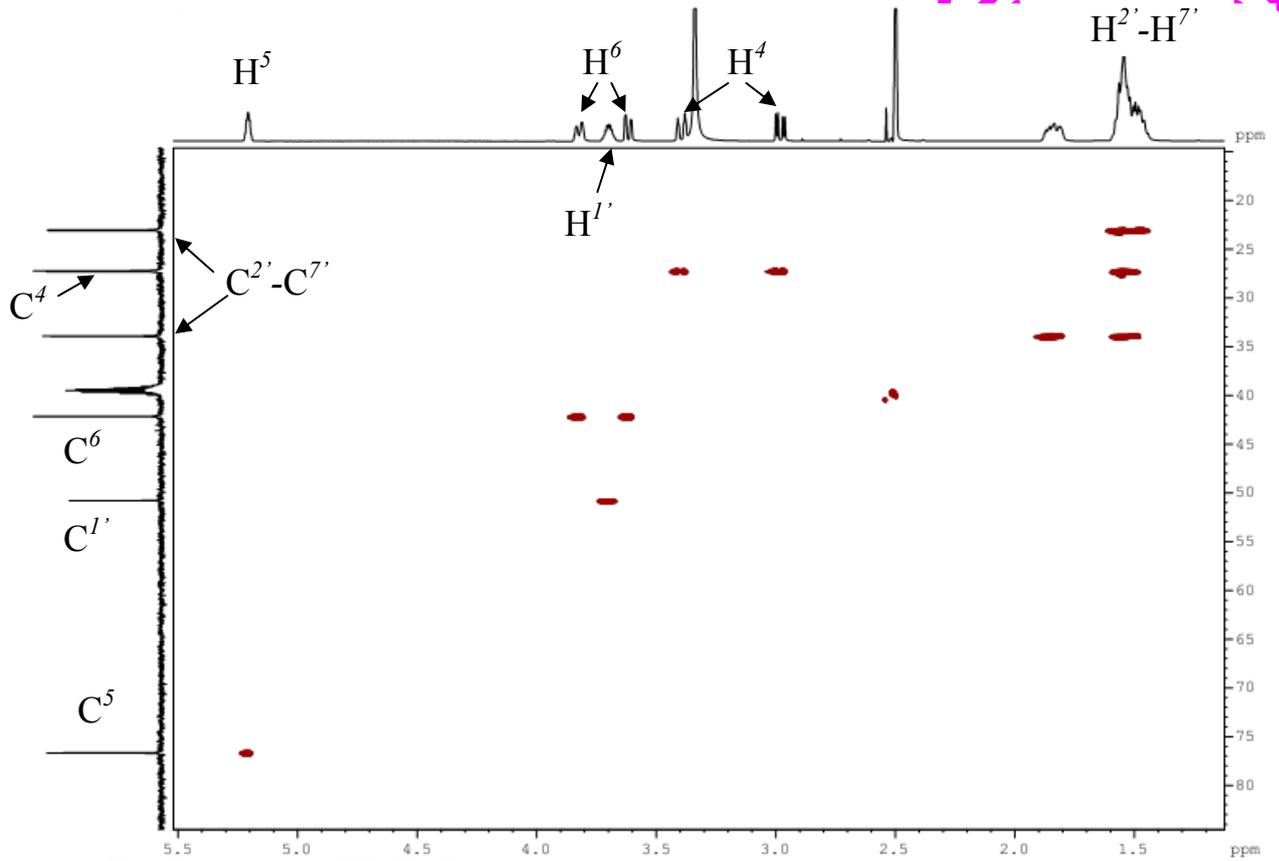


Рис. 2.3. Двумерный 1H - ^{13}C корреляционный спектр ЯМР (600.13 МГц, в ДМСО- d_6) (HSQC) *N*-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина (**6d**)

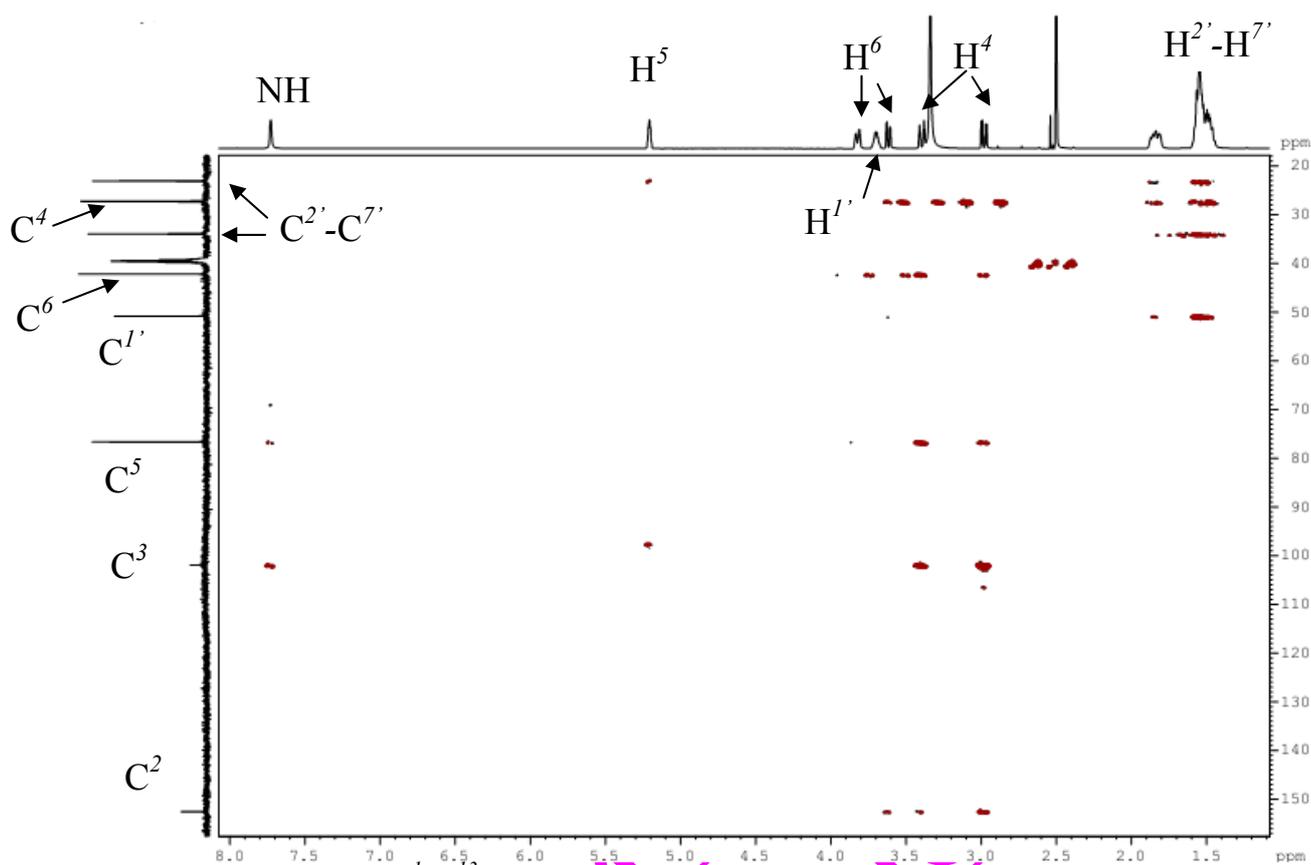


Рис. 2.4. Двумерный ^1H - ^{13}C корреляционный спектр ЯМР (600.13 МГц, в ДМСО- d_6) (HMBC) *N*-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина (**6d**)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
И УЧЕБНЫХ ЦЕЛЕЙ

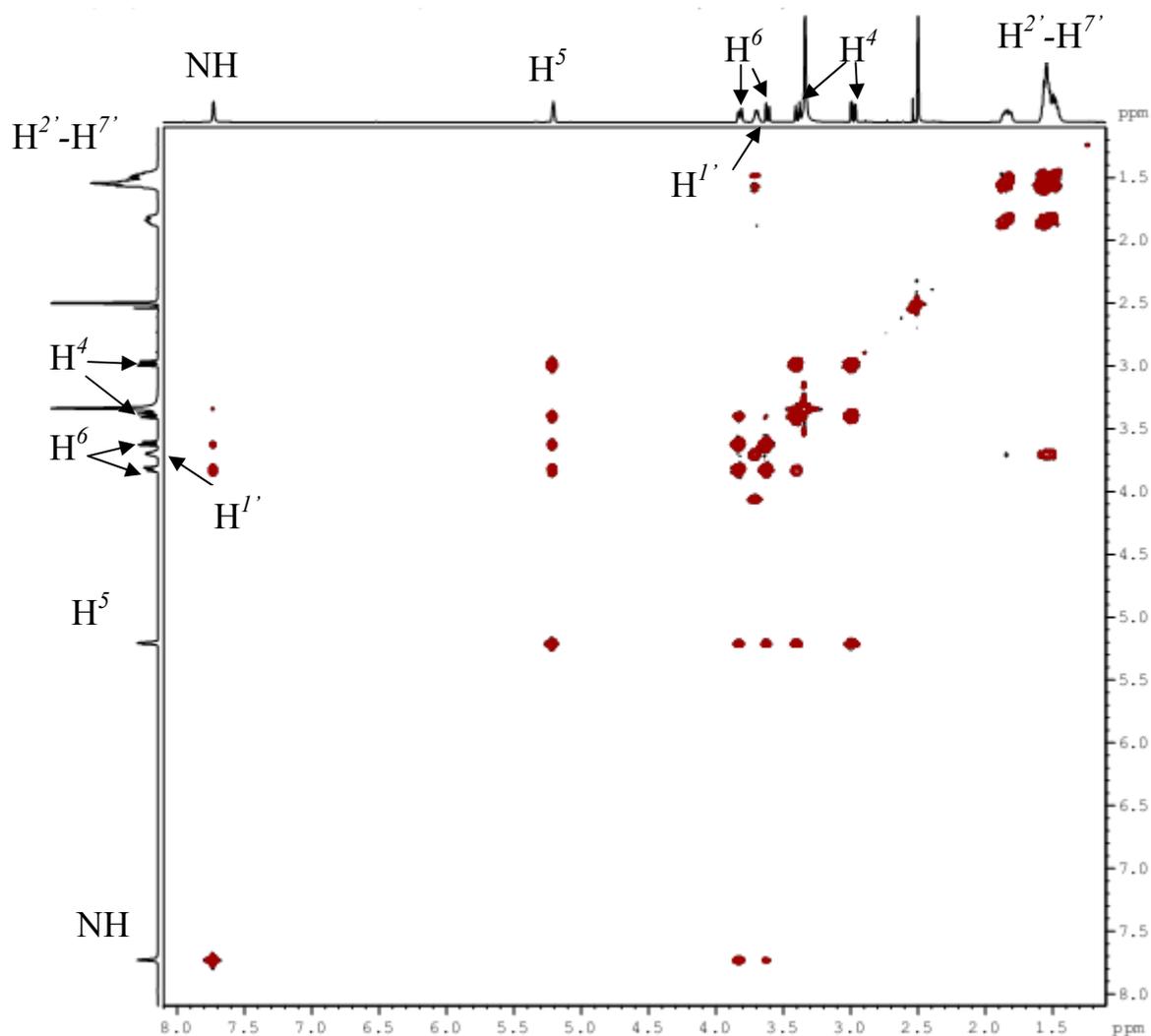


Рис. 2.5. Двумерный ^1H - ^1H корреляционный спектр ЯМР (600.13 МГц, в DMCO-d_6) (COSY) *N*-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина (**6d**)

Дальнейшее подтверждение строения синтезированных тетрагидропиридинов было получено из данных РСА кристалла *N*-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина **6d** (рис. 2.6). В кристалле тетрагидропиридиновый фрагмент характеризуется конформацией искаженного полукресла, с аксиальным расположением нитрогруппы в положении 5. Нитрогруппа в положении 3 фактически копланарна двойной связи, с торсионным углом $\text{C}(2)\text{C}(3)\text{N}(2)\text{O}(1)$ равным $2.0(2)^\circ$. Атом кислорода $\text{O}(1)$ нитрогруппы образует прочную внутримолекулярную водородную связь с расстоянием $\text{O}(1)\dots\text{N}(2)$ равным $2.5095(3)$ Å. Прочность этой связи связана с наличием сопряженной π -системы, образованной атомами углерода двойной связи, атомами азота аминогрупп и нитрогруппой. Наличие

делокализации подтверждается сокращением связей C(2)-N(2) и C(3)-N(3) и удлинению связей C(2)-C(3) и обеих связей N=O по сравнению со средними значениями из Кембриджской базы структурных данных (КБСД) [123].

Удлинение связи N(1)-O(1) до 1.3017(1) наиболее существенно по сравнению со средней длиной в нитрогруппах, равной 1.219(2) Å. Таким образом, в соединении **6d** реализуется типичный пример водородной связи, стабилизированной резонансом [124]. О вовлечении атомов азота в сопряженную систему также свидетельствует их фактически плоское окружение, сумма углов равна 359.9 для N(1) и 359.5° для N(2). Циклогептановый фрагмент характеризуется конформацией твист-кресла, длины связей и валентные углы в этом фрагменте не отличаются от средних по данным КБСД. Наиболее прочным межмолекулярным взаимодействием в кристалле является водородная связь средней силы, образованная атомом аминогруппы H(1N) и атомом кислорода O(1) и объединяющая молекулы в бесконечные цепи, расположенные параллельно кристаллографической оси *c*. Образование этой связи с расстоянием O...N равным 2.7552(2) Å также вносит свой вклад в удлинение связи O(1)-N(1).

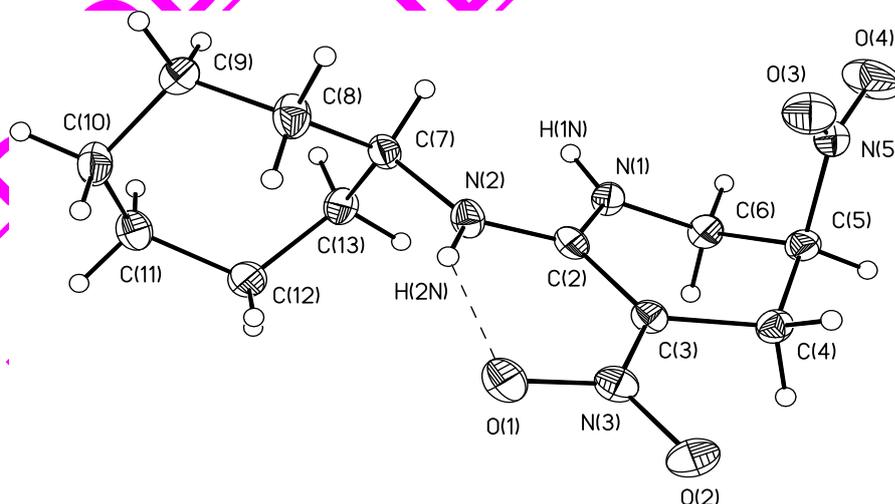
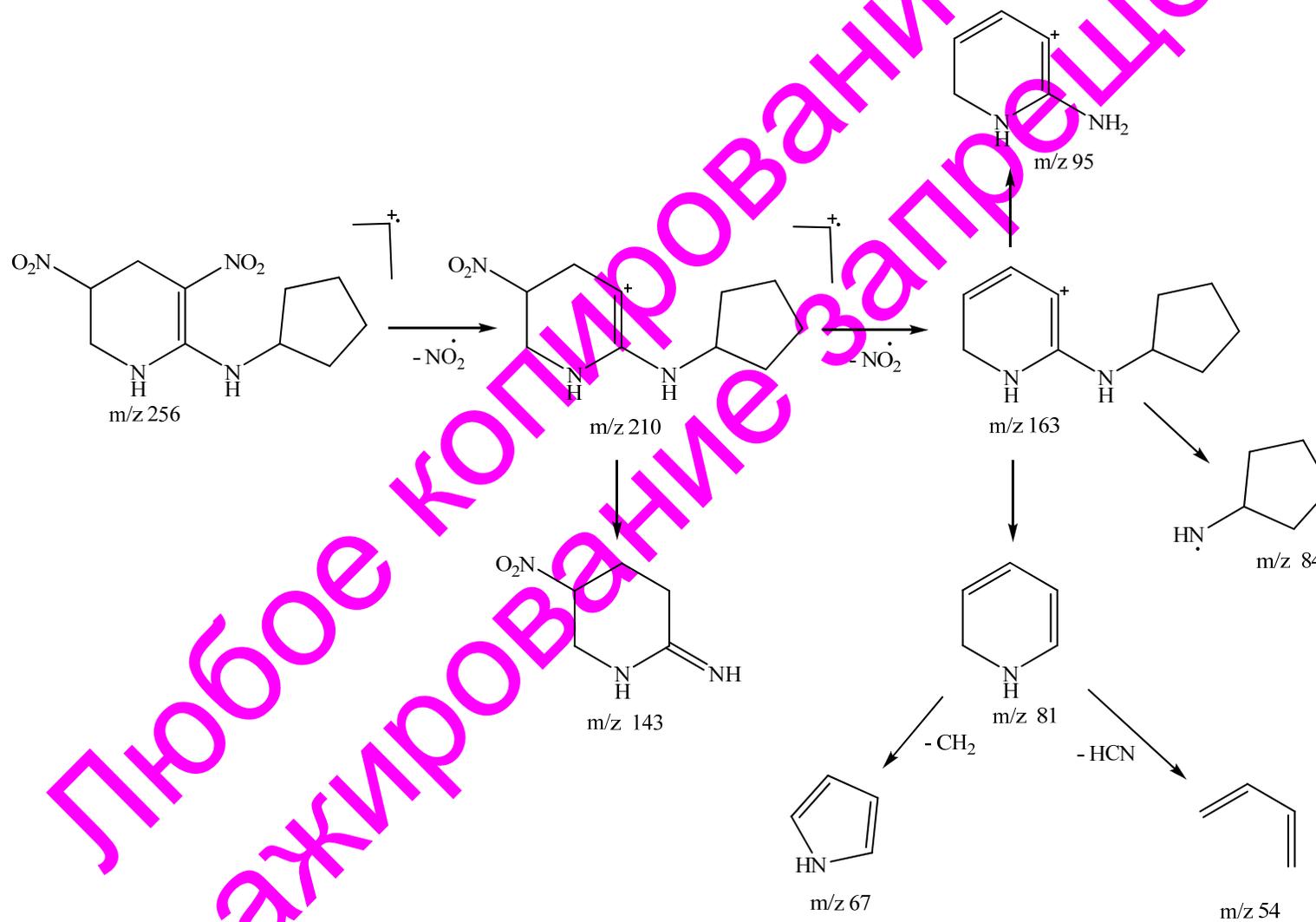


Рис.2.6. Молекулярная структура *N*-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина (**6d**)

Дополнительную информацию о структуре синтезированных соединений можно получить из данных масс-спектрометрии. Исследование распада синтезированных соединений под действием электронного удара

Диссоциативный распад под действием электронного удара *N*-циклопентил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина (66)



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В НАУЧНЫХ
И УЧЕБНЫХ ЦЕЛЯХ.

было проведено на примере N-циклопентил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амин **6в** (схема 2.2). В масс-спектре обнаружен пик молекулярного иона $M^+(m/z\ 256)$, который расщепляется с отрывом нитрогрупп, о чем свидетельствует наличие в спектре осколочных ионов $[M - NO_2]^+(m/z\ 210)$, $[M - 2NO_2]^+(m/z\ 163)$. Дальнейший распад первичных осколочных ионов обусловлен отщеплением амидного заместителя и появлением в спектре пиков вторичных ионов с $m/z\ 143, 95, 81$. На более глубоких стадиях распада происходит разрушение азотсодержащего цикла, обусловленного потерей $-CH_2-$ группы и молекулы циановодорода с образованием ионов с $m/z\ 67$ и 54 соответственно. Таким образом, наличие в масс-спектре пиков молекулярного иона ($m/z\ 256$) и осколочных фрагментов позволяет надежно идентифицировать исследуемое соединение и предложить схему его диссоциативной ионизации при электронном ударе.

Таким образом, проведенные исследования показали, что анионные σ -аддукты нитропиридинов являются достаточно активными реагентами в реакции протонирования, и данная реакция может быть предложена в качестве селективного метода, позволяющего осуществить в мягких условиях переход от активированной нитрогруппами пиридиновой системы к производным пиперидина и тетрагидропиридина, содержащим перспективные с точки зрения дальнейшей функционализации нитро-, карбонильные и amino-группы.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Как отмечалось в литературном обзоре, практический и теоретический интерес к производным пиридина обусловлен их разнообразной физиологической активностью. В связи с этим был проведен прогноз активности с помощью компьютерного моделирования, а также исследована биологическая активность и токсичность ряда синтезированных соединений на живых тест-объектах.

3.1. Компьютерная оценка спектра биологической активности синтезированных соединений

Известно, что пиперидиновое кольцо является структурным фрагментом многих алкалоидов, а также многочисленных предшественников лекарств. Исследования в химии пиперидина и интерес к синтезу новых молекул обусловлены их высоким биологическим значением [26, 125]. В последнее десятилетие несколько тысяч производных пиперидина были использованы в клинических и доклинических исследованиях [126]. Производные тетрагидропиридинов также входят в состав природных алкалоидов и синтетических биологически активных веществ [127, 128].

Принято считать, что молекулы биологически активного вещества претерпевают в организме ряд физико-химических и химических превращений: растворение, сорбцию, распределение, связывание, химическую реакцию, выделение и т.д. Очевидно, что любой из этих этапов или их сочетание в каждом конкретном случае может определять направленность фармакологического действия вещества или является лимитирующей стадией суммарного эффекта, определяемого как биологическая активность [129]. Наиболее важными параметрами соединения-лидера, с точки зрения возможности удачной его оптимизации в активное, селективное, орально биодоступное и нетоксичное лекарство,

являются молекулярная масса и липофильность. Как правило, молекула-кандидат в лекарство в ходе оптимизации увеличивается в размерах и становится более липофильной [130-135]. Некоторые исследователи определяют соединение-лидер, если величина молекулярной массы не выше 350, и липофильность, выражаемая как $\log P$ (P – коэффициент распределения в системе *n*-октанол/вода), менее 3 [136]. Другие группы исследователей рассматривают в качестве факторов, определяющих биодоступность [137, 138] площадь полярной поверхности молекулы и ее гибкость, выражаемую числом связей, вокруг которых возможно вращение [139].

Вместе с тем, наиболее распространено «правило пяти» Липински, которое требует, чтобы лекарство имело молекулярную массу не более 500, липофильность ($\log P$) < 5, число доноров водородной связи в молекуле (H_d) не выше пяти и не более 10 атомов азота и кислорода (грубая оценка числа акцепторов водородной связи (H_a)), а также число нетерминальных вращающихся связей ($RotB$) < 10 [140]. Совокупность рассчитанных дескрипторов определяет потенциальные фармакокинетические свойства соединений. Если два или более из этих требований не будут соблюдены, то полученное соединение не достигнет своей фармакологической цели. С помощью программного обеспечения ChemoSoft (Chemical Diversity Labs, Inc.) нами были рассчитаны выше упомянутые дескрипторы, определяющие потенциальные фармакокинетические свойства 6-R-3,5-динитро-1,2,3,4-тетрагидропиридинов.

Из полученных результатов видно (табл. 3.1), что молекулярные массы исследуемых веществ изменяются в пределах от 188 до 284. Для всех соединений значения дескрипторов H_a и H_d соответствуют критериям Липински, а также удовлетворяют условию концепции *lead-like* по числу нетерминальных вращающихся связей.

Табл. 3.1.

Значения молекулярных дескрипторов ряда синтезированных соединений

№ соединения	$\log P$	MW	H_a	H_d	$RotB$
--------------	----------	----	-------	-------	--------

ба	-1.11	188.143	8	3	2
бб	0.703	244.251	8	2	6
бв	0.664	256.262	8	2	4
бг	-0.361	272.261	9	2	5
бд	1.675	284.316	8	2	4

Для предварительной оценки биологической активности синтезированных соединений было проведено компьютерное моделирование с помощью системы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). Она включает в себя обучающую выборку, содержащую 250407 биологически активных веществ с известной биологической активностью, и охватывает 4265 видов биологической активности, включая 497 фармакологических эффектов, 3378 механизмов действия, 116 взаимодействий с ферментами метаболизма, 274 побочных и токсических эффектов. Принцип предсказания активности заключается в исключении из SAR базы (*qualitative Structure-Activity Relationship*) вещества со структурой молекулы, эквивалентной структуре молекулы вещества, спектр биологической активности которой прогнозируется. Результаты предсказания представляют собой упорядоченный перечень видов активности с указанием вероятности проявления P_a «активный» (to be active) и P_i «неактивный» (to be inactive), имеющие значение от 0 до 1. Чем больше для конкретной активности величина P_a и меньше значение P_i , тем больше шанс обнаружения данной активности в реальном эксперименте.

На практике, однако, при отборе для исследования наиболее перспективных веществ руководствуются и другими критериями, например, критерием новизны. При этом исходят из того, что чем ближе значение P_a к единице, тем более вероятно, что вещество является близким аналогом известного препарата. Поэтому, если целью исследователя является выявление соединений с достаточно высоким уровнем новизны (New Chemical Entity, NCE), то надо выбирать вещества, для которых величина прогнозируемой вероятности P_a для требуемого вида активности несколько ниже, например, $0.5 < P_a < 0.7$. При этом доля ложноположительных прогнозов

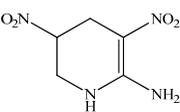
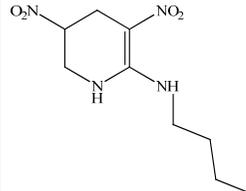
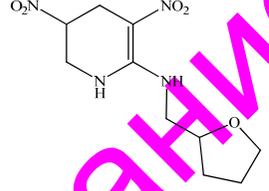
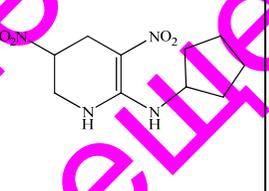
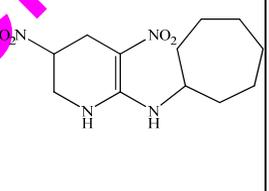
будет выше, но если активность подтвердится в эксперименте, то будет выявлено NCE.

Руководствуясь рекомендациями разработчиков данной программы, нами были получены данные, подтверждающие широкий спектр биологической активности синтезированных соединений. Показатель вероятности проявления большинства активностей превышает 60%, однако с повышением активности, одновременно возрастает и вероятность проявления побочных и токсических эффектов. Аминопроизводные тетрагидропиридинов с наибольшей вероятностью проявляют такие виды биологической активности, как *Acrocyllindropepsin inhibitor*, *Chymosin inhibitor*, *Saccharopepsin inhibitor*, *Ubiquinol-cytochrome-creductase inhibitor*, *Phobicdisorderstreatment*, *Fusarinine-Cornithinesterase inhibitor*. Среди побочных эффектов прогнозируются *Postural (orthostatic) hypotension*, *Neutrophilic dermatosis*, *Ototoxicity*, *Hyperglycemic* (табл. 3.2).

Любое копирование
тиражирование запрещено

Использование в научных
и учебных целях.

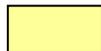
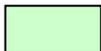
Табл. 3.2. Вероятность проявления биологической активности производных 6-R-3,5-динитро-1,2,3,4-тетрагидропиридинов

Виды Биоактивности	Структура											
	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i		
Acrocyllidropesin inhibitor	0.766	0.028	0.779	0.025	0.743	0.033	0.738	0.034	0.738	0.034		
Chymosin inhibitor	0.766	0.028	0.779	0.025	0.743	0.033	0.738	0.034	0.738	0.034		
Saccharopepsin inhibitor	0.766	0.028	0.779	0.025	0.743	0.033	0.738	0.034	0.738	0.034		
Ubiquinol-cytochrome-c reductase inhibitor	0.752	0.050	0.743	0.053	0.538	0.134	0.804	0.031	0.804	0.031		
Phobic disorders treatment	0.723	0.066	0.629	0.109	0.369	0.259	0.694	0.079	0.694	0.079		
Fusarinine-C ornithinesterase inhibitor	0.705	0.022	0.669	0.029	0.353	0.205	0.634	0.039	0.634	0.039		
Na ⁺ -transporting two-sector ATPase inhibitor	0.679	0.005	0.516	0.022	0.443	0.040	0.644	0.007	0.644	0.007		
Acute neurologic disorders treatment	0.683	0.020	0.534	0.064	0.463	0.104	0.677	0.022	0.677	0.022		
Polyporopepsin inhibitor	0.682	0.044	0.710	0.037	0.624	0.060	0.647	0.053	0.647	0.053		
Glucan endo-1,6-beta-glucosidase inhibitor	0.671	0.023	0.428	0.070	0.357	0.094	0.770	0.011	0.770	0.011		
Nicotinic alpha6beta3beta4alpha5 receptor antagonist	0.641	0.054	0.375	0.214	0.366	0.223	0.664	0.046	0.664	0.046		
Побочные и токсические эффекты												
Postural (orthostatic) hypotension	0.832	0.011	0.682	0.031	0.679	0.031	0.641	0.036	0.641	0.036		
Neutrophilic dermatosis	0.780	0.028	0.528	0.117	0.351	0.224	0.750	0.036	0.750	0.036		
Ototoxicity	0.653	0.023	0.596	0.037	0.580	0.042	0.701	0.014	0.701	0.014		
Hyperglycemic	0.598	0.064	0.540	0.085	0.294	0.230	0.745	0.018	0.745	0.018		

- $P_a > 0.6, P_i < 0.1$,

- $0.4 < P_a < 0.6, P_i < 0.2$,

- $P_a < 0.4, P_i < 0.3$



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В НАУЧНЫХ
И УЧЕБНЫХ ЦЕЛЯХ.

3.2. Оценка цитотоксичности синтезированных соединений

Определение цитотоксичности полученных соединений было произведено на базе Центра Высоких Технологий «ХимРар» с помощью реагента CellTiter-Glo (Promega). Тестирование веществ осуществлялось на клеточной линии Du145 – клетки карциномы простаты человека. Для тестирования были выбраны 3 синтезированных соединения (5д, 6 в, г).

Тестируемые соединения были растворены в ДМСО в концентрации 6 мМ. В качестве контрольных ингибиторов были использованы туберцидин и таксол, исходные концентрации которых составляли 20 мМ и 200 мкМ, соответственно. Были приготовлены 200-кратные серийные разведения тестируемых соединений в ДМСО с шагом 3.16. Тестируемые соединения были разбавлены в среде в 100 раз. В каждую ячейку промежуточных 384-луночных плашек было внесено по 99 мкл среды. К 99 мкл среды добавили по 1 мкл серийных разведений тестируемых соединений в ДМСО. С помощью Biomek 384 NX к 20 мкл клеток были добавлены 2-кратные серийные разведения тестируемых соединений в среде по 20 мкл в каждую лунку в двух повторах, т.е. каждая концентрация тестируемого соединения добавлялась в две лунки. В контрольные лунки было добавлено по 20 мкл среды, содержащей 1% ДМСО вместо тестируемых соединений. Плашка была отцентрифугирована при 180g, 1 минуту и оставлена инкубироваться при 37°C, 5% CO₂ на 72 часа.

CellTiter-Glo буфер и CellTiter-Glo реагент были разморожены, нагреты до комнатной температуры и аккуратно смешаны в соотношении 1:1. Спустя 72 часа инкубации с веществами в каждую лунку эссеи плашки было добавлено по 10 мкл полученного CellTiter-Glo раствора с помощью Biomek 384 FX. Плашка была отцентрифугирована при 180g 1 минуту и оставлена инкубироваться при комнатной температуре на 10 минут. Спустя 10 минут инкубации с CellTiter-Glo, интенсивность люминесценции была измерена на люминесцентном ридере Wallac 1420 VictorLight. В качестве количественного параметра для оценки цитотоксичности использовали

величину $ЦК_{50}$, которая соответствует концентрации вещества, при которой погибает 50% клеток.

Таблица 3.3.

Цитотоксичность туберцидина, таксола и тестируемых соединений

Du145, 10% FBS, CellTiter-Glo, цитотоксичность			
Вещество	Макс. тестируемая конц-я, мкМ	% цитотоксичности при макс. конц-и	$ЦК_{50}$, мкМ
Туберцидин	100	95	0.232
Таксол	1	71	0.0134
5д	30	нетоксично	>30
6в	30	нетоксично	>30
6г	30	нетоксично	>30

Как видно из таблицы 3.3, все тестируемые соединения не проявляют цитотоксичности в указанном диапазоне концентраций. Отсутствие токсичности синтезируемых соединений в отношении клеток человека говорит о возможности их применения в медицине.

Таким образом, проведён компьютерный скрининг биологической активности ряда синтезированных соединений в системе *PASS*, который показал широкий спектр их потенциальной активности (антидиабетическая, ноотропная, ингибитор акроцилиндропепсина и химозина, ингибитор проницаемости мембран, лечение фобий и др.). Проведена оценка цитотоксичности ряда синтезированных соединений на клеточной линии Du145 – клетки карциномы простаты человека. Как показали результаты исследования, все тестируемые соединения не проявляют цитотоксичности даже при максимальной тестируемой концентрации (30 мкМ), что говорит о возможности их применения в медицине.

ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4.1. Синтез исходных соединений и подготовка растворителей

4.1.1. Синтез и очистка 2-гидрокси-3,5-динитропиридина (1)

Для синтеза 2-гидрокси-3,5-динитропиридина использовался товарный 2-гидроксипиридин. Нитрование проводили по литературной методике [69]. В трехгорлую колбу емкостью 1 л, снабженную мешалкой, капельной воронкой и термометром и установленную в ледяной бане, загружали 75 мл 27%-ного олеума. При перемешивании за 30 минут прибавляли 45 г (0.047 моль) 2-гидроксипиридина, затем из капельной воронки в течение 2 часов добавляли нитрующую смесь, состоящую из 292 мл 27%-ного олеума и 157 мл дымящей азотной кислоты, поддерживая температуру реакционной массы 5—8°. После этого реакционной массе давали принять комнатную температуру, а затем при перемешивании осторожно нагревали ее на водяной бане до 80—85° и выдерживали при этой температуре 70 минут. По охлаждении смесь выливали на лед (500 г) и оставляли на ночь. Выделившийся осадок отфильтровывали, промывали 100 мл воды и сушили на воздухе. Выход 3,5-динитро-2-оксипиридина равен 83%; т. пл. 176—178°.

4.1.2. Синтез и очистка 2-хлор-3,5-динитропиридина (4)

2-Хлор-3,5-динитропиридин (4) синтезировали по литературной методике [69]. В круглодонную колбу емкостью 100 мл, снабженную обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, загружали 55 мл (92 г, 0.6 моль) хлорокиси фосфора, 25.5 мл диметилформамида и 25.5 г (0.14 моль) 3,5-динитро-2-гидроксипиридина. Смесь нагревали на кипящей водяной бане 30 минут. Затем избыток хлорокиси фосфора отгоняли в вакууме водоструйного насоса. Остаток выливали на лед (~40г), причем выделялся желтый осадок. Его отфильтровывали, сушили, растворяли в 100 мл спирта и осаждали добавлением 70 мл воды. Продукт отфильтровывали и сушили в

эксикаторе над серной кислотой. Выход 2-хлор-3,5-динитропиридина равен 75%; т. пл. 63-64 °С.

4.1.3. Синтез и очистка 3,5-динитропиридин-2-амина (5а)

3,5-динитропиридин-2-амин был получен по литературной методике [141]. 2-хлор-3,5-динитропиридин (2 г, 9.83 ммоль) суспендировали в этаноле (15 мл). Затем раствор гидроксида аммония (6 мл, 28%-ный раствор) медленно добавляли по каплям в течение 20 минут при перемешивании и комнатной температуре. После чего оставляли перемешиваться еще 20 минут при комнатной температуре. Затем реакционную смесь помещали в ледяную баню на 10 минут и охлаждали до 0°C. Выпавший желтый осадок, отфильтровывали и высушивали. Выход 3,5-динитропиридин-2-амина 97%.

4.1.4. Синтез и очистка N-бутил-3,5-динитропиридин-2-амина (5б)

N-бутил-3,5-динитропиридин-2-амин синтезирован с использованием литературной методики [142]. К раствору 2-хлор-3,5-динитропиридина (0.664 г, 4.2 ммоль) в 8 мл безводного изопропанола добавляли 0.29 г (2.1 ммоль) карбоната калия и 5 мл (5.81 г, 79.2 ммоль) бутиламина при температуре T=25°C. Реакционную смесь нагревали 2 часа, затем выливали на лед. Выпавший желтый осадок, отфильтровывали и высушивали. Выход N-бутил-3,5-динитропиридин-2-амина 90%.

4.1.5. Синтез N-(R)-3,5-динитропиридин-2-аминов (5в-д)

К раствору 2-хлор-3,5-динитропиридина (0.79 г, 5 ммоль) в 7 мл безводного изопропанола добавляли 0.35 г (2.5 ммоль) карбоната калия и 6 мл (83 ммоль) соответствующего амина при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 2 часов, после выливали в холодную воду. Выпавший желтый осадок отфильтровывали, промывали водой.

N-циклопентил-3,5-динитро-2-амин (**5в**): Выход 82%, т. пл. 93-94 °С, R_f 0.80. ЯМР ^1H спектр (300.13 МГц, ДМСО - d_6 , δ , м.д): 1.61-1.76 м (6H, H^{3'}, H^{4'}, H^{5'}), 1.98-2.07 м (2H, H^{2'}), 4.62-4.71 м (1H, H^{1'}), 8.80 ш.с (1H, NH), 8.95 с

(1H, H⁴), 9.25 с (1H, H⁶). Найдено, %: С 47.52; Н 4.90; N 22.31. C₁₀H₁₂N₄O₄. Вычислено, %: С 47.62; Н 4.80; N 22.21.

3,5-динитро-N-((тетрагидрофуран-2-ил)метил)пиридин-2-амин (5г): Выход 83%, т. пл. 102-103 °С, *R_f* 0.77. ЯМР ¹Н спектр (300.13 МГц, ДМСО - *d*₆, δ, м.д): 1.60-1.69 м (1H, H^{4а}), 1.78-1.98 м (3H, H³, H^{4е}), 3.73-3.78 м (2H, NHCH₂), 3.63-3.70 м (1H, H⁵), 3.80-3.85 м (1H, H⁵), 4.09-4.17 м (1H, H²), 8.97 д (1H, H⁴, ⁴*J* 2.60 Гц), 9.16 ш.с (1H, NH), 9.24 д (1H, H⁶, ⁴*J* 2.60 Гц). Найдено, %: С 44.58; Н 4.71; N 20.99. C₁₀H₁₂N₄O₅. Вычислено, %: С 44.78; Н, 4.51; N 20.89.

N-циклогептил-3,5-динитро-2-амин (5д): Выход 85%, т. пл. 82-83 °С, *R_f* 0.78. ЯМР ¹Н спектр (300.13 МГц, ДМСО - *d*₆, δ, м. д): 1.47-1.81 м (10H, H³, H⁴, H⁵, H⁶, H⁷), 1.89-1.98 м (2H, H²), 4.42-4.51 м (1H, H¹), 8.81 д (1H, NH), ³*J* 8.10 Гц), 8.96 д (1H, H⁴, ⁴*J* 2.20 Гц), 9.26 д (1H, H⁶, ⁴*J* 2.20 Гц). Найдено, %: С 51.32; Н 5.85; N 19.89. C₁₂H₁₆N₄O₄. Вычислено, %: С 51.42; Н 5.75; N 19.99.

4.1.6. Подготовка реагентов и растворителей

Амины использовались в виде готовых реагентов - солей (гидрохлоридов) или свободных оснований.

Растворители очищали и абсолютировали по известным методикам [143]. Их чистоту контролировали по температуре кипения и показателю преломления на рефрактометре ИРФ-22.

4.2. Синтез гидридных σ-аддуктов на основе N-(R)-3,5-динитропиридин-2-аминов

0.005 моль 2-R-3,5-динитропиридина растворяли в 10 мл смеси ДМФА и этанола (1:1). При перемешивании и охлаждении льдом порциями добавляли раствор 0.76 г (0.02 моль) NaBH₄ в 5 мл воды, поддерживая температуру реакционной смеси в пределах 10 – 15 °С. Перемешивание продолжали 20 мин. Осадок отфильтровывали, промывали безводным

ацетоном, сушили в вакуум-эксикаторе над безводным $MgSO_4$ и анализировали.

Аддукты **Va-e** в дальнейшие химические превращения вносили без выделения.

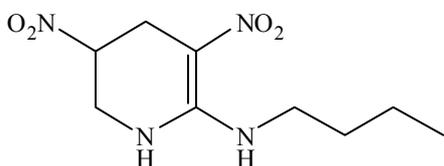
Динатриевая соль 3,5-бис(ацинитро)-3,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амина (Va): Выход 90%, т. пл. >260 °C. ИК спектр (табл. KBr, cm^{-1}): $\nu(NH_2)$ 3370, $[\delta(NH_2)]$ 1653, $\nu_{as}(NO_2)$ 1589, $\nu_s(NO_2)$ 1343, $[\delta(CH_2, CH_3)]$ 1392. ЯМР 1H спектр (300.13 МГц, D_2O , δ , м.д): 3.75 уш.с (2H, H^4), 4.29 уш.с (2H, H^6).

4.3. Общая методика синтеза 3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-аминов, исходя из гидридных аддуктов 2-амино-3,5-динитропиридинов

0.005 моль 2-R-3,5-динитропиридина (**5a-e**) растворяли в 10 мл смеси диметилформамида и этанола (1:1). При перемешивании и охлаждении льдом порциями раствор 0.76 г (0.02 моль) $NaBH_4$ в 5 мл воды в течение 5 минут, затем перемешивали еще 15 минут. Температуру реакционной смеси поддерживали в пределах 10 – 15 °C. С помощью 20% раствора H_3PO_4 pH реакционной смеси довели до 4.0, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, перекристаллизовывали из 2-пропанола.

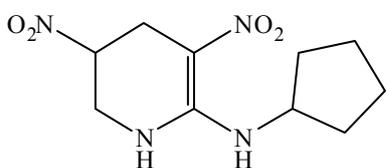
3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амин (6a): Выход 85%, т. пл. 108-109 °C, R_f 0.38. ИК спектр (табл. KBr), cm^{-1} : $\nu(NH_2)$ 3482, $\nu(NH)$ 3401, $\nu(C=C)$ 1630, $\nu_{as}(NO_2)$ 1555, $\nu_s(NO_2)$ 1326, $\nu(C-N)$ 907, $\nu(CH_{алиф})$ 2923, $\delta(CH_2)$ 1385. ЯМР 1H спектр (300.13 МГц, ДМСО - d_6 , δ , м.д): 2.97 (1H, H^4_a , 2J 17.6 Гц), 3.40 д (1H, H^4_e , 2J 17.6 Гц), 3.56 д (1H, H^6_a , 2J 14.3 Гц), 3.83 д (1H, H^6_e , 2J 14.3 Гц), 5.20с (1H, H^5), 7.40 ш.с (1H, NH), 9.42 ш.с (2H, NH_2). Найдено, %: C 31.72; H 4.59; N 29.48. $C_5H_8N_4O_4$. Вычислено, %: C 31.92; H 4.29; N 29.78.

N-бутил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амин (6б): Выход 79%, т. пл. 95-97°C, R_f 0.47. ИК спектр (табл. KBr), cm^{-1} : $\nu(NH)$ 3266, $\nu(C=C)$ 1636, $\nu_{as}(NO_2)$



1556, $\nu_s(\text{NO}_2)$ 1346, $\nu(\text{C-N})$ 913, 875, $\nu(\text{CH}_{\text{алиф.}})$ 2964, 2937, $\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ 1447. ЯМР ^1H спектр (300.13 МГц, ДМСО - d_6 , δ , м.д): 0.90 т (3H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, 3J 7.0 Гц), 1.29-1.37 м (2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.50-1.56м (2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.99 (1H, H^4_{a} , 2J 17.8 Гц, 3J 5.5 Гц), 3.19-3.23 м (2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.44 д (1H, H^4_{e} , 2J 17.8 Гц), 3.62 д (1H, H^6_{a} , 2J 15.0 Гц), 3.83 д (1H, H^6_{e} , 2J 15.0 Гц), 5.21с (1H, H^5), 7.75ш.с (1H, NH), 10.82 ш.с (1H, NH_R). Найдено, %: С 44.06; Н 6.80; N 22.74. $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$. Вычислено, %: С 44.26; Н 6.60; N 22.94.

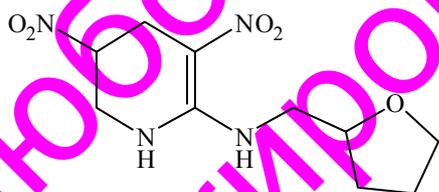
N-циклопентил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амин (6в):



Выход 81%, т. пл. 138-139 °С, R_f 0.62. ИК спектр (табл. KBr), cm^{-1} : $\nu(\text{NH})$ 3280, $\nu(\text{C=C})$ 1615, $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ 1560, $\nu_s(\text{NO}_2)$ 1350, 1330, $\nu(\text{C-N})$ 913, $\nu(\text{CH}_{\text{алиф.}})$

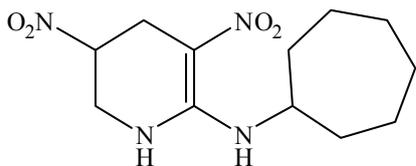
2965, 2940, 2867, $\delta(\text{CH}_2)$ 1391. ЯМР ^1H спектр (300.13 МГц, ДМСО - d_6 , δ , м.д): 1.40-1.53 (1H, H^5), 1.58-1.68 м (4H, H^3 , H^4), 1.94-2.00м (2H, H^2), 2.99 д.д (1H, H^4_{a} , 2J 17.6 Гц, 3J 5.5 Гц), 3.40 д (1H, H^4_{e} , 2J 17.6 Гц), 3.63 д (1H, H^6_{a} , 2J 14.3 Гц), 3.81-3.92 м (2H, H^1 , H^6_{e}), 5.21с (1H, H^5), 7.71 ш.с (1H, NH), 10.98 ш.с (1H, NH_R). Найдено, %: С 46.77; Н 6.39; N 22.06. $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$. Вычислено, %: С 46.87; Н 6.29; N 21.86.

3,5-динитро-*N*-((тетрагидрофуран-2-ил)метил)-1,4,5,6-



тетрагидропиридин-2-амин (6г): Выход 77%, т. пл. 115-116 °С, R_f 0.52. ИК спектр (табл. KBr), cm^{-1} : $\nu(\text{NH})$ 3404, $\nu(\text{C=C})$ 1631, $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ 1565, $\nu_s(\text{NO}_2)$ 1355, 1325, $\nu(\text{C-N})$ 919, $\nu(\text{CH}_{\text{алиф.}})$ 2971,

2952, 2885, 1419, 1402, $\delta(\text{CH}_2)$ 1388. ЯМР ^1H спектр (300.13 МГц, ДМСО - d_6 , δ , м.д): 1.46-1.58 м (1H, H^4_{a}), 1.79 -2.01 м (3H, H^3 , H^4_{e}), 2.99 д.д (1H, H^4_{a} , 2J 17.6 Гц, 3J 5.5 Гц), 3.23-3.36 м (2H, NHCH_2), 3.43 д (1H, H^4_{e} , 2J 14.7 Гц), 3.58-3.67 м (2H, H^6_{a} , H^5_{a}), 3.73-3.85 м (2H, H^6_{e} , H^5_{e}), 3.97-4.02 м (1H, H^2), 5.21с (1H, H^5), 7.77 ш.с (1H, NH), 10.90 ш.с (1H, NH_R). Найдено, %: С 44.22; Н 5.82; N 20.58. $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$. Вычислено, %: С 44.12; Н 5.92; N 20.58.

N-циклогептил-3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-амин (6д):

Выход 83%, т. пл. 143-144 °С, R_f 0.52. ИК спектр (табл. KBr), cm^{-1} : $\nu(\text{NH})$ 3423, $\nu(\text{C}=\text{C})$ 1620, $\nu_{as}(\text{NO}_2)$ 1568, 1551, $\nu_s(\text{NO}_2)$ 1350, 1322, $\nu(\text{C}-\text{N})$

913, $\nu(\text{CH}_{\text{алиф.}})$ 2929, $\delta(\text{CH}_2)$ 1402, 1374. ЯМР ^1H спектр (300.13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д): 1.53 ш.с (10H, H^3 , H^4 , H^5 , H^6 , H^7), 1.83 ш.с (2H, H^2), 2.98 д.д (1H, H^4 , 2J 17.6 Гц, 3J 5.4 Гц), 3.41 д (1H, H^4 , 2J 17.6 Гц), 3.61 д (1H, H^6 , 2J 14.7 Гц), 3.70 ш.с (1H, H^1), 3.83 д (1H, H^6 , 2J 14.7 Гц), 5.20с (1H, H^5), 7.72 ш.с (1H, NH), 11.05 д (1H, NH, 2J 8.1 Гц). Найдено, %: С 50.49; Н 7.29; N 19.51. $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$. Вычислено, %: С 50.69; Н 7.09; N 19.71.

Кристаллы соединения 6д для рентгеноструктурных исследований получали медленным изотермическим упариванием раствора вещества в ДМФА. Бесцветные игольчатые кристаллы ($\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$, $M = 284.32$) при $T = 120$ К моноклинные, пр. гр. $P2_1/c$, $a = 11.5648(14)$, $b = 13.3330(16)$, $c = 9.3365(11)$ Å, $\beta = 105.123(2)^\circ$, $V = 1389.8(3)$ Å 3 , $Z = 4$ ($Z' = 1$), $d_{\text{выч.}} = 1.359$ г/см 3 . В серии из трёх сканирований было собрано 13995 отражений. Эмпирический учет поглощения и коррекция систематических ошибок выполнены по программе SADABS. Структура расшифрована прямым методом и уточнена полноматричным МНК по F^2_{hkl} с анизотропными тепловыми параметрами для всех неводородных атомов. Положение атомов водорода аминогрупп найдено из разностного Фурье-синтеза, положение атомов водорода при атомах углерода рассчитано. Все атомы водорода уточнены в модели наездника. Окончательные параметры расходимости составили: $R_1 = 0.0426$, $wR_2 = 0.1026$, $\text{GOF} = 1.034$ для 2359 независимых отражений с $I > 2\sigma(I)$ и $3.62 < 2\theta < 54.0^\circ$. Расшифровка и уточнение проводилось с использованием пакета программ SHELX версии 2009-9.13 [144].

4.4. Определение цитотоксичности соединений с помощью реагента CellTiter-Glo (Promega)

Определение цитотоксичности полученных соединений было произведено на базе Центра Высоких Технологий «ХимРар». Тестирование веществ осуществлялось на клеточной линии Du145 – клетки карциномы простаты человека. Была приготовлена клеточная суспензия на культуральной среде, клетки были посчитаны с помощью автоматического клеточного счетчика, и концентрация клеток доведена до 2×10^5 клеток/мл (4000 клеток на лунку). Клетки были посажены в 384-луночные плашки с помощью Biomek 384 NX по 20 мкл клеточной суспензии в каждую лунку. В контрольные лунки было добавлено по 20 мкл среды. Плашки были отцентрифугированы при 180g, 1 минуту и оставлены инкубироваться при 37°C, 5% CO₂, на 24 часа.

Тестируемые соединения растворяли в ДМСО в концентрации 6 мМ. В качестве контрольных ингибиторов использовали туберцидин и таксол, исходные концентрации которых составляли 20 мМ и 200 мкМ, соответственно. Были приготовлены 200-кратные серийные разведения тестируемых соединений в ДМСО с шагом 3.16 с помощью Biomek 2000. Тестируемые соединения разбавляли в среде в 100 раз. В каждую ячейку промежуточных 384-луночных плашек вносили по 99 мкл среды с помощью Biomek 384 NX. К 99 мкл среды добавляли по 1 мкл серийных разведений тестируемых соединений в ДМСО с помощью Biomek 384 NX. С помощью Biomek 384 NX к 20 мкл клеток добавляли 2-х кратные серийные разведения тестируемых соединений в среде по 20 мкл в каждую лунку в двух повторах, т.е. каждая концентрация тестируемого соединения добавлялась в две лунки. В контрольные лунки добавляли по 20 мкл среды, содержащей 1% ДМСО вместо тестируемых соединений. Плашку центрифугировали при 180g, 1 минуту и оставляли инкубироваться при 37°C, 5% CO₂ на 72 часа. CellTiter-Glo буфер и CellTiter-Glo реагент размораживали, нагревали до комнатной температуры и аккуратно смешивали в соотношении 1:1. Спустя 72 часа

инкубации с веществами в каждую лунку эссей плашки добавляли по 10 мкл полученного CellTiter-Glo раствора с помощью Biomek 384 FX. Плашку центрифугировали при 180g 1 минуту и оставляли инкубироваться при комнатной температуре на 10 минут. Спустя 10 минут инкубации с CellTiter-Glo, интенсивность люминесценции измеряли на люминесцентном ридере Wallac 1420 VictorLight.

В качестве количественного параметра для оценки цитотоксичности использовали величину ЦК50, которая соответствует концентрации вещества, при которой погибает 50% клеток.

Расчет параметра ЦК50: для расчета эффективности ингибирования (% Инг) использовали формулу: $\% \text{ Инг} = [(Л\text{поз} - Л\text{экс}) / (Л\text{поз} - Л\text{отр})] * 100\%$, где Лпоз – положительный контроль, люминесценция в ячейках с клетками без вещества; Лотр – отрицательный контроль, люминесценция в ячейках со средой без клеток; Лэкс – люминесценция в ячейках с веществом в определенной концентрации. Значения ЦК50 затем рассчитывали при помощи программы GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) по критерию минимизации квадратов отклонения экспериментальных точек от теоретической кривой.

4.5. Физико-химические методы исследований

Коэффициенты удерживания (R_f) определяли на пластинках Silufol UV-254 при использовании следующих систем элюентов: ацетон-толуол-гептан (1:4:1) детектирование УФ светом и параами йода.

Температуры плавления соединений измеряли на столике Кофлера фирмы Voetius. Скорость нагрева составляла 4 град/мин.

Регистрацию *инфракрасных спектров поглощения* производили на Фурье-спектрометре ФСМ 1201 в таблетках KBr (1.5:300) с разрешением 4 см^{-1} . Волновые числа колебаний приведены в обратных сантиметрах (см^{-1}).

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометрах Bruker AC-300 (300.13 и 75.47 МГц), Bruker DRX-400 (400.13 и 75.47 МГц), Bruker DRX-

500 (500.13 и 127.67 МГц) в ДМСО- d_6 , D₂O. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) в шкале δ относительно гексаметилдисилоксана. Указана мультиплетность сигнала: с - синглет, д - дублет, т - триплет, м - мультиплет. Константы спин-спинового взаимодействия (J) выражены в герцах (Гц).

Масс-спектры соединений записывали на приборе Varian MAT-311 при энергии ионизирующего излучения 70 эВ, система напуска – прямой ввод.

Элементный анализ выполняли на CHN-анализаторе (модель 1100, Carlo Erba, Италия).

Рентгенодифракционные исследования проводили на автоматическом дифрактометре Bruker Apex II (графитовый монохроматор, $\lambda(\text{MoK}\alpha) = 0.71073 \text{ \AA}$, ω -сканирование).

Расчет *физико-химических дескрипторов* проводили с использованием модулей компьютерной программы ChemoSoft™ (Chemical Diversity Labs. Inc.). Прогнозирование биологической активности синтезированных соединений осуществляли в онлайн системе PASS.

ВЫВОДЫ

1. Разработан эффективный метод получения замещенных 3,5-динитро-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-аминов, основанный на нуклеофильном замещении галогена в исходном 2-хлор-3,5-динитропиридине и последующем восстановлении 2-R-3,5-динитропиридинов с помощью тетрагидробората натрия. Выходы синтезированных соединений составили от 82 до 85 %.
2. С помощью ИК, ЯМР спектроскопии, а также РСА и Масс-спектрометрии доказана структура промежуточных и целевых соединений.
3. Проведено исследование биологической активности с помощью системы Pass online, которое показало, что полученные соединения представляют интерес с точки зрения разработки перспективных лекарственных средств, так как обладают такими активностями, как ноотропная, антидиабетическая, ингибитор проницаемости мембран, лечение фобий.
4. Проведена оценка цитотоксичности ряда синтезированных соединений на клеточной линии Du145 – клетки карциномы простаты человека. Как показали результаты исследования, все тестируемые соединения не проявляют цитотоксичности, что говорит о возможности их применения в медицине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daly J.W., Garraffo H.M., Spande T.F. Chapter One Alkaloids from amphibian skins // *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*; Pelletier W. W., Ed.Elsevier: New York. 1999. V. 13. P. 1-161.
2. Daly J.W., Spande T.F., Garraffo H.M. Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of Over Eight-Hundred Compounds // *J. Nat. Prod.* 2005, V. 68. P. 1556-1575.
3. Michael J.P. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids // *Nat. Prod. Rep.* 2008. V 25. P. 139-187.
4. Hirasawa Y., Kobayashi J., Morita H. The Lycopodium Alkaloids // *Heterocycles.* 2009. V. 77. P 679-729.
5. Pizzolato J.F., Saltz L.B. The camptothecins // *Lancet.* 2003. V. 361. P 2235-2342.
6. Morita H., Hirasawa Y., Shinzato T., Kobayashi J. New phlegmarane-type, cernuane-type, and quinolizidine alkaloids from two species of Lycopodium// *Tetrahedron.* 2004. V. 60. P. 7015-7023.
7. Daly J.W. Ernest Guenther Award in Chemistry of Natural Products. Amphibian Skin: A Remarkable Source of Biologically Active Arthropod Alkaloids // *J. Med. Chem.* 2003.V 46. P. 445-452.
8. Tsuneki H., You Y., Toyooka N., Kagawa S., Kobayashi S., Sasaoka T., Nemoto H., Kimura I., Dani J.A. Alkaloids Indolizidine 235B', Quinolizidine 1-epi-207I, and the Tricyclic 205B are Potent and Selective Noncompetitive Inhibitors of Nicotinic Acetylcholine Receptors // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 66. P. 1061-1069.
9. Katavic P.L., Venables D.A., Rali T., Carroll A.R. Indolizidine Alkaloids with δ -Opioid Receptor Binding Affinity from the Leaves of *Elaeocarpus fuscoides* // *J. Nat. Prod.* 2007. V 70. P. 872-875.

10. Bosch J., Bannasch M.-L. A General Method for the Synthesis of Bridged Indole Alkaloids. Addition of Carbon Nucleophiles to N-Alkylpyridinium Salts // *Synlett*. V. 1995. P. 587.
11. Sinclair A., Stockman R.A. Thirty-five years of synthetic studies directed towards the histrionicotoxin family of alkaloids // *Nat. Prod. Rep.* 2007. V. 24. P. 298-326.
12. Burgess V.A., Davies S.G., Skerlj R.T. NADH mimics for the stereoselective reduction of benzoylformates to the corresponding mandelates // *Tetrahedron: Asymmetry*. 1991. V. 2. P. 299-328.
13. Gordeev M.F., Patel D.V., England B.P., Jonnalagadda S., Combs J.D., Gordon E.M. Combinatorial synthesis and screening of a chemical library of 1,4-dihydropyridine calcium channel blockers // *Bioorg. Med. Chem.* 1998. V.6. P. 883-889.
14. Goldmann S., Stoltefuss J. 1,4-Dihydropyridines: Effects of Chirality and Conformation on the Calcium Antagonist and Calcium Agonist Activities // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991. V. 30. P. 1559-1578.
15. Buffat M.G. P. Synthesis of piperidines // *Tetrahedron*. 2004. V. 60. P. 1701-1729.
16. Felpin F.-X., Lebreton J. Recent Advances in the Total Synthesis of Piperidine and Pyrrolidine Natural Alkaloids with Ring-Closing Metathesis as a Key Step // *Eur. J. Org. Chem.* 2003. P. 3693-3712.
17. Carey J.S., Laffan L., Thompson C., Williams M.T. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules // *Org. Biomol. Chem.* 2006. V. 4. P. 2337-2347.
18. Dugger R.W., Ragan J.A., Ripin D.H.B. Survey of GMP Bulk Reactions Run in a Research Facility between 1985 and 2002 // *Org. Process Res. Dev.* 2005. V. 9. P. 253-258.

19. Legault C.Y., Charette A.B. Catalytic Asymmetric Hydrogenation of N-Iminopyridinium Ylides: Expedient Approach to Enantioenriched Substituted Piperidine Derivatives // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 8966–8967.
20. Scheiper B., Glorius F., Leitner A., Fürstner A. Catalysis-based enantioselective total synthesis of the macrocyclic spermidine alkaloid isoconcinotine // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. V. 101. P. 11960-11965.
21. Verendel J.J., Zhou T., Li J.Q., Paptchikhine A., Lebeldev O., Andersson P.G. Highly Flexible Synthesis of Chiral Azacycles via Iridium-Catalyzed Hydrogenation // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 8880-8881.
22. Henry G.D. De novo synthesis of substituted pyridines // *Tetrahedron.* 2004. V. 60. P. 6043-6061.
23. Horton D.A., Bourne G.T., Smythe M.L. The Combinatorial Synthesis of Bicyclic Privileged Structures or Privileged Substructures // *Chem. Rev.* 2003. V. 103. P. 893-930.
24. Pharmaceuticals Sales 2010. Drug information online, Drugs.com December 2011: <http://www.drugs.com/top200.html>.
25. Buss A.D., Butler M.S. Natural Product Chemistry for Drug Discovery. The Royal Society of Chemistry: Cambridge. UK. 2010.
26. Weintraub P.M., Sabol J.S., Kane J.M., Borcharding D.R. Recent advances in the synthesis of piperidones and piperidines // *Tetrahedron.* 2003. V. 59. P. 2953-2989.
27. Fanta P.E. Some 5-Substituted Derivatives of Ethyl 2-Methylnicotinate // *J. Am. Chem. Soc.* 1953. V. 75. P. 737-738.
28. Fanta P.E., Stein R.A. The Condensation of Sodium Nitromalonaldehyde with Cyanoacetamide // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. V. 77. P. 1045–1046.
29. Gundermann K.D., Alles H.U. Synthesis of 2,4,6-Tricyanopyridine 1-Oxide from Nitroacetonitrile // *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* 1966. V. 5. P. 846.
30. Friedl F. Über die Darstellung von Nitro-pyridin // *Ber.* 1912. V. 45. P. 428-430.

31. Kirpal A., Reiter E. 3-Nitropyridin und seine Derivate // Ber. 1925. V. 58. P. 699-701.
32. Den Hertog H.J., Overhoff J. Über die Nitrierung des Pyridins. (Darstellung des 2-Nitropyridins) // Rec. trav. chim. 1930. V. 49. P. 552-556.
33. Schaarschmidt A., Balzerkiewicz H., Gante J. Über ein neues Nitrierverfahren mit Hilfe von Stickoxyden aus Luft oder Ammoniak (II) // Ber. 1925. V. 58. P. 499-502.
34. Schorigin P., Toptschiev A. Die Nitrierung mit Hilfe von Stickstoffdioxyd, II. Mitteil.: Über die Nitrierung von Pyridin und Chinolin // Ber. 1936. V. 69. P. 1874-1877.
35. Bakke J.M., Hegborn I., Øvreeide E., Aaby K. Nitration of Aromatic and Heteroaromatic Compounds by Dinitrogen Pentaoxide // Acta Chem. Scand. 1994. V. 48. P. 1001-1006.
36. Bakke J.M., Raner E.A. A New Efficient Synthesis of 3-Nitropyridine and Substituted Derivatives // Synthesis. 1997. P. 281-283.
37. Bakke J.M., Raner E., Riha J., Svensen H. The Synthesis of beta-Nitropyridine Compounds // Acta Chem. Scand. 1999. V. 53. P. 141-144.
38. Bakke J.M. Nitropyridines, their synthesis and reactions // J. Heterocycl. Chem. 2005. V. 42. P. 463-474.
39. Suzuki H., Iwaya M., Mori T. C-Nitration of pyridine by the kyodai-nitration modified by the Bakke procedure. A simple route to 3-nitropyridine and mechanistic aspect of its formation // Tetrahedron Lett. 1997. V. 38. P. 5647-5650.
40. Katritzky A.R., Scriven E.F.V., Majumder S., Akhmedova R.G., Vakulenko A.V., Akhmedov N.G., Murugan R., Abboud K.A. Preparation of nitropyridines by nitration of pyridines with nitric acid // Org. Biomol. Chem. 2005. V. 3. P. 538-541.
41. Plazek E. Über die Nitrierung von einigen Methylhomologen des Pyridins // Ber. 1939. V. 72. P. 577-581.

42. Van Rijn P. J. The nitration of 2:4: 6-trimethylpyridine (collidine) // *Rec. trav. chim.* 1926. V. 45. P. 267-270.
43. Hands A.R., Katritzky A.R. N-oxides and related compounds. Part XI. Mononitration of 2-, 3-, and 4-phenyl- and 2- and 4-benzyl-pyridine 1-oxide// *J. Chem. Soc.* 1958. P. 1754-1762.
44. Фаляхов И.Ф., Гильманов Р.З., Шарнин Г.П. Поведение производных пиридина в реакции нитрования // *Рос. Хим. журн. им. Менделеева.* 1972. Т. XVI. Вып. 2. С.24-33.
45. Chichibabin A.E. Nitration of 2-Aminopyridine // *J. Russ. Phys. Chem. Soc.* 1914. V. 46. P. 1236-1244.
46. Chichibabin A.E., Bylinkin I.G. Nitration of 2-Aminopyridine, III // *J. Russ. Phys. Chem. Soc.* 1918. V.50. P. 471.
47. Chichibabin A.E. and Rasorenov B.A. Nitration of 2-Aminopyridine, II // *J. Russ. Phys. Chem. Soc.* 1915. V. 47. P. 1286-1296.
48. Pino L.N., Zehring W.S. Preparation of Pure 2-Aminonitropyridines and 2-Aminonitropicolines. Rapid Separations by Sublimation // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. V. 77. P. 3154-3155.
49. Phillips M.A. The condensation of halogeno-pyridines, -quinolines, and -isoquinolines with sulphanilamide // *J. Chem. Soc.* 1941. P. 9-15.
50. Korte F. Synthese purinähnlicher Heterocyclen // *Ber.* 1952. V. 85. P. 1012-1022.
51. Chichibabin A.E. and Kirsanov A.W. α , β' -Diamino-pyridin und α , β -Diamino-pyridin // *Ber.* 1927. V. 60. P. 766.
52. Chichibabin A.E. Über das α -Amino- β -picolin und über das Dinitro- α -aminopyridin. Hrn. C. Rāth zur Erwiderung // *Ber.* 1925. V. 58. P. 1707-1708.
53. Chichibabin A.E., Kirsanov A.W. Über Nitroderivate von methylierten Formen des α -Amino-pyridins (II. Mitteilung) // *Ber.* 1928. V. 61. P. 1223-1235.
54. Chichibabin A.E., Knunjanz I.L. α -Dimethylamino-pyridin und seine Derivate // *Ber.* 1928. V. 61. P. 427-434.

55. Chichibabin A.E., Knunjanz I.L. Über Nitrierungsprodukte des α -Dimethylamino-pyridins // Ber. 1929. V. 62. P. 3053-3054.
56. Chichibabin A.E., Konowalowa R.A. Über Nitroderivate von methylierten Formen des α -Amino-pyridins // Ber. 1925. V. 58. P. 1712-1717.
57. Чичибабин А.Е., Видонова М.С. Действие натрийаида на альдегидколлидин // ЖРФХО. 1921. Т. 53. С. 238.
58. Chichibabin A.E., Kirsanov A.W. Nitramine der Pyridin-Reihe: β -Nitraminopyridin // Ber. 1927. V. 60. P. 2433-2438.
59. Lewiska K. O pewnych nitroaminopirydynach // Roczn. Chem. 1965. V. 39. P. 643.
60. Koenigs E., Kinne G., Weiss W. Über die Diazotierung und Nitrierung des γ -Amino-pyridins // Ber. 1924. V. 57. P. 1172-1178.
61. Koenigs E., Miels M., Gurlt H. Nitrierungsprodukte des γ -Amino-pyridins // Ber. 1924. V. 57. P. 1179-1187.
62. Chichibabin A.E. and Preobrashensky W.A. Di- α -pyridylamin und seine Nitroderivate // Ber. 1928. V. 61. P. 199-206.
63. Koenigs E., Jung G. Über das 4,4' - Dipyridyl-amin und seine Derivate // J. Prakt. Chem. 1933. V. 137. P. 141-156.
64. Jones W.D., Jenkins G.L., Christian J.E. The synthesis of pyridine derivatives possessing possible emetic and rodenticidal activity // J. Am. Pharm. Assoc. 1949. V. 38. P. 70-72.
65. Чичибабин А.Е., Шапиро С.А. Нитрование α -пиридола // ЖРФХО. 1921. Т. 53. С. 233.
66. Berrie A.H., Newbold G.T., Spring F.S. Some reactions of substituted 2-bromopyridines // J. Chem. Soc. 1952. P. 2042-2046.
67. Takahashi T., Yamamoto Y. Syntheses of Heterocyclic Compounds of Nitrogen // J. Pharm. Soc. Japan. 1949. V. 69. P. 408.
68. Plazek E. Uebereine synthese des 3,5-dinitropyridins // Rec. trav. chim. 1953. V. 72. P. 569-575.

69. Башкир Э.А. 2-Хлор-3,5-динитропиридин. Методы получения химических реактивов и препаратов. М. 1971. Вып. 23. 150 с.
70. А. с. 525309 СССР. Способ получения 2-окси-3,5-динитропиридина / Шарнин Г.П., Фаляхов И.Ф., Гайнутдинов Р.М. (СССР).
71. Pat. U.S. 1,889,303. Nitro- β -hydroxypyridine and nitro- β -hydroxyalkylpyridine and process of preparing them / Wulfe O. заявл. 29.09.1930; опубл. 29.11.1932.
72. Pat. U.S. 1,957,089. Process of preparing nitro- β -hydroxypyridines / Wulfe O. заявл. 17.07.1931; опубл. 01.05.1934.
73. Sepiol J., Tomasik P. Syntheses with aromatic nitramines // Acta chim. 1991. P. 47-55 .
74. Czuba W., Plazek E., Untersuchungen ueber Nitroderivate des Pyridins // Rec. trav. chim. 1958. V. 77. P. 92-96.
75. Weidel H., Murmann E. Zur Kenntniss einiger Nitroverbindungen der Pyridinreihe // Monatsh. f. Chem. 1895. V. 16. P. 749-759.
76. Фаляхов И.Ф., Шарнин Г.П., Гильманов Р.З., Хайрутдинов Ф.Г., Собачкина Т.Н., Князев А.В. Поведение функциональных производных пиридина в реакции нитрования // РХЖ. 1997. Т. XLI. С. 24-33.
77. Crowe W.H. CCLXXV.—The amino-4-pyridones // J. Chem. Soc. 1925. V. 127. P. 2028-2029.
78. Koenigs E., Freter K. Über die Nitrierung des γ -Oxy-pyridins // Ber. 1924. V. 57. P. 1187-1192.
79. Gattermann L., Skita A. Eine Synthese von Pyridin-Derivaten // Ber. 1916. V. 49. P. 494-501.
80. Kogl F., van der Want G. M., Salemink C. A. Über 1-des-aza-adenin (7-amino-1-imidazo(b)pyridin): 1. Mitteilung über des-aza-purin-derivate // Rec. trav. chim. 1948. V. 67. P. 29-44.
81. Wiley R.H., Hartman J.L. Oxidation of Aminopyridines to Nitropyridines // J. Am. Chem. Soc. 1951. V. 73. P. 494.

82. Pat. GB 259,961. A process for the production of -pyridylhydrazine and its derivatives / DEGUSSA. заявл. 10.11.1926; опубл. 02.06.1927.
83. Pat. GB 629,439. A process for the manufacture of 2:3:4-triaminopyridine / Hoffmann La Roche. заявл. 23.09.1947; опубл. 20.09.1949.
84. Pat. CH 260,573 Verfahren zur Herstellung eines Pyridinderivates / Aktiengesellschaft Hoffmann F. заявл. 19.08.1947; опубл. 31.03.1949.
85. Pat. DE 568,549. Verfahren zur Darstellung von 2-Alkoxy-5-nitropyridinen / Dr Erich H. заявл. 12.01.1932; опубл. 21.01.1933.
86. Koenigs E., Gerdes H. C., Sirot A. Über die Nitrierung des 3-Äthoxy-pyridins // Ber. 1928. V. 61. P. 1022-1030.
87. Den Hertog H.J., Combe W.P. Reactivity of 4-nitropyridine-N-oxide: Preparation of 4-substituted derivatives of pyridine-N-oxide and pyridine // Rec. trav. chim. 1951. V.70. P. 581-590.
88. Bernstein J., Stearns B., Shaw E., Lott W.A. II. Derivatives of 2,6-Diaminopyridine¹// J. Am. Chem. Soc. 1947. V. 69. P. 1151-1158.
89. Yoneda F. Syntheses of Hetrocyclic Compounds of Nitrogen. CVII. Syntheses of 3-Hydroxypyridine Derivatives // Yakugaku Zasshi. 1957. V. 77. P. 944.
90. Den Hertog H.J., van Weeren J.W. Nitration of 3,5-diethoxypyridine // Rec. trav. chim. 1948. V. 67. P. 980-982.
91. Plazek E., Sorokowska A., Tolopka I.D. Badania nad nitrowaniem chlorowcopochodnych pirydyny // Roczniki Chem. 1938. V. 18. P. 210-216.
92. De Selms R.C. Unprecedented orientation in the nitration of certain 3-pyridinols // J. Org. Chem. 1968. V. 33. P. 478-480.
93. Ochiai E. Recent Japanese work on the chemistry of pyridine 1-oxide and related compounds // Org. Chem. 1953. V. 18. P. 534-551.
94. Hayashi E. Polarization of Aromatic Heterocyclic Compounds. LXXVIII. Nitration of 4-Hydroxypyridine-N-oxide // J. Pharm. Soc. Japan 1950. V. 70. P. 142-145.

95. Ochiai and Futaki. Polarisation der heterozyklischen Ringe mit aromatischem Charakter. XCVI. Ueber die Nitrierung und die Bromierung des 4-Oxypyridin-N-oxydes // J. Pharm. Soc. Japan 1952. V. 72. P. 274-276.
96. Wieczorek J.S., Plazek E. Untersuchungen über N-Oxyde des 2-Dimethylaminopyridins: (die Nitrierung des N¹-oxyde des 2-Dimethylaminopyridins) // Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 1964. V. 83. P. 249-254.
97. Den Hertog H.J., Henkens C.H., Dilz K. The directive influence of the n-oxide group during the nitration of derivatives of pyridine-n-oxide (II) // Rec. trav. chim. 1953. V. 72. P. 296-300.
98. Den Hertog H.J., Kolder C.R., Combe W.P. The directive influence of the N-oxide group during the nitration of derivatives of pyridine-N-oxide // Rec. trav. chim. 1951. V. 70. P. 591-599.
99. Hamana M., Yoshimura H. Decomposition of 4-Nitropyridine // J. Pharm. Soc. Japan. 1952. V. 72. P. 1051-1054.
100. Kroehnke F., Schaefer H. Die Darstellung des 4-Nitro-pyridins und seine Molekülverbindungen mit Phenolen // Chem. Ber. 1962. V. 95. P. 1098-1103.
101. Talik T., Talik Z. O otrzymywaniu niektorych pochodnych N-tlenku 4-nitropirydyny // Roczn. Chem. 1962. V. 36. P. 539-544.
102. Kirpal A., Bohm W. Über 2-Nitro-pyridin (Vorläufige Mitteilung) // Ber. 1931. V. 64. P. 767.
103. Von Schichk O.V., Binz A., Schulz A. Derivate des 3-Amino-pyridins // Ber. 1936. V. 69. P. 2593-2605.
104. Kirpal A., Bohm W. Über eine neuartige Isomerie in der Pyridin-Reihe (I. Mitteil.) // Ber. 1932. V. 65. P. 680-682.
105. Bambas L.L. Some Chemotherapeutically Active Sulfones. I // J. Am. Chem. Soc. 1945. V. 67. P. 668-670.

106. Shibasaki J., Takahashi T. Syntheses of Heterocyclic Compounds of Nitrogen. (Torizo Takahashi). LXVII Phenyl Pyridyl Ethers. (3) // J. Pharm. Soc. Japan. 1952. V. 72. P. 381-384.
107. Chambers R.D., Hutchinson J., Musgrave W.K.R. Polyfluoroheterocyclic compounds. Part IV. Compounds derived from 4-aminotetrafluoropyridine // J. Chem. Soc. 1965. P. 5040-5045.
108. Pat. BE 660,873. Fluorinated Pyridines / Chambers R.D., Hutchinson J., Musgrave W.K.R. заявл.10.03.1965; опубл. 01.07.1965.
109. Coburn M.D. Oxidation of aminoheterocycles to nitroheterocycles with peroxytrifluoroacetic acid. I. Pyrazoles and pyridines // J. Heterocycl. Chem. 1970. V. 7. P. 455-456.
110. R uth C. Zur Kenntnis des 3-Aminopyridines. X. Mitteilung über Derivate des pyridins von A. Binz und C. Rath II Justus Lieb // Ann. Chem. 1931. V. 486. P. 95-106.
111. Pat. U.S. 1,733,695. Process for the preparing of α -hydrazino- β -nitro-pyridine / Rath C. заявл. 01.02.1926; опубл. 29.10.1929.
112. Baumgarten H.E., Su H. C.-F., Krieger A.L. Dechlorination of Some Chloronitropicolines // J. Am. Chem. Soc. 1954. V. 76 (2). P. 596-599.
113. Brown E.V. Syntheses and Decarboxylation of the Isomeric Nitropyridinecarboxylic Acids // Am. Chem. Soc. 1954. V. 76. P. 3167-3168.
114. Gruber W. Pyridine derivatives: part VI malonations of substituted nitropyridines // Can. J. Chem. 1953. V. 31. P. 1181-1188.
115. Prachayasittikul S., Worachartcheewan A., Lawung R., Ruchirawat S., Prachayasittikul V. Activities of thiotetrahydropyridines as antioxidant and antimicrobial agents // EXCLI Journal. 2009. V. 8. P.107-114.
116. Pelle C.J., Okoro C.O., Wilson T.L., Onubogu U.C., Yoon K.-J., Redda K.K. The Synthesis Of Several N-(Substituted Phenylcarbonylamino)-4-(3-cyclohexenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridines as Potential Anti-Inflam-Matory Agents // Synthetic Communications. 1996. V. 26. P. 2703-2714.

117. Redda K.K., Corleto L.A., Knaus E.E. Syntheses of N-substituted 2(3,4)-pyridylcarboxylic acid hydrazides with analgesic and antiinflammatory activity // *J. Med. Chem.* 1979. V. 22. P. 1079-1082.
118. Bock H., Dammel R. Gasphasen-Reaktionen, 61¹⁾ Cycloalkanimine 2*H*-Azirin, 1-Azetin, 1-Pyrrolin, 1-Piperidein und 3,4,5,6-Tetrahydro-2*H*-azepin: Darstellung und Photoelektronen-Spektren^{2,3)} // *Chem. Ber.* 1987. V. 120. P. 1971-1985.
119. Fukuda Yu., Utimoto K. Preparation of 2,3,4,5-Tetrahydropyridines from 5-Alkynylamines Under the Catalytic Action of Gold (III) Salts // *Synthesis.* 1991. P.975-978.
120. Fry D.P., Fowler C.B., Dieter R.K. Synthesis of Cyclic Imines by Addition of Grignard Reagents to ω -Bromonitriles // *Synlett.* 1994. P. 836-838.
121. Heidt Ph.C., Bergmeier S.C., Pearson W. Synthesis of indolidines by the 1,3-dipolar cycloaddition of azides with methylenecyclopropanes followed by cyclopropylamine rearrangement // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 31. P. 5441-5444.
122. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. Издательство «Мир». 1976. 541 с.
123. Allen F.H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising // *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* 2002. V. B58. P. 380-388.
124. Gilli G., Bellucci F., Ferretti V., Bertolasi V. Evidence for resonance-assisted hydrogen bonding from crystal-structure correlations on the enol form of the beta.-diketone fragment // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 1023-1028.
125. Kleemann A., Engel J., Kutscher B., Reichert D., Eds. *Pharmaceutical Substances.* Thieme: Stuttgart. 1999. 565 p.
126. Watson P.S., Jiang B., Scott B.A Diastereoselective Synthesis of 2,4-Disubstituted Piperidines: Scaffolds for Drug Discovery // *Org. Lett.* 2000. V. 2. P. 3679-3681.

127. Edwards M.W., Daly J.W., Myers C.W. Alkaloids from a Panamanian Poison Frog, *Dendrobates speciosus*: Identification of Pumiliotoxin-A and Allo-pumiliotoxin Class Alkaloids, 3,5-Disubstituted Indolizidines, 5-Substituted 8-Methylindolizidines, and a 2-Methyl-6-nonyl-4-hydroxypiperidine // *J. Nat. Prod.* 1988. V. 51. P. 1188-1197.
128. Proudfoot J.R. Drugs, Leads, and Drug-likeness: an Analysis of some Recently Launched Drugs // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002. V. 12. P. 1647–1650.
129. Hansch C., Leo A., Hoekman D. Exploring QSAR – hydrophobic, electronic and steric constants // Washington DC.: Am. Chem. Soc. 1995. P. 250.
130. Oprea T.I., Davis A.M., Teague S.J., Leeson P.D. Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2001. V. 41. P. 1308–1315.
131. Hann M.M., Leach A.R., Harper G. Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2001. V. 41. P. 856–864.
132. Carr R., Hann M. The Right Road to Drug Discovery? // *Modern Drug Discov.* 2002. P. 45–48.
133. Oprea T.I. Current Trends in Lead Discovery: Are We Looking for the Appropriate Properties? // *J. Comput.-Aided Mol. Design.* 2002. V. 16. N 5–6. P. 325–334.
134. Proudfoot J.R. Drugs, Leads, and Drug-likeness: an Analysis of some Recently Launched Drugs // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002. V. 12. P. 1647–1650.
135. Rishton G.M. Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening // *Drug Discov. Today.* 2003. V. 8. P. 86–96.

136. Teague S.J., Davis A.M., Leeson P.D., Oprea T. The Design of Leadlike Combinatorial Libraries // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1999. V. 38. P. 3743–3748.
137. Kelder J., Grootenhuis P.D., Bayada D.M., Delbressine L.P., Ploemen J.P. Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs // *Pharm. Res.* 1999. V. 16. P. 1514–1519.
138. Bergstrom C.A.S., Strafford M., Lazorova L., Avdeef A., Luthman K., Artursson P. Absorption Classification of Oral Drugs Based on Molecular Surface Properties // *J. Med. Chem.* 2003. V. 46. P. 558–570.
139. Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.-Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates // *J. Med. Chem.* 2002. V. 45. P. 2615–2623.
140. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 1997. V. 23. P. 3-25.
141. Pat. US2004/116466 A1. Phenyl-aza-benzimidazole compounds for modulating IgE and inhibiting cellular proliferation / Sircar J.C., Thomas R.J.; Richards M.L., Sinha A. заявл. 12.09.2003; опубл. 17.07.2004.
142. Nudelman N. S., Cerdeira S. B. ^1H and ^{13}C NMR studies of substituted nitropyridines and nitrobenzenes // *Magnetic Resonance in Chemistry.* 1986. V. 24. P. 507 - 511.
143. Вайсбергер А., Проскуэр Э., Риддик Дж., Тупс Э. Органические растворители. М.: ИЛ. 1958. 518 с.
144. Sheldrick G.M. A short history of SHELX // *Acta Cryst. A.* 2008. V. 64. P. 112-122.