

МАМАТОВ ЖЕКШЕН КАСЕНОВИЧ

**СИНТЕЗ И ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ 3-МЕТИЛКСАНТИНА**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Самара 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор **Халиуллин Феркат Адельзянович**

Официальные оппоненты:

Пурьгин Петр Петрович – доктор химических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С. П. Королева», кафедра неорганической химии, профессор кафедры.

Курегян Анна Гургеновна – доктор фармацевтических наук, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, профессор кафедры.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Пермская государственная фармацевтическая академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пермь.

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в __.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443079, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте организации (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2021/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В мировой фармацевтической практике одним из ведущих направлений в поиске новых фармакологически активных соединений для создания эффективных и безопасных лекарственных средств является химическая модификация известных природных биологически активных веществ [Amirkia V., 2014]. Одним из таких объектов с широким спектром фармакологического действия являются природные метилксантины – неспецифические ингибиторы фосфодиэстераз и антагонисты аденозиновых рецепторов, обладающие кардиотоническим, бронхолитическим, диуретическим и психостимулирующим действием [Ashihara H., 2008; Baraldi P., 2007]. Метилксантины представляют собой природные гетероциклические соединения, найденные в природных компонентах как растительного, так и животного происхождения. Немаловажно также отметить образование ксантинового бицикла в организме человека как промежуточного продукта при катаболизме пуринового основания-аденина в мочевую кислоту [Monteiro J., 2016].

Интенсивные исследования по разработке и оптимизации известных методик синтеза, направленные на поиск новых фармакологически активных соединений среди производных ксантина, связаны с реакционной способностью молекулярной структуры ксантина в различных реакциях замещения и конденсирования по нескольким положениям. Только по реакциям замещения известны пять типов монозамещения (по 1, 3, 7, 8 положениям, а также по положению 9, учитывая таутомерию, характерную для молекулы ксантина), восемь дизамещений (1, 3; 1, 7; 1, 8; 1, 9; 3, 7; 3, 8; 3, 9; 7, 8) и три типа тризамещения (1, 3, 7; 1, 3, 8; 1, 3, 9) [Szymanska E., 2013; Gulevskaya A., 1991]. Нарастающий интерес к производным ксантина обусловлен не только их реакционной способностью, но и имеющимися данными о фармакологической активности синтезированных соединений. В настоящее время среди производных ксантина известны лекарственные препараты: ксантинола никотинат, кофеин-бензоат натрия, пентоксифиллин, лизофиллин, линаглиптин, истрадефиллин и другие [Машковский М., 2014; Thieme Pharmaceutical Substances, URL: <https://pharmaceutical-substances.thieme.com/ps>].

Актуальным направлением поиска новых биологически активных соединений является синтез производных ксантина, содержащих тиетановые циклы. На сегодняшний день среди производных 1,8-дизамещенных 3-метил-7-тиетанилксантинов найдены соединения, проявляющие антидепрессивную [Шабалина Ю., 2019; Валеева Л., 2016], антикоагуляционную [Тимирханова Г., 2017] и высокую антиагрегационную активность [Самородов А., 2016; Халиуллин Ф., 2010]. Однако тиетансодержащие производные ксантина с изобутильным заместителем в первом положении ксантинового бицикла до сих пор не изучены. Таким образом, из вышеизложенного вытекает актуальность наших исследований, направленных на разработку новых методов синтеза ранее не изученных 8-замещенных тиетансодержащих 1-изобутил-3-метилксантинов и изучение их биологической активности.

Степень разработанности темы. Предпосылки выбора темы исследования непосредственно вытекают из степени разработанности и научно-практических данных, имеющихся в настоящее время в ряду 1,8-дизамещенных 3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, а также N¹, N⁷ и C⁸ замещенных производных 3-метилксантинов.

Синтезированы многочисленные ряды 8-замещенных 1-алкил-3-метил-7-тиетанилксантинов, среди которых запатентованы соединения, проявляющие антидепрессивную [Валеева Л., 2016], дезагрегационную и антиагрегационную активность [Халиуллин Ф., 2010], проводятся клинические испытания 3-метил-8-пиперазино-7-(тиетанил-3)-1-этилксантина гидрохлорида, проявляющего высокую антиагрегационную активность. Известны также

незамещенные по N¹ положению производные тиетансодержащих 2-(3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, обладающие гемореологической активностью [Спасов А., 2010].

Среди синтезированных N¹, N⁷ и C⁸ замещенных 3-метилксантинов в литературе описаны соединения, обладающие антидепрессивной [Partyka A., 2015; Chłóń-Rzepa G., 2016], противовоспалительной [Świerczek A., 2019], анальгетической [Zygmunt M., 2015], антидиабетической [Nivale S., 2009; Baetta R., 2011] и антиоксидантной активностью [Constantin S., 2017; Bhat V., 2001].

Цель научной работы. Разработка методов синтеза новых тиетансодержащих 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, изучение их биологической активности и химико-фармацевтическая характеристика вещества с наиболее выраженной биологической активностью.

Задачи исследования.

1. Разработка методов синтеза 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановый, оксотиетановый и диоксотиетановый циклы.

2. Изучение реакций взаимодействия 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, с аминами. Разработка методов синтеза новых рядов 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановый, оксотиетановый и диоксотиетановый циклы.

3. Изучение реакций 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, с тиогликолевой кислотой. Разработка методов синтеза 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановый, оксотиетановый и диоксотиетановый циклы, и их солей.

4. Изучение физико-химических и спектральных характеристик, установление структуры новых 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы.

5. Оценка антиагрегационной и антиоксидантной активности новых 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы. Прогноз токсических рисков и фармакологических эффектов синтезированных соединений.

6. Химико-фармацевтическая характеристика вещества с наиболее выраженной биологической активностью.

Научная новизна. Реакцией 8-бром-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантина с бромистым изобутилом впервые синтезирован 8-бром-1-изобутил-3-метилксантин, содержащий тиетановый цикл. На основе 8-бром-1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантина разработаны методы получения 8-бром-1-изобутил-3-метил-7-(1-оксотиетанил-3)ксантина и 8-бром-1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотиетанил-3)ксантина окислением в среде ледяной уксусной кислоты пероксидом водорода и калия перманганатом, соответственно.

Впервые изучены реакции взаимодействия 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановый, оксотиетановый и диоксотиетановый циклы, с аминами. Реакции протекают по C⁸ положению с сохранением тиетановых циклов, происходит образование 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)-, 1-изобутил-3-метил-7-(1-оксотиетанил-3)- и 1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотиетанил-3)ксантинов. В реакциях 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, с трисамином вместо ожидаемых 8-трис(оксиметил)метиламинозамещенных получены 8-диметиламинозамещенные 1-изобутил-3-метилксантины, содержащие тиетановые циклы.

Изучены реакции взаимодействия 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановый, оксотиетановый и диоксотиетановый циклы, с тиогликолевой кислотой. При этом тиетановые циклы сохраняются, реакции протекают по C⁸ положению с образованием 2-(1-

изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановый, оксоетиетановый и диоксоетиетановый циклы. На основе синтезированных кислот получены ряды их солей.

Среди впервые синтезированных 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, найдены соединения, проявляющие высокую антиоксидантную активность.

Проведена химико-фармацевтическая характеристика вещества с наиболее выраженной антиоксидантной активностью с применением современных инструментальных методов анализа.

Новизна исследований подтверждена патентом РФ (RU) № 274092600.

Теоретическая и практическая значимость. Изучены результаты (выполнен обзор) основных научно-практических работ по синтезу и биологической активности производных ксантина за последние 20 лет.

Для получения потенциально биологически активных соединений разработаны методы синтеза новых 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановый, оксоетиетановый и диоксоетиетановый циклы. Также разработаны методы синтеза 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановый, оксоетиетановый и диоксоетиетановый циклы, и их солей.

Синтезировано 57 новых соединений. На наличие антиагрегационной и антикоагуляционной активности были исследованы 52 соединения, антиоксидантной активности - 48 соединений. Перспективным направлением по результатам анализа биологической активности определена антиоксидантная активность. В связи с высокой антиоксидантной активностью наиболее значимый интерес представляют вещества: 1-изобутил-3-метил-8-пиперидино-7-(1,1-диоксоетиетанил-3)ксантин, пиперазина ди-(2-[1-изобутил-3-метил-7-(1-оксоетиетанил-3)ксантинил-8-тио]ацетат) и 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксоетиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусная кислота, для которой проведена химико-фармацевтическая характеристика: предложены показатели и методы определения подлинности, примесей и количественного содержания.

Методология и методы исследования. основополагающую методологию диссертации (исследования) составили: совокупность изученных литературных данных отечественных и зарубежных авторов в ряду производных ксантина, в том числе тиетансодержащих 1,8-дизамещенных производных ксантина; методики синтеза тиетансодержащих 8-замещенных производных 1-изобутил-3-метилксантина; установление структуры полученных соединений и оценка результатов их биологических исследований; определение химико-фармацевтических характеристик 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусной кислоты, содержащей диоксоетиетановый цикл.

Экспериментальную работу для получения, выделения и очистки тиетансодержащих 8-замещенных производных 1-изобутил-3-метилксантинов проводили с помощью методов органического синтеза. Строение синтезированных соединений подтверждали методами ИК и ЯМР-спектроскопии. Химико-фармацевтическую характеристику проводили согласно общей фармакопейной статьи «Фармацевтические субстанции». Изучение фармакологической активности синтезированных соединений проводили общеизвестными биологическими методами. Статистическая обработка результатов биологических испытаний проводилась с применением программного обеспечения Statistica 10.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанные методы синтеза 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановый, оксоетиетановый и диоксоетиетановый циклы.

2. Разработанные методы синтеза 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановый, оксотиетановый и диоксотиетановый циклы.

3. Разработанные методы синтеза 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановый, оксотиетановый, диоксотиетановый циклы, и их солей.

4. Установленные на основе спектральных данных структуры 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы.

5. Результаты анализа биологической активности, прогноза токсических рисков и фармакологических эффектов 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы.

6. Результаты химико-фармацевтической характеристики 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты.

Степень достоверности полученных результатов подтверждена данными экспериментальных исследований с использованием современных химических, физико-химических и биологических методов исследования. Строение синтезированных соединений подтверждено с помощью ИК-; ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Для определения биологической активности применялись стандартные утвержденные методики, результаты обрабатывались статистически. Определение подлинности, родственных примесей и количественного содержания 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты проводили с помощью химических реакций, определения температуры плавления, методами ИК, УФ спектроскопии и ВЭЖХ.

Апробация работы. Материалы диссертации обсуждены на III Всероссийской молодежной конференции «Достижения молодых ученых: химические науки» (Уфа, 2018), 83-й Всероссийской конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2018), на V Всероссийской конференции с международным участием по органической химии (Владикавказ, 2018), 84-й Всероссийской конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2019), на II Научной конференции, посвященной 75-летию ИОФХ им. А.Е. Арбузова и Казанского научного центра РАН «Динамические процессы в химии элементоорганических соединений» (Казань, 2020).

Внедрение в практику. Разработанные методы синтеза новых тиетансодержащих 8-замещенных производных 1-изобутил-3-метилксантинов и результаты анализа экспериментальных данных биологической активности используются при проведении научных исследований на кафедрах фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, фармакологии с курсом клинической фармакологии и центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора в диссертационную работу. Автор принимал участие при постановке задач диссертационного исследования, является основным исполнителем экспериментальных работ (проведение синтеза), написания публикаций по теме диссертации. Анализ результатов синтеза, спектральных данных (доказательство структуры соединений), биологических исследований и химико-фармацевтический анализ 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты проведены при непосредственном участии автора.

Связь темы исследования с планом основных научно-исследовательских работ университета. Тема диссертации утверждена Ученым советом фармацевтического факультета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 26.12.2017 года) и связана с планом НИР университета.

Публикации по теме диссертации. Опубликовано 12 научных работ, из которых 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, из которых 1 статья в журнале базы данных Scopus и Web of Science; 1 патент на изобретение, 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 201 стр., состоит из введения; глав: обзор литературы, объекты и методы исследования, синтез и свойства 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы (обсуждение результатов), анализ результатов биологических исследований и химико-фармацевтическая характеристика 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы; заключения; выводов; рекомендаций; списка сокращений; списка литературы и приложений. Работа содержит 34 таблицы, 44 рисунка и 51 схему. Список литературы содержит 181 источник, из которых 109 являются зарубежными публикациями.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы исследования

Методом ТСХ с использованием пластинок «Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ» (Imid ltd.) определяли чистоту синтезированных веществ. Обнаружение пятен проводили в УФ свете (при 254 нм) и с использованием влажной камеры с йодом.

Определение температуры плавления проводили на приборе «Stuart SMP30» (Великобритания). Элементный анализ синтезированных соединений соответствует вычисленным значениям с отклонением не более $\pm 0,4\%$.

Спектры в ИК области сняты на приборе «Инфралюм-ФТ-02» (Россия) с использованием дисков калия бромида. На приборе «Bruker AM-300» (Германия) записаны ^1H ЯМР-спектры с рабочей частотой 300 МГц, на приборе «Bruker AV-500» (Германия) записаны ^1H ЯМР-спектры рабочей частотой 500 МГц и ^{13}C ЯМР-спектры с рабочей частотой 125 МГц. Растворителями служили дейтерированные хлороформ и ДМСО, в качестве внутреннего стандарта использованы сигналы растворителей или тетраметилсилана.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Синтез исходных соединений

В качестве исходных соединений использовали продажный 8-бром-3-метилксантин (**1**), а также эпитиохлоргидрин (**2**) и 8-бром-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантин (**3**), синтезированные по известным методикам.

Алкилированием исходного 8-бром-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантина **3** бромистым изобутилом в ДМФА в присутствии калия гидроксида при температуре $60\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 6 ч синтезировали 8-бром-1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантин (**4**) с выходом 62 % (схема 1).

Окислением соединения **4** пероксидом водорода в ледяной уксусной кислоте получен 8-бром-1-изобутил-3-метил-7-(1-оксотиеетанил-3)ксантин **5** с выходом 83% (схема 1).

Окислением соединения **4** калия перманганатом в ледяной уксусной кислоте синтезирован 8-бром-1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотиеетанил-3)ксантин **6** с выходом 79% (схема 1).

В ЯМР ^1H -спектре соединения **4** регистрируются сигналы протонов изобутильного заместителя в виде дуплета $(\text{CH}_3)_2$ группы при 0,91 м.д. с КССВ 6,7 Гц, мультиплета СН группы при 2,12-2,20 м.д. и дуплета 1- CH_2 группы при 3,89 м.д. с КССВ 7,5 Гц; синглет протонов 3- CH_3

группы при 3,51 м.д.; характерные сигналы протонов тиетанового цикла в виде мультиплетов двух S(CH)₂ групп при 3,26-3,30 м.д. и 4,34-4,38 м.д., а также мультиплета 7-CH группы при 5,94-6,01 м.д. В ЯМР ¹³C-спектре соединения **4** сигналы углеродов изобутильного заместителя регистрируются при 20,06 ((CH₃)₂), 27,12 (CH) и 48,56 м.д. (1-CH₂), тиетанового цикла - при 34,92 (S(CH₂)₂) и 52,97 м.д. (7-CH), наблюдаются также сигналы углеродов 3-метилксантина.

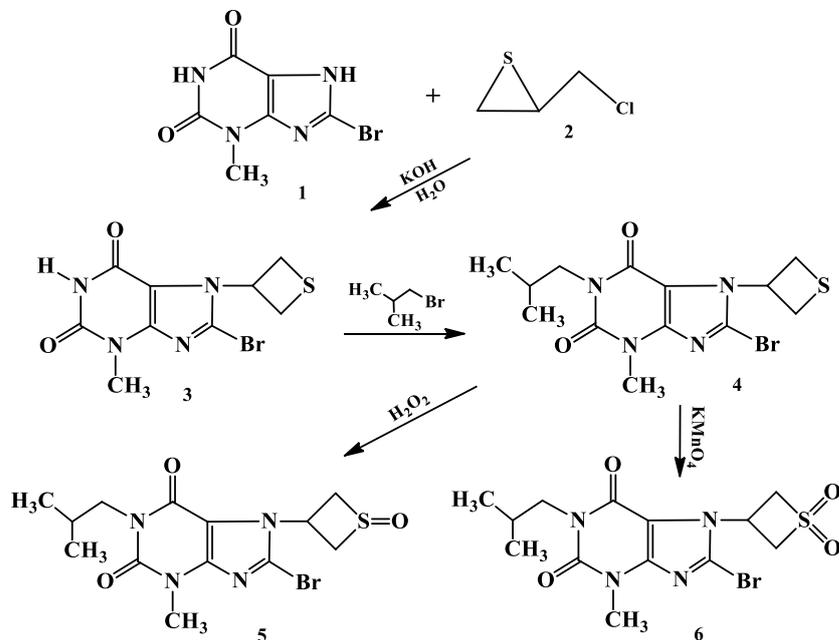


Схема 1

В ЯМР ¹H-спектре соединения **5** смещение мультиплета 7-CH группы в сторону слабых полей на 0,52 м.д. по сравнению с исходным соединением **4** свидетельствует об образовании тиетаноксидного цикла, который существует в виде одного стереически наиболее устойчивого цис-изомера. В спектре ЯМР ¹³C соединения **5** наблюдается смещение сигнала углеродов S(CH₂)₂ группы в сторону слабых полей на 20,37 м.д. по сравнению с соединением **4**.

В ЯМР ¹H-спектре соединения **6** наблюдается смещение мультиплета одной S(CH)₂ группы на 1,09 м.д. в сторону слабых полей, 7-CH группы на 0,36 м.д. в сторону сильных полей по сравнению с исходным соединением **4**. Смещение сигналов углеродов S(CH₂)₂ группы на 35,18 м.д. в сторону слабых полей и 7-CH группы на 12,62 м.д. в сторону сильных полей в спектре ЯМР ¹³C соединения **6** по сравнению с соединением **4** также подтверждает образование тиетандиоксидного цикла.

Строение соединений **4-6** подтверждается также ИК спектрами. В ИК спектре соединения **4** отсутствует поглощение N¹-H связи. В ИК спектре соединения **5** присутствует полоса поглощения валентных колебаний S=O связи при 1049 см⁻¹, в ИК спектре соединения **6** - полосы поглощения валентных колебаний связей SO₂ группы при 1148 и 1323 см⁻¹.

2. Синтез 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы.

Среди продуктов реакций тиетансодержащих 1-алкилзамещенных 8-бром-3-метилксантинов с аминами найдены вещества, проявляющие различную биологическую активность. Однако реакции 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, с аминами до сих пор не изучены.

2.1. Синтез 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановый цикл.

Кипячением соединения **4** с различными циклическими (пиперидин, морфолин, гексаметиленмин) и ациклическими (бензиламин, моноэтаноламин) аминами в этаноле в течение 6-7 ч получены 8-аминозамещенные 1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантины (**7-11**) с выходом 64-83 % (схема 2).

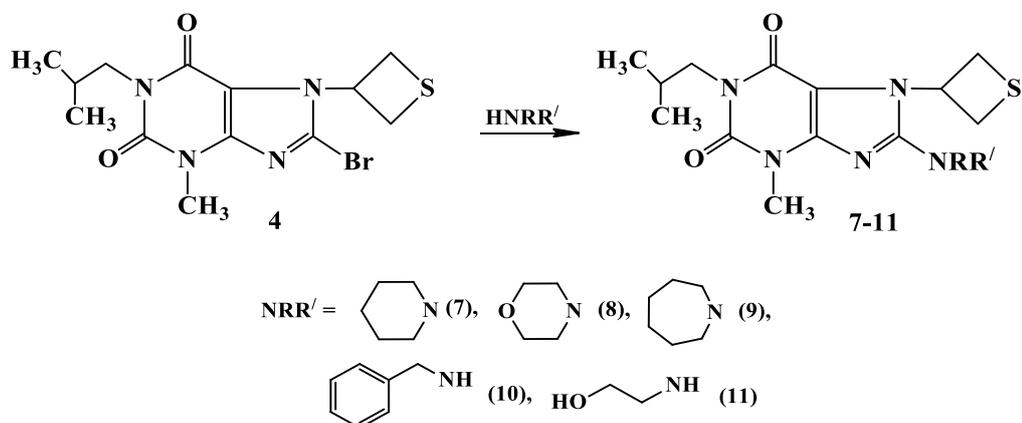


Схема 2

Кипячением соединения **4** с трисамином в ДМФА в течение 1 ч получен 8-диметиламино-1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантин **12** с выходом 46 % (схема 3), что объясняется реакцией ДМФА с трисамином с образованием диметиламина, который замещает атом брома.

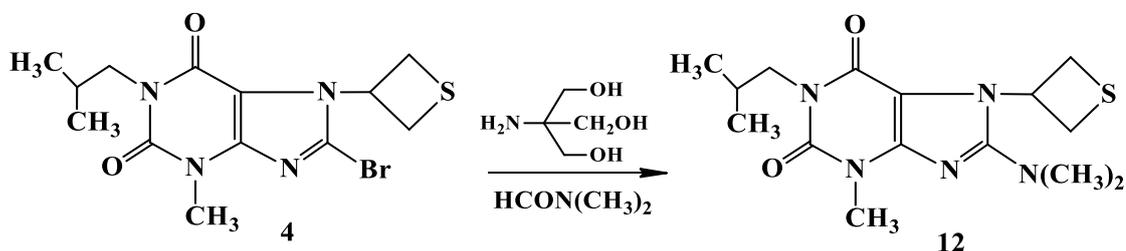


Схема 3

В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C соединений **7-12**, кроме сигналов тиетанового цикла и 1,3-дизамещенного ксантина, регистрируются сигналы остатков аминов. Например, в ЯМР ^1H -спектре соединения **7** регистрируется мультиплет $(\text{CH}_2)_3$ группы при 1,63-1,74 м.д. и триплет $\text{N}(\text{CH}_2)_2$ группы при 3,12 м.д. с КССВ 5,05 Гц. Сигналы углеродов остатка пиперидина в спектре ЯМР ^{13}C регистрируются при 23,95 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$), 25,42 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$) и 52,63 м.д ($\text{N}(\text{CH}_2)_2$).

Строение соединений **7-12** подтверждается также ИК спектрами. Например, в ИК спектре соединения **10** присутствует полоса поглощения валентных колебаний N-H связи в интервале 3230-3380 cm^{-1} , в ИК спектре соединения **11** - широкая полоса поглощения валентных колебаний N-H и O-H связей в интервале 3250-3480 cm^{-1} .

2.2. Синтез 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих оксоетиетановый цикл

Синтез 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метил-7-(1-оксоетиетанил-3)ксантинов (**13-19**) проводили кипячением соединения **5** с пиперидином, морфолином, гексаметиленимином,

бензиламином, циклогексиламином, моноэтаноламином в этаноле в течение 5-8 ч (**13-18**) или с трисамином в ДМФА в течение 1 ч (**19**), выход продуктов составил 10-70 % (схема 4).

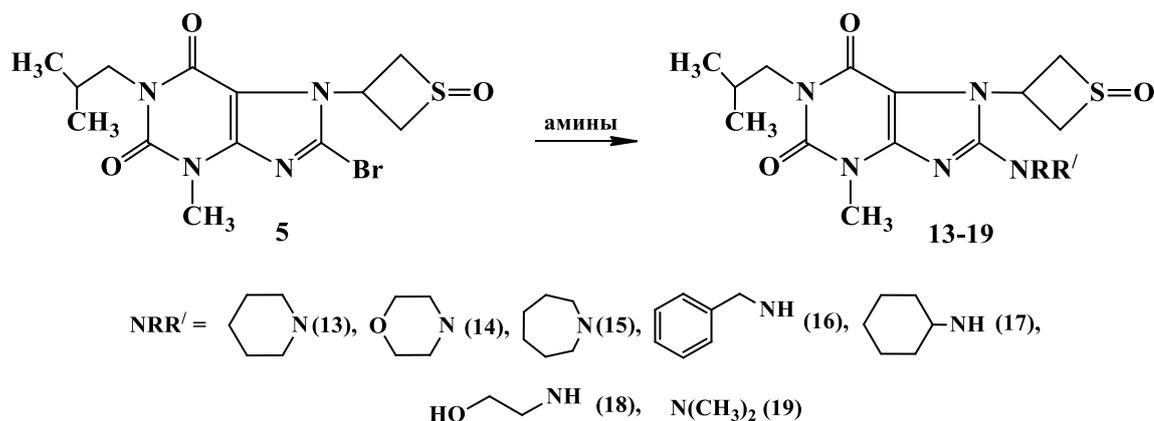


Схема 4

В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C соединений **13-19** содержатся сигналы 1,3-дизамещенного ксантина, оксотетанового цикла и остатков соответствующих аминов. О сохранении оксотетанового цикла свидетельствуют сигналы протонов двух $\text{S}(\text{CH}_2)_2$ групп в виде мультиплетов в интервалах 3,16-3,43 м.д. и 4,02-4,44 м.д., 7- CH группы в интервале 5,97-6,38 м.д. в спектрах ЯМР ^1H , а также сигналы углеродов $\text{S}(\text{CH}_2)_2$ группы около 56 м.д. и 7- CH группы около 50 м.д. в спектрах ЯМР ^{13}C . Оксотетановый цикл существует в виде одного стереически наиболее устойчивого цис-изомера, конфигурация которого сохраняется в реакциях с аминами.

В ИК спектрах соединений **13-19** присутствует полоса поглощения валентных колебаний $\text{S}=\text{O}$ связи около 1063 см^{-1} , что также подтверждает сохранение оксотетанового цикла.

2.3. Синтез 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих диоксотетановый цикл

Синтез 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинов (**20-25**) проводили кипячением соединения **6** с пиперидином, морфолином, гексаметиленимином, бензиламином, моноэтаноламином и трисамином в этаноле до 3,5 ч (**20-24**) или в ДМФА в течение 1 ч (**25**). Выход продуктов составил 39-83 % (схема 5).

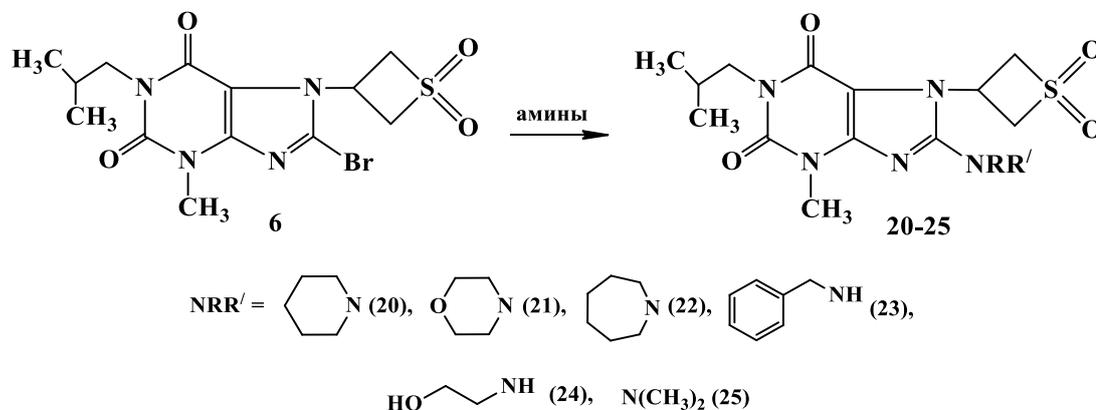


Схема 5

В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C соединениям **20-25** регистрируются сигналы 1,3-дизамещенного ксантина, диоксотетанового цикла и остатков соответствующих аминов. В спектрах ЯМР ^1H

наличие сигналов протонов двух $S(CH)_2$ групп в виде мультиплетов в интервалах 4,19-4,59 м.д. и 4,86-5,21 м.д., а также мультиплета 7-CH группы в интервале 5,05-5,36 м.д. свидетельствует о сохранении диоксотетанового цикла. В спектрах ЯМР ^{13}C сигналы углеродов 7-CH группы и $S(CH_2)_2$ группы регистрируются около 38 м.д. и 70 м.д., соответственно.

В ИК спектрах сохранение диоксотетанового цикла в соединениях **20-25** подтверждается полосами поглощения валентных колебаний связей SO_2 группы около 1140 и 1320 cm^{-1} .

3. Синтез 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановые циклы, и их солей

Среди 1-алкилзамещенных 2-(3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот и их солей, содержащих тиетановые циклы, известны вещества, влияющие на гемостаз. Поэтому синтез ранее не изученных тиетансодержащих 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот и их солей представляет интерес с целью поиска биологически активных веществ.

3.1. Синтез 2-[1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты и ее солей

Кипячением соединения **4** с тиогликолевой кислотой в присутствии калия гидроксида в смеси вода-этанол (объемное соотношение 1:1) в течение 1,5 ч получали 2-[1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусную кислоту **26** с выходом 91 % (схема 6).

В спектре ЯМР 1H кислоты **26**, кроме сигналов протонов тиетанового цикла и алкильных заместителей, регистрируется синглет 8- SCH_2 группы остатка тиогликолевой кислоты при 4,05 м.д. Наличие остатка тиогликолевой кислоты подтверждается также сигналами углеродов 8- SCH_2 группы при 34,86 м.д. и $C=O$ группы при 171,15 м.д. в спектре ЯМР ^{13}C .

В ИК спектре соединения **26** наличие остатка тиогликолевой кислоты подтверждается широкой полосой поглощения валентных колебаний $O-H$ связи в интервале 3000-3320 cm^{-1} .

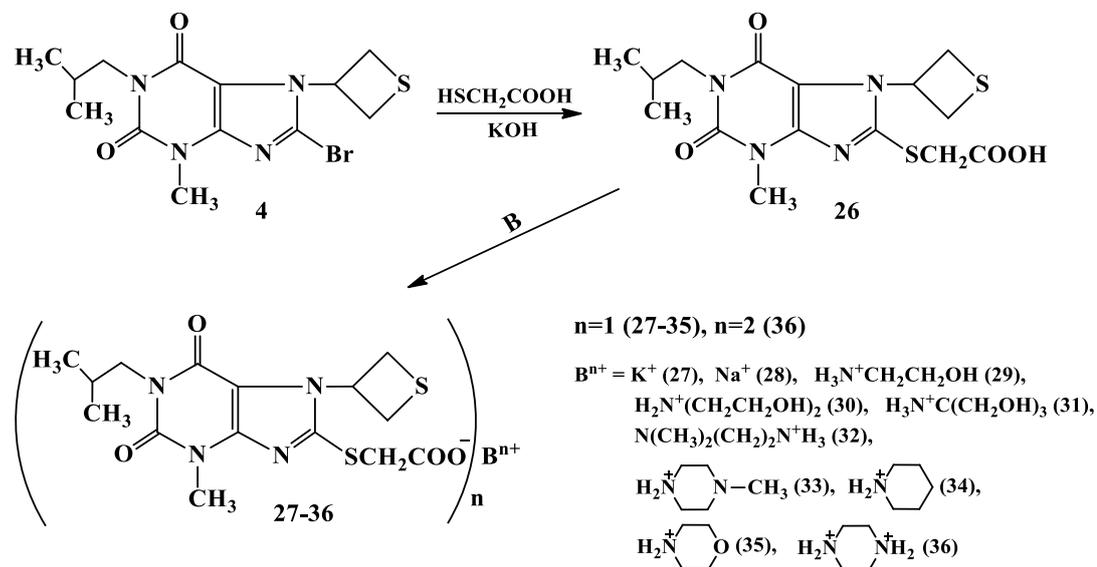


Схема 6

Соли 2-[1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты (**27-35**) получены реакцией соединения **26** с соответствующими основаниями в ацетоне или в диэтиловом эфире (**32**). Взаимодействие кислоты **26** с пиперазина гексагидратом в метаноле

приводит к пиперазина ди-(2-[1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантинил-8-тио]ацетату) (**36**) (схема 6). Выход солей составил 56-84 %.

В спектрах ЯМР ^1H солей **27-36** и в спектрах ЯМР ^{13}C солей **27, 29-32, 34-36**, кроме сигналов протонов остатка кислоты **26**, регистрируются сигналы протонированных аминов. Например, в спектре ЯМР ^1H соли **29** наблюдаются триплеты NCH_2 группы при 2,81 м.д. и OCH_2 группы при 3,55 м.д. с КССВ 4,9 Гц. В спектре ЯМР ^{13}C соли **35** наблюдаются сигналы при 43,11 м.д. и 63,86 м.д., соответствующие углеродам $\text{N}(\text{CH}_2)_2$ и $\text{O}(\text{CH}_2)_2$ групп.

В спектре ЯМР ^1H строение соединения **36**, содержащего два остатка кислоты **26**, подтверждается отношением интенсивностей синглета $\text{N}(\text{CH}_2)_2$ групп при 2,88 м.д. и синглета 8-SCH_2 групп при 3,95 м.д., равным 8:4.

Протонирование NH_2 группы N,N -диметилендиамина подтверждается отсутствием поглощения валентных колебаний непротонированных N-H связей в ИК-спектре, в котором наблюдается поглощение колебаний $\text{N}^+\text{-H}$ связей в интервале $2300\text{-}3100\text{ см}^{-1}$, а также наличием синглета непротонированной $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ группы при 2,13 м.д. в ЯМР ^1H -спектре соли **32**.

Строение солей **25-36** подтверждается также ИК спектрами. Например, в ИК-спектрах калиевой **27** и натриевой **28** солей отсутствует поглощение валентных колебаний O-H связи в интервале $3000\text{-}3320\text{ см}^{-1}$, характерное для кислоты **26**.

3.2. Синтез 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1-оксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты и ее солей

Кипячением соединения **5** с тиогликолевой кислотой в присутствии калия гидроксида в этаноле в течение 1,5 ч с выходом 85% синтезирована 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1-оксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусная кислота (**37**) (схема 7).

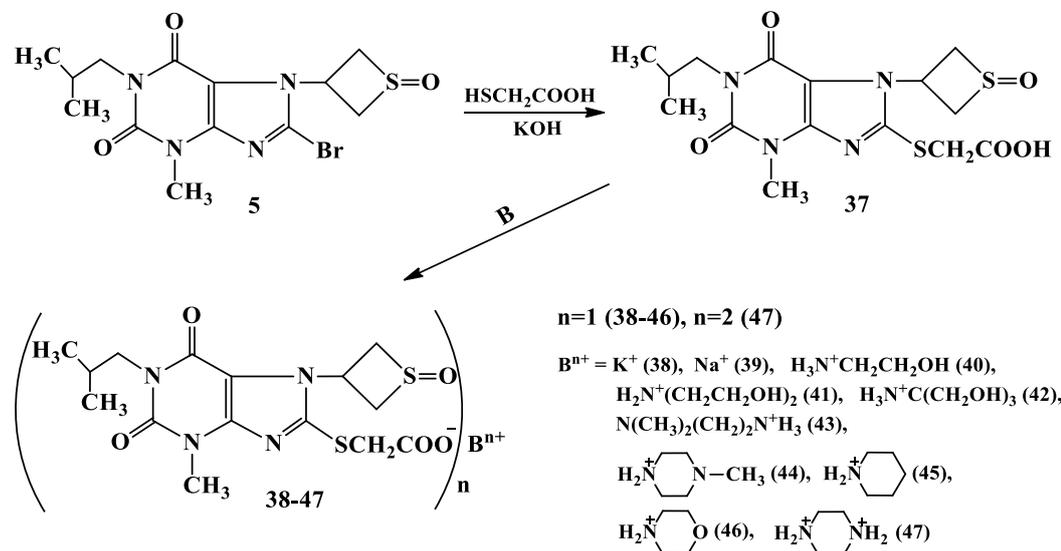


Схема 7

В спектре ЯМР ^1H кислоты **37** наблюдаются синглет 8-SCH_2 группы при 4,14 м.д., сигналы тиетаноксидного цикла и алкильных заместителей. Оксотетановый цикл существует в виде одного стерически наиболее устойчивого цис-изомера, конфигурация которого сохраняется в реакции с тиогликолевой кислотой. В ЯМР ^{13}C -спектре с кислоты **37** сигналы углеродов остатка тиогликолевой кислоты регистрируются при 36,40 м.д. (8-SCH_2) и 170,25 м.д. ($\text{C}=\text{O}$).

В ИК спектре соединения **37** широкая полоса поглощения валентных колебаний О-Н связи в интервале 2260-2800 см^{-1} подтверждает наличие остатка тиогликолевой кислоты, присутствует также полоса поглощения валентных колебаний S=O связи при 1050 см^{-1} .

Реакцией соединения **37** с соответствующими основаниями в диоксане с выходом 53-96 % получены соли 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1-оксотетанил-3)ксантинирил-8-тио]уксусной кислоты (**38-47**). Соединение **47** выделено в виде пиперазина ди-(2-[1-изобутил-3-метил-7-(1-оксотетанил-3)ксантинирил-8-тио]ацетата) (схема 7).

ЯМР ^1H -спектры солей **38-47** содержат сигналы протонов тиетаноксидного цикла, алкильных заместителей, остатка тиогликолевой кислоты, а также сигналы протонированных аминов. Например, в спектре соли **40** регистрируются триплеты NCH_2 группы при 2,82 м.д. и SCH_2 группы при 3,56 м.д. с КССВ 5,15 Гц.

Наличие двух остатков кислоты **37** в структуре соли **47** подтверждается отношением интенсивностей синглета $\text{N}(\text{CH}_2)_2$ групп при 2,89 м.д. и синглета 8- SCH_2 групп при 3,93 м.д., равным 8:4.

Строение солей **38-47** подтверждается также ИК спектрами. Например, в ИК спектрах калиевой **38** и натриевой **39** солей отсутствует полоса поглощения валентных колебаний О-Н связи в интервале 2260-2800 см^{-1} , характерная для кислоты **37**.

3.3. Синтез 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинирил-8-тио]уксусной кислоты и ее солей

Кипячением соединения **6** с тиогликолевой кислотой в присутствии калия гидроксида в смеси вода-этанол (объемное соотношение 1:1) около 1 ч с выходом 91 % получали 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинирил-8-тио]уксусную кислоту (**48**) (схема 8).

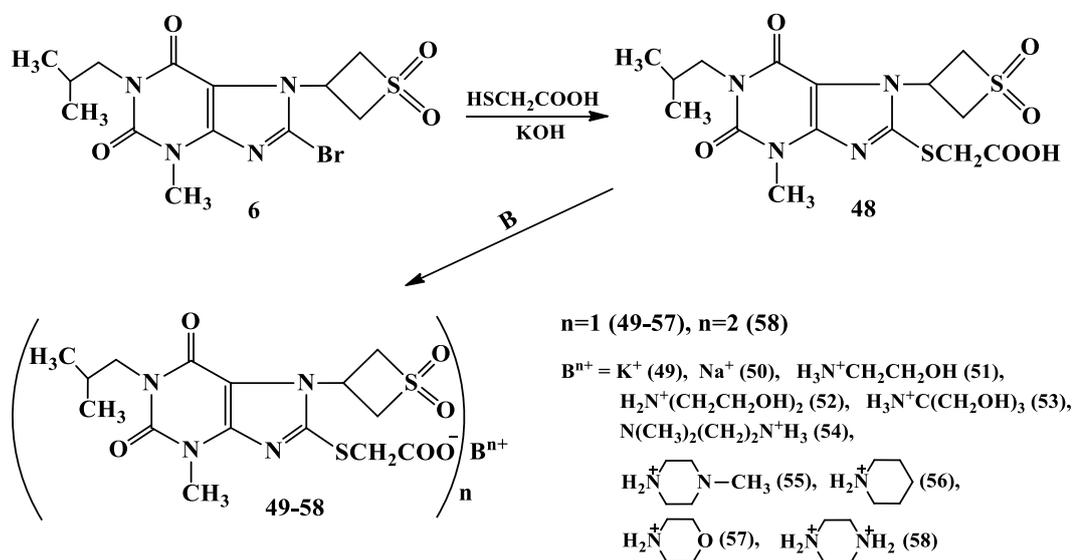


Схема 8

В ЯМР ^1H -спектре кислоты **48**, кроме сигналов протонов тиетандиоксидного цикла и алкильных заместителей, регистрируется синглет протонов 8- SCH_2 группы при 4,09 м.д. В спектре ЯМР ^{13}C кислоты **48** наличие остатка тиогликолевой кислоты подтверждается сигналами углеродов 8- SCH_2 группы при 36,32 м.д. и $\text{C}=\text{O}$ группы при 169,82 м.д.

В ИК спектре соединения **48** остаток тиогликолевой кислоты подтверждается широкой полосой поглощения валентных колебаний О-Н связи в интервале 3100-3400 см^{-1} .

Соли 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты (**49-58**) выделены в ацетоне (**49-51, 53**) или диоксане (**52, 54**) взаимодействием соединения **48** с соответствующими основаниями. Соединение **58** выделено как пиперазина ди-(2-[1-изобутил-3-метил-7-(1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]ацетат) (схема 8). Выход солей составил 69-89 %.

В ЯМР ^1H -спектрах солей **49-58** регистрируются сигналы протонов диоксотетанового цикла, метильного и изобутильного заместителей, остатка тиогликолевой кислоты, а также сигналы протонированных аминов. Например, протоны остатка N,N-диметилэтилендиамина в ЯМР ^1H -спектре соединения **54** регистрируются в виде синглета $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ группы при 2,13 м.д., триплетов NCH_2 группы при 2,39 м.д. и N^+CH_2 группы при 2,81 м.д. с КССВ 6,2 Гц.

В ЯМР ^1H -спектре соединения **58**, наличие двух остатков кислоты **48**, подтверждается отношением интенсивностей синглета $\text{N}(\text{CH}_2)_2$ групп при 2,90 м.д. и синглета 8- SCH_2 групп при 3,94 м.д., равным 8:4.

Строение солей **49-58** подтверждается также ИК спектрами. Например, в ИК спектрах калиевой **49** и натриевой солей **50** отсутствует поглощение валентных колебаний O-H связи в интервале 3100-3400 cm^{-1} , характерное для кислоты **48**.

4. Анализ результатов биологических исследований и химико-фармацевтическая характеристика 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы

В соответствии с поставленными задачами синтезированные 8-замещенные 1-изобутил-3-метилксантины, содержащие тиетановые циклы, были изучены на антиагрегационную и антиоксидантную активность. При определении антиагрегационной активности с целью более полного исследования влияния синтезированных соединений на гемостаз была изучена также их антикоагуляционная активность.

4.1. Антиагрегационная и антикоагуляционная активность

Исследования 52 новых производных ксантина на антиагрегационную и антикоагуляционную активность выполнены на базе ЦНИЛ ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России и ГБУЗ РКБ им. Г.Г. Куватова под руководством д.м.н. Самородова А.В. Исследования проведены в соответствии с рекомендациями "Руководства по доклиническому изучению новых фармакологических веществ".

Влияние синтезированных соединений и препаратов сравнения на агрегацию тромбоцитов изучали по методу Born на агрегометре "АТ-02" (НПФ "Медтех", Россия) *in vitro* в концентрации 2 ммоль/л. Индукторами агрегации тромбоцитов служили аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл и коллаген в концентрации 5 мг/мл (Технология-Стандарт, г. Барнаул, Россия). В качестве препаратов сравнения использовали пентоксифиллин (ОАО «Дальхимфарм», Россия) и ацетилсалициловую кислоту (Фармацевтическая фабрика Шандонг Ксинхуа Фармасьютикал Ко., ЛТД, Китай).

Изучение антикоагуляционной активности проводили клоттинговыми тестами на турбидиметрическом гемокоагулометре Solar GGL 2110 (ЗАО "СОЛАР", Беларусь). Определены показатели: активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), протромбиновое время (ПВ) и концентрация фибриногена по A.Clauss. Исследуемые соединения и препараты сравнения использовали в концентрации 5×10^{-4} г/мл. При определении антикоагуляционной активности препаратом сравнения служил «Гепарин натрия» (ОАО «Синтез», Россия). В работе использовались реактивы производства "Технология-Стандарт" (г. Барнаул, Россия).

Исследования выполнены на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте от 18 до 24 лет.

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (протокол №2 от 17.10.2012). Информированное согласие получено у всех участников исследования.

По результатам биологических исследований на антиагрегационную активность в АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (максимальная амплитуда и скорость агрегации) соединения **8** и **9** в 1,5 раза активнее препарата сравнения – ацетилсалициловой кислоты. При этом соединения **8** и **9** в 10 раз эффективнее ацетилсалициловой кислоты удлиняют латентный период агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном. Однако в данных моделях активность соединений **8** и **9** уступает препарату сравнения пентоксифиллину. Активность на уровне ацетилсалициловой кислоты в АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов проявляют соединения **10, 13, 15, 22, 26, 34, 43, 48**, которые эффективнее ацетилсалициловой кислоты удлиняют латентный период агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном. Соединения **17, 19, 28, 35, 41, 44, 47, 56** в обеих модельных системах агрегации тромбоцитов значительно уступают ацетилсалициловой кислоте. В АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов соединения **11, 38, 40, 58, 59** проявляют проагрегантную активность.

Наибольшую антикоагуляционную активность проявляют соединения **7, 16, 26, 34, 49, 51**, увеличивая АПТВ на 10,3-13,1 % по сравнению с контролем. Однако показатели изученных соединений не превышают значение АПТВ гепарина натрия, которое составляет 20,3 %. Синтезированные соединения не влияли на ПВ и концентрацию фибриногена.

Таким образом, по результатам исследования антиагрегационной активности обнаружены вещества (**8, 9**), проявляющие антиагрегационную активность, превышающую показатели ацетилсалициловой кислоты, при этом уступающую значениям пентоксифиллина. Наибольшую антикоагуляционную активность проявило соединение **7**, удлиняя АПТВ на 13,1 %, уступая показателю гепарина натрия.

4.2. Антиоксидантная активность

Исследование антиоксидантной активности 48 новых производных ксантина проводили на базе ЦНИЛ ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России и ГБУЗ РКБ им. Г.Г. Куватова под руководством д.м.н. Самородова А.В. Антиоксидантную активность синтезированных соединений изучали *in vitro* с использованием экспресс-метода, основанного на регистрации хемилюминесценции, возникающей при взаимодействии свободных радикалов с люминолом.

Исследования были проведены на двух модельных системах: на модельной системе, в которой протекают реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) (модель I) и на модельной системе, генерирующей активные формы кислорода в фагоцитах крови (модель II). Хемилюминесценцию регистрировали в течение 5 минут на приборе «ХЛМ-003» (Россия). Оценивали светосумму свечения (S, у.е.) и максимальную интенсивность свечения (I_{max}, у.е.). Исследуемые соединения и препарат сравнения - аскорбиновую кислоту (субстанция, Хэбэй Вэлком Фармасьютикал Ко. Лтд, Китай) добавляли в конечной концентрации 1×10^{-3} моль/л.

По результатам проведенных исследований большинство соединений, за исключением **27, 29, 43, 52, 54**, уменьшают светосумму свечения и максимальную интенсивность свечения на модели I. Данные показатели свидетельствуют о том, что исследуемые соединения обладают способностью нейтрализовать перекисные липидные радикалы, однако они уступают препарату сравнения - аскорбиновой кислоте. Соединения **27, 29, 52, 54** на модели I проявляют прооксидантную активность, а соединение **43** увеличивает светосумму свечения, но уменьшает максимальную интенсивность свечения.

На модели II аскорбиновая кислота проявляет прооксидантную активность и активирует фагоцитоз. Аналогичный эффект оказывают соединения **52, 53, 54, 56**. Соединение **52** по медиане

светосуммы свечения превосходит препарат сравнения - аскорбиновую кислоту на 14 %, уступая по максимальной интенсивности свечения на 34 %. Остальные соединения оказывают антиоксидантную активность. Соединения **20, 47, 48, 59** на данной модели проявляют наиболее высокую антиоксидантную активность и ингибируют активность фагоцитов на 84,7-91,7 % по светосумме свечения и на 84,5-93,4 % по максимальной интенсивности свечения.

Таким образом, большинство синтезированных соединений на модельной системе ПОЛ (модель I) оказывают антиоксидантную активность, уступая аскорбиновой кислоте. Однако соединения **20, 47, 48, 59** на модельной системе, генерирующей активные формы кислорода в фагоцитах крови (модель II), в отличие от аскорбиновой кислоты оказывают ингибирующий эффект на генерацию активных форм кислорода фагоцитами, что стимулирует их дальнейшее биологическое исследование как антиоксидантных веществ.

Особый интерес представляет 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусная кислота **48**, проявляющая высокую антиоксидантную активность, производное которой – соединение **52** проявляет высокую прооксидантную активность. Соединение **48** было выбрано для изучения его химико-фармацевтических характеристик.

4.3. Прогноз потенциальной биологической активности и токсических рисков

Проведенный с помощью программы PASS-online прогноз фармакологических эффектов исходных 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы (**4-6**), 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы (**7-25**), и 2-(3-метилксантин-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановые циклы (**26, 37, 48**), показывает высокую вероятность проявления иммуномодулирующей активности и стимуляции функции почек, а также способности ингибировать АТФазы протеосом и фосфодиэстеразы.

Прогноз токсических рисков и физико-химических параметров синтезированных соединений проводили при помощи программы «Data warrior». Для всех синтезированных соединений не прогнозируются такие токсические риски, как мутагенность, онкогенность, влияние на репродуктивность и раздражающий эффект. Все синтезированные соединения имеют отрицательное значение показателя drug-likeness, что свидетельствует о том, что их молекулы содержат последовательность атомов, не встречающуюся в структуре известных лекарственных средств. Наибольшей новизной структуры обладают соединения **5, 6, 9, 15, 17, 20**, у которых drug-likeness составляет от -5,18 до -7,93.

Все синтезированные соединения обладают коэффициентом распределения (logP) не более 5, числом акцепторов водородной связи не более 10 и числом доноров водородной связи не более 5, что отвечает «правилу пяти Липинского». Молекулярная масса соединений **31, 41, 42, 52-58** незначительно превышает 500. Значение TPSA (показатель биодоступности молекулы) не должен превышать 140. Значения TPSA соединений **4-25, 59, 60** составляют от 69 до 133, данные соединения должны обладать хорошей биодоступностью. Значения TPSA соединений **26-58** составляют 146-166, что говорит об их возможной удовлетворительной биодоступности. Наилучшая биодоступность прогнозируется для соединений **4, 5, 7-10, 12, 13, 15, 19, 59**, у которых TPSA не превышает 100.

4.4. Химико-фармацевтическая характеристика 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты

Для дальнейших фармакологических исследований 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты **48** требуется контроль качества синтезированных партий.

Химико-фармацевтическую характеристику соединения **48** проводили с использованием ОФС «Фармацевтические субстанции», «Растворимость», «Спектрометрия в инфракрасной области», «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области», «Температура плавления», «Потеря в массе при высушивании», «Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах», «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и других, приведенных в ГФ XIV издания; реактивы готовили по ОФС «Реактивы» ГФ XIV издания.

Все синтезированные партии 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты **48** представляют собой белые кристаллические порошки без запаха.

Таблица 1

Растворимость соединения **48**

Растворитель	Растворимость
Диметилформамид	Легко растворимо
Ацетон	Мало растворимо
Ацетонитрил	Мало растворимо
Этанол	Очень мало растворимо (медленно)
Хлороформ	Очень мало растворимо или практически нерастворимо
Вода	Практически нерастворимо

Растворимость соединения **48** определяли в разных растворителях с различной полярностью с целью охвата широкого интервала растворимости (таблица 1).

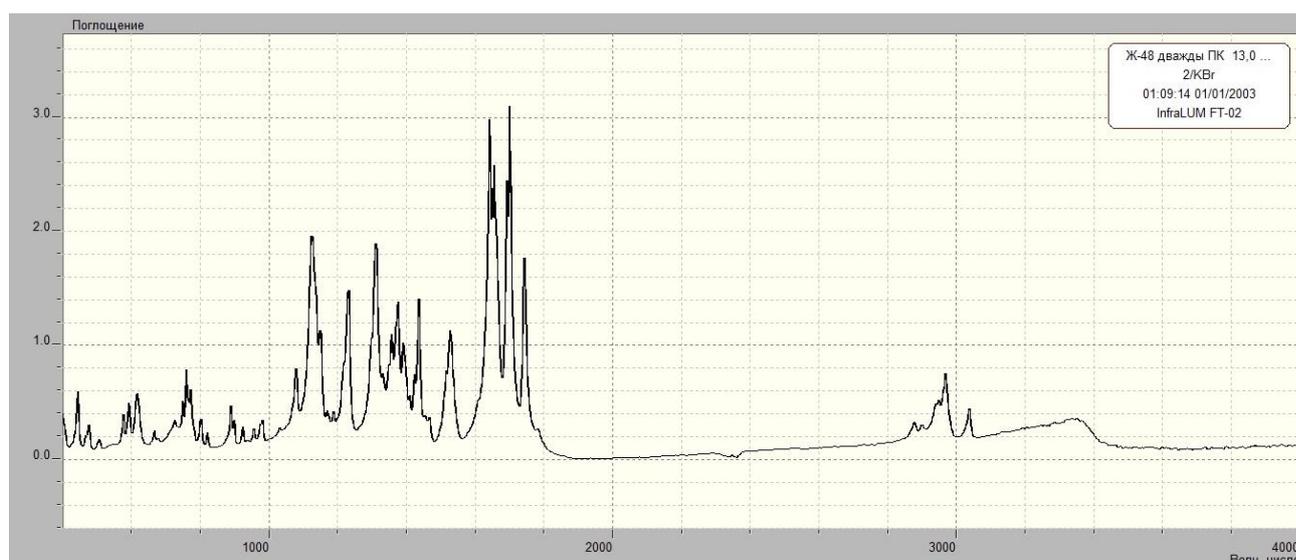


Рисунок 1 - ИК спектр соединения **48**.

В ИК спектрах соединения **48**, снятых в дисках с калия бромидом, регистрируются полосы поглощения валентных колебаний связей SO_2 группы при 1127 см^{-1} и 1312 см^{-1} , $\text{C}=\text{O}$ и $\text{C}=\text{N}$ связей при 1642 , 1701 и 1744 см^{-1} , а также широкая полоса поглощения валентных колебаний $\text{O}-\text{H}$ связи в интервале $3100-3400 \text{ см}^{-1}$ (рисунок 1). В ИК спектрах всех образцов положения и интенсивности полос поглощения идентичны.

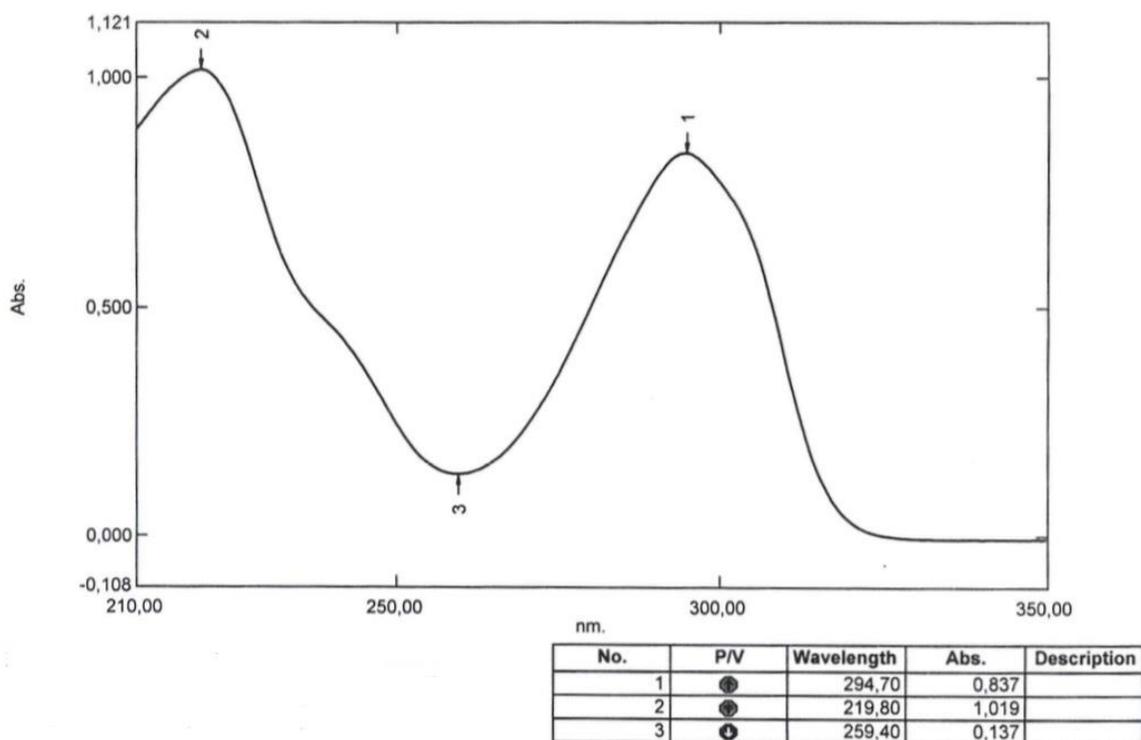


Рисунок 2 - УФ спектр 0,002 % раствора соединения **48** в 95 % этаноле.

Спектры поглощения в УФ области 0,002 % растворов соединения **48** в 95 % этаноле и 0,1 М растворе натрия гидроксида в интервале от 210 нм до 350 нм характеризуются наличием двух максимумов поглощения и одного минимума поглощения. Спектры поглощения в 95 % этаноле более стабильны (рисунок 2). Расхождения в максимумах и минимумах поглощения не превышают $\pm 0,6$ нм (таблица 2).

Таблица 2

Данные УФ спектрофотометрии соединения **48** в 95 % этаноле

Партия	$\lambda \text{ max}_1$, нм	$\lambda \text{ max}_2$, нм	$\lambda \text{ min}$, нм	Интервал значений $\lambda \text{ max}_1$, нм	Интервал значений $\lambda \text{ max}_2$, нм	Интервал значений $\lambda \text{ min}$, нм
1	220,2	295,3	260,1	219,6 \pm 0,6	295,2 \pm 0,6	260,0 \pm 0,5
2	219,3	295,9	260,7			
3	219,8	294,7	259,4			
4	219,5	294,9	259,7			
5	219,1	295,1	259,9			

При проведении мурексидной пробы (общей реакции подлинности производных ксантина) образуется красно-фиолетовое окрашивание.

Наиболее характерной для определения подлинности соединения **48** является реакция с раствором железа (III) хлорида 3 % с предварительной нейтрализацией 0,1 М раствором натрия гидроксида. В результате реакции выпадает светло-коричневый осадок, который растворяется в хлороформном слое.

Таблица 3

Температуры плавления и потеря в массе при высушивании соединения **48**

Партия	Средние значения Т.пл. по результатам трех измерений каждой партии, °С	Интервал значений Т.пл. по результатам измерений всех партий, °С	Потеря в массе при высушивании, %
1	234,7	234,6-235,5	0,12
2	235,3		0,13
3	235,5		0,11
4	234,9		0,10
5	234,6		0,13

По результатам средних значений температуры плавления соединения **48**, вычисленным из трех измерений каждой партии, интервал температуры плавления (капиллярный метод) составляет 234,6-235,5 °С (таблица 3).

По результатам испытаний каждой партии соединения **48** потеря в массе при высушивании (способ 1) составила не более 0,2 % (таблица 3).

С целью обнаружения примесей соединения **48** хроматографирование проводили в разных элюентах. По результатам хроматографирования неочищенного образца оптимальным составом подвижной фазы является смесь ацетонитрила и 0,125 % водного раствора фосфорной кислоты в объемном соотношении 1:3, где кроме пика соединения **48** содержатся пики посторонних примесей около 7 мин (рисунок 3).

Основными потенциальными примесями соединения **48** могут быть исходный 8-бром-1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантин **6** и 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусная кислота (**60**), которая может образоваться в результате элиминирования диоксотетанового цикла.

Синтез кислоты **60** осуществляли в два этапа (схема 9). На первом этапе кипячением соединения **6** в течение 0,5 ч в изопропанол в присутствии алкоголята натрия в результате элиминирования диоксотетанового цикла с выходом 86 % синтезировали промежуточный 8-бром-1-изобутил-3-метилксантин (**59**). На втором этапе реакцией соединения **59** с тиогликолевой кислотой в смеси вода-этанол (объемное соотношение 1:1) в присутствии калия гидроксида при кипячении в течение 1,5 ч с выходом 79 % синтезировали кислоту **60**. Строение соединений **59**, **60** подтверждали ИК, ЯМР ¹H ¹³C-спектрами.

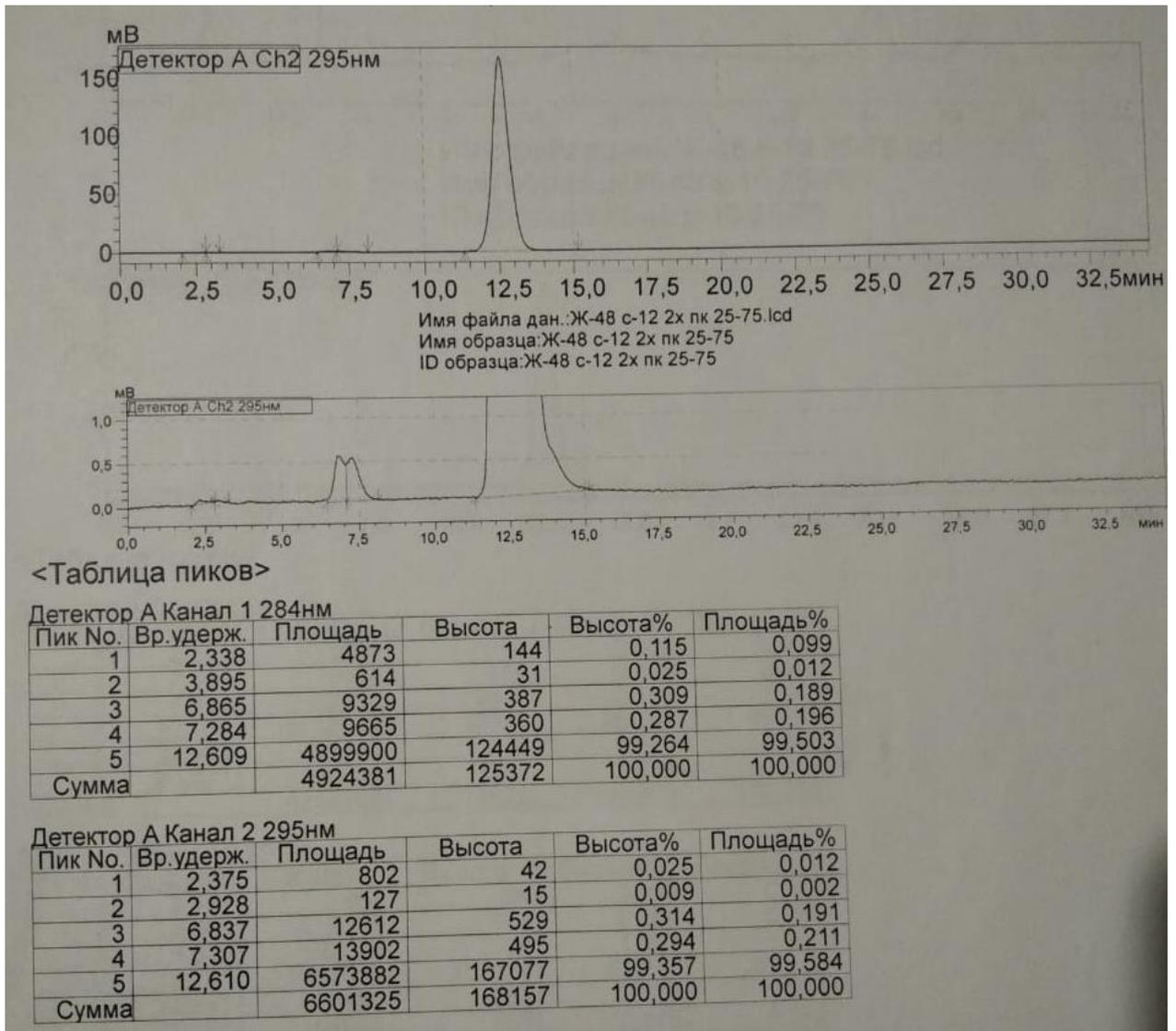


Рисунок 3 - Хроматограмма соединения 48.

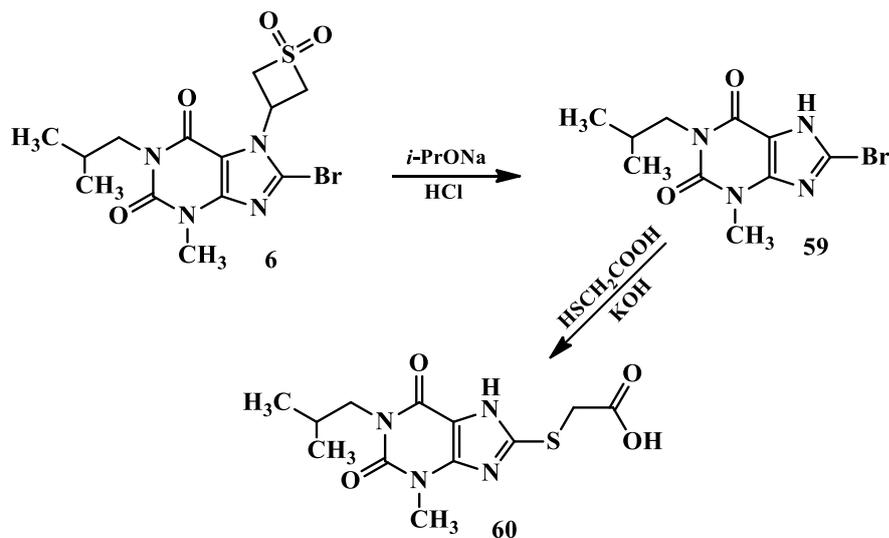


Схема 9

По результатам ВЭЖХ соединений **6** и **60** установлено: 1) примесь исходного соединения **6** отсутствует; 2) время удерживания одного из посторонних пиков, обнаруженных в хроматограмме соединения **48**, совпадает со временем удерживания пика в хроматограмме кислоты **60**. Примесь кислоты **60** контролировали по пределу содержания, предварительно определяли специфичность методики и предел обнаружения примеси. Предел содержания родственной примеси 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусной кислоты **60** предлагается не более 0,1 %.

Предварительные исследования показывают, что хроматографические условия, используемые для определения примеси кислоты **60**, могут быть применены для количественного определения соединения **48**. Рабочий стандартный образец 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты **48** получали 3-кратной перекристаллизацией из этанола.

Таким образом, по результатам химико-фармацевтической характеристики для определения подлинности 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты **48** предлагаем методы: ИК спектроскопии в диске калия бромида, УФ спектроскопии 0,002 % раствора в 95 % этаноле, мурексидную пробу, характерную реакцию с раствором железа (III) хлорида 3% и измерение температуры плавления, а для определения примеси и количественного содержания – метод ВЭЖХ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Алкилированием 8-бром-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантина бромистым изобутилом впервые синтезирован 1-изобутилзамещенный 8-бром-3-метилксантин, содержащий тиетановый цикл. Далее окислением тиетанового цикла получены 8-бром-1-изобутил-3-метилксантины, замещенные в N⁷ положении оксотетановым и диоксотетановым циклом. На основе полученных соединений реакциями нуклеофильного замещения атома брома действием различных аминов синтезированы ряды 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы. Реакцией тиетаносодержащих 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов с тиогликолевой кислотой получены 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусные кислоты, содержащие тиетановые циклы. Взаимодействием синтезированных 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановый, оксотетановый или диоксотетановый циклы, с различными основаниями в среде органических растворителей получены соответствующие водорастворимые соли. Строение синтезированных соединений подтверждено ИК, ЯМР ¹H- и ¹³C-спектрами. По результатам биологических исследований синтезированных соединений выявлены вещества, проявляющие антиагрегационную активность. Высокую антиоксидантную активность в модельной системе генерации активных форм кислорода фагоцитами крови проявила 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусная кислота, для дальнейших фармакологических исследований которой проведена ее химико-фармацевтическая характеристика.

Выводы

1. Реакцией алкилирования 8-бром-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантина бромистым изобутилом разработан метод синтеза 8-бром-1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантина. Окислением 8-бром-1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантина пероксидом водорода и калия перманганатом разработаны методы синтеза 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих оксотетановый и диоксотетановый циклы, соответственно.

2. Установлено, что реакции 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, с аминами протекают по С⁸ положению. Разработаны методы синтеза 8-аминозамещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановый, оксоетиетановый и диоксоетиетановый циклы. В реакциях 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, с трисамином вместо ожидаемых 8-трис(гидроксиметил)-метиламинозамещенных получены 8-диметиламинозамещенные 1-изобутил-3-метилксантины, содержащие тиетановые циклы.

3. Установлено, что реакции 8-бром-1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, с тиогликолевой кислотой протекают с замещением атома брома на остаток тиогликолевой кислоты, при этом тиетановые циклы сохраняются. Разработаны методы синтеза 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановый, оксоетиетановый, диоксоетиетановый циклы, и их солей. Установлено, что пиперазиниевые соли 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановые циклы, имеют два остатка кислоты.

4. Строение 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, подтверждено методами ИК, ЯМР ¹H- и ¹³C-спектроскопии. Установлено, что оксоетиетановый цикл существует в виде одного стерически наиболее устойчивого цис-изомера, конфигурация которого сохраняется при реакциях с аминами и тиогликолевой кислотой.

5. Синтезированные 8-замещенные 1-изобутил-3-метилксантины, содержащие тиетановые циклы, обладают антикоагуляционной, антиагрегационной и антиоксидантной активностью. Для всех синтезированных соединений не прогнозируются такие токсические риски, как мутагенность, онкогенность, влияние на репродуктивность и раздражающий эффект, с большой вероятностью для них прогнозируются иммуномодулирующая активность и стимуляция функции почек, а также способность ингибировать АТФазы протеосом и фосфодиэстеразы.

6. Для 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксоетиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты, проявляющей высокую антиоксидантную активность, проведена химико-фармацевтическая характеристика: предложены показатели и методы определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания. Разработан метод синтеза родственной примеси: 2-(1-изобутил-3-метилксантинил-8-тио)уксусной кислоты.

Рекомендации

Соединения, синтезированные в рамках данной диссертационной работы, а также проведенные биологические исследования имеют практическую значимость при поиске новых биологически активных производных ксантина.

Рекомендуется:

- использовать разработанные методики синтеза 8-замещенных 1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы;
- проводить дальнейшие фармакологические исследования 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксоетиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты, проявляющей высокую антиоксидантную активность;
- использовать результаты химико-фармацевтической характеристики 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксоетиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты для стандартизации ее субстанции.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в дальнейших фармакологических исследованиях *in vivo* на антиоксидантную активность среди 8-замещенных

1-изобутил-3-метилксантинов, содержащих тиетановые циклы, и в продолжении синтеза новых соединений в данном ряду с целью разработки новых лекарственных средств.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Маматов, Ж.К. Синтез 1-бутилзамещенных производных 3-метил-7-(тиетанил-3)ксантина / Ж.К. Маматов, Н.Ж. Амадова, Г.А. Тимирханова // III Всероссийская молодежная конференция «Достижения молодых ученых: химические науки» – Уфа: РИЦ БашГУ, 2018. – С. 175-177.
2. Амадова, Н.Ж. Соли 2-[(1-бутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантинил-8-тио)уксусной кислоты: синтез, физические свойства / Н.Ж. Амадова, Ж.К. Маматов, Г.А. Тимирханова // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2018. – № 3. – С. 982-985.
3. Тиетансодержащие 1-бутилзамещенные ксантины: синтез и биологическая активность / Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, Ф.А. Халиуллин, Ж.К. Маматов [и др.] // V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии. V конференция по химии гетероциклов «Новые направления в химии гетероциклических соединений». – Владикавказ: ИГХТУ, 2018. – С. 482.
4. Амадова, Н.Ж. Прогноз биологической активности солей 2-[(3-метил-7-(тиетанил-3)ксантинил-8-тио)уксусной кислоты, содержащей бутильные заместители / Н.Ж. Амадова, Ж.К. Маматов // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2019. – № 1. – С. 1199-1204.
5. Амадова, Н.Ж. Компьютерный скрининг тиетансодержащих солей 2-(ксантинил-8-тио)уксусной кислоты / Н.Ж. Амадова, Ж.К. Маматов, Г.А. Тимирханова // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2019 – №4. – С. 28-31.
6. Необычная реакция 8-бром-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантинов с трисамином в диметилформамиде / Ю.В. Шабалина, Г.А. Тимирханова, Ж.К. Маматов [и др.] // Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения»: Органическая химия от Марковникова до наших дней. – Красновидово: МГУ, 2020. – С. 197.
7. Синтез и биологическая активность солей 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1-оксотетанил-3)ксантинил-8-тио)уксусной кислоты / Ж.К. Маматов, Г.А. Тимирханова, Л.И. Баширова [и др.] // Медико – фармацевтический журнал «Пульс». – 2020. – №7. – С. 26-38.
8. Синтез, антиагрегационная и антиоксидантная активность солей 2-[(1-изобутил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантин-8-ил)тио]уксусной кислоты / Ф.А. Халиуллин, Ж.К. Маматов, Г.А. Тимирханова [и др.] // Химико – фармацевтический журнал – 2020. – Т. 54, № 9. – С. 9-14.
9. Маматов, Ж.К. Синтез и биологическая активность солей 2-[3-метил-7-(тиетанил-3)ксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих бутильный заместитель / Ж.К. Маматов, Н.Ж. Амадова, Г.А. Тимирханова [и др.] // II Научная конференция, посвященная 75-летию ИОФХ им. А.Е. Арбузова и Казанского научного центра РАН «Динамические процессы в химии элементоорганических соединений». – Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова, 2020. – С. 130.
10. Маматов, Ж.К. Разработка методов определения подлинности 2-[1-изобутил-3-метил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио)уксусной кислоты / Ж.К. Маматов // Медицинский вестник Башкортостана – 2020. - Т. 15, № 6. – С. 51-56.

Патент и свидетельство

11. Пат. 2740926 Российская Федерация, МПК C07D 473/06, A61K 31/522, A61P 39/06 Производные тиетансодержащих 1-бутил-3-метилксантинов, проявляющие антиоксидантную активность [Текст] / Халиуллин Ф.А., Самородов А.В., Маматов Ж.К. [и др.]; заявитель и

патентообладатель БашГМУ. – № 2020129249; заявл. 02.09.2020; опубл. 21.01.2021, Бюл № 3. – 7 с.: ил.

12. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020621890 Российская Федерация. База данных влияния титансодержащих ксантинов на показатели агрегации тромбоцитов и плазменное звено гемостаза / Клен Е.Э., Уразбаев М.А., Небогатова В.А., Маматов Ж.К. [и др.]; патентообладатель БашГМУ. – № 2020621890; заявл. 29.09.2020; опубл. 15.10.2020, Бюл. № 10.