

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»
Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Кафедра _____ Химическая технология и ресурсосбережение _____
(наименование)

18.04.01 Химическая технология

(код и наименование направления подготовки)

Химия и технология продуктов основного органического и нефтехимического синтеза

(направленность (профиль))

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ)

на тему Синтез и разработка принципиальной технологической схемы производства
селективного ингибитора EGFR-киназы SV-350

Студент

В.В. Дуданова

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Научный
руководитель

д.х.н., профессор, Г.И. Остапенко

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

Тольятти 2020

Содержание

Принятые сокращения	4
Введение.....	5
1 Литературный обзор	8
1.1 Перспективы использования производных пиримидина и хиназолина в медицинских целях	8
1.1.1 Пиримидины	8
1.1.2 Хиназолины	11
1.2 Ингибиторы EGFR-киназы.....	12
1.3 Способы получения производных пиримидина.....	15
1.3.1 Синтез цикла из двух компонентов, соединенных через первый и пятый кольцевые атомы	16
1.3.2 Синтез цикла из двух компонентов, соединенных через второй и четвертый кольцевые атомы	18
1.3.3 Синтез цикла из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами 21	
1.3.4 Синтез цикла из трех компонентов	32
1.4 Химические свойства пиримидинов.....	36
1.4.1 Электрофильная атака по атому углерода.....	36
1.4.2 Нуклеофильная атака по атому углерода	38
2 Обсуждение результатов.....	42
2.1 Синтез производных 4-амино-5-цианопиримидина	43
2.2 Биологические испытания	45
2.3 Материальный баланс производства	46

2.3.1	Разработка принципиальной технологической схемы производства 2-(Изопропилсульфонил)-4-(4-фторфенил)-6-(пирролидин-1-ил)пиримидин-5-карбонитрила	62
3	Экспериментальная часть	66
3.1	Реагенты, вспомогательные материалы и оборудование	66
3.2	Подготовка растворителей	66
3.3	Получение исходных соединений	67
3.4	Синтез целевого соединения	69
3.5	Биологические испытания.....	70
3.5.1	Культивирование клеток и исследование цитотоксичности.....	70
	Заключение	71
	Список используемой литературы.	73

Принятые сокращения

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

АТФ	Аденозинтрифосфат
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
CDK	Циклин-зависимая киназа
CML	Хроническая миелогенная лейкемия
ВОР	(Бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфоний гексафторфосфат
DPPB	1,4-бис(дифенилфосфино)бутан
EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста
FdUrd	5-Фтор-29-дезоксиуридин
LiTMP	2,2,6,6-тетраметилпиперидид лития
MAP	Митоген активируемая киназа
MCPBA	Мета-хлоропероксибензойная кислота
MMP	Матричные металлопротеинкиназы
NMP	<i>N</i> -метилпирролидон
PAP	2-Фениламинопиримидин
PDGR	Рецептор фактора роста тромбоцитов
PuBroP	Бромтрипирролидинофосфоний гексафосфат
TMSI	Триметилсилил йодид
TS	Тимидилатсинтаза
VEGF	Фактор роста сосудистого эндотелия
μ W	Микроволновое излучение

Введение

Актуальность и научная значимость настоящего исследования состоит в том, что дерегулирование активности протеинкиназ стало одним из базовых механизмов, с помощью которого опухолевые клетки избегают нормальных физиологических ограничений, связанных с пролиферацией и выживаемостью. Несмотря на то, что на сегодняшний день большинство ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) получило одобрение FDA и для их дальнейшей разработки прилагаются значительные усилия ведущими исследовательскими центрами, лекарственная резистентность стала основным барьером для дальнейшего успеха клинического использования таргетных препаратов, направленных на EGFR-киназу. Таким образом, объектом и предметом исследования являются ингибиторы, направленные на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR).

На данный момент одним из перспективных подходов к разработке подобного рода таргетных соединений является мишень-ориентированный дизайн, базирующийся на понимании пространственного строения белковой молекулы, возможных аминокислотных мутациях активного сайта и конформационной динамики.

Целью настоящей работы является разработка синтетического подхода к получению полифункциональных пиримидинов, содержащих 4-аминопиримидиновый скаффолд.

С момента начала использования лекарственных препаратов на основе пиримидина прошло уже более 90 лет, а данная структура по-прежнему остается актуальной и вызывает большой интерес у многих исследователей. До сих пор ведутся активные поиски новейших, более эффективных и безопасных лекарственных веществ с пиримидиновым скаффолдом. Это объясняется тем, что данный класс соединений обладает широким спектром биологической активности.

Гипотеза исследования состоит в том, что пиримидин используется для создания гербицидов, инсектицидов, фунгицидов, различных биологических добавок, а также взрывчатых веществ, а производные пиримидина служат базовым объектом для получения многих лекарственных препаратов.

Аминопиримидины проявляют противоопухолевые, противовирусные, противовоспалительные и многие другие свойства. Поэтому они активно применяются в качестве исходного сырья для создания необходимо важных лекарственных препаратов, которые помогают при лечении и профилактики сердечнососудистых и воспалительных заболеваний, заболеваний нервной и дыхательной системы, а также диабета и раковых образований.

Для успешной реализации цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать синтетическую методологию получения производных 4-аминопиримидина.
2. Синтезировать целевое соединение в концепции drug like.
3. Исследовать цитотоксичность синтезированного соединения в отношении клеточной линии эпидермоидной карциномы A431.
4. Разработать принципиальную технологическую схему получения 4-аминопиримидина, которая может быть применима для широкого круга производных данной гетеросистемы.

В работе были использованы такие методы, как мишень ориентированный дизайн, методы аналитического исследования вещества, методы биологического исследования вещества.

Научная новизна исследования заключается в:

1. Разработке принципиально нового ингибитора рецептора EGFR.
2. Проведения МТТ-теста на клеточной линии эпидермоидной карциномы A431

3. Разработке технологической схемы полученного соединения.

Личное участие автора в организации и проведении исследования состоит в:

1. Разработке подходов к синтезу производных 4-аминопиримидина.
2. Синтезе целевого соединения в концепции drug like.
3. Исследовании цитотоксичность синтезированного соединения в отношении клеточной линии эпидермоидной карциномы A431.

Апробация и внедрение результатов велась в течении всего исследования. Его результаты опубликованы в журнале «тезисы американского химического общества».

Структура магистерской диссертации. Работа состоит из введения, 3 глав (разделов), заключения, содержит 65 рисунков, 5 таблиц, список использованной литературы (136 источников). Основной текст работы изложен на 86 страницах.

1 Литературный обзор

1.1 Перспективы использования производных пиримидина и хиназолина в медицинских целях

1.1.1 Пиримидины

Существует множество биологически важных производных пиримидина. Наиболее важные из них производные цитозина **1** и урацила **2** в форме их рибонуклеотидов, оротидина **3** уридина **4** цитидина **5**, а в ДНК, в форме дезоксирибонуклеотида встречается тимин **6** (рисунок 1) [1].

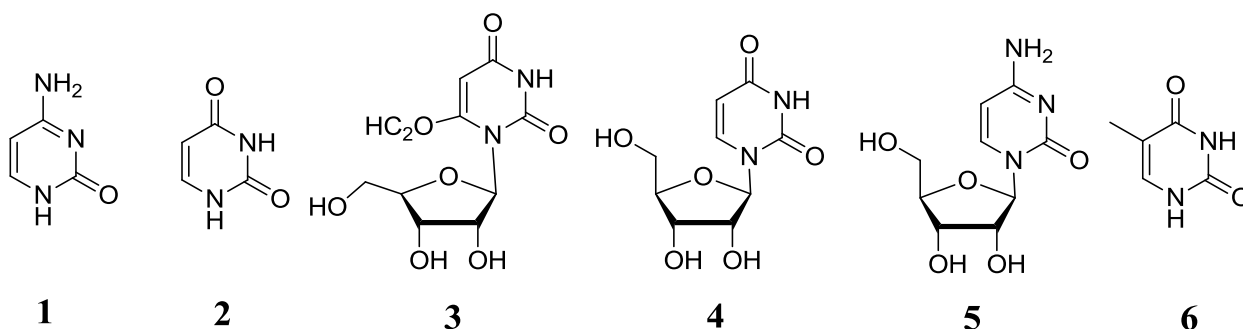


Рисунок 1- Биологически важные производные пиримидина.

Широкие фармацевтические свойства производных пиримидина нашли свое применение в производстве противоопухолевых, противовирусных, антибактериальных и противогрибковых препаратах [2,3,4].

В качестве потенциальных противоопухолевых агентов, за последние годы, были исследованы многие ингибиторы сигнальной трансдукции. Важными примерами таких ингибиторов являются ингибиторы EGFR-киназы, такие как gefitinib **7**, erlotinib **8**, afatinib **9**[2,3,4]. Ингибиторы Auroгакиназы (ARK), такие как VX-680 **10** [5,6], а также ингибиторы VEGF (рецептора фактора роста) pazopanib **11** (рисунок 2) [7].

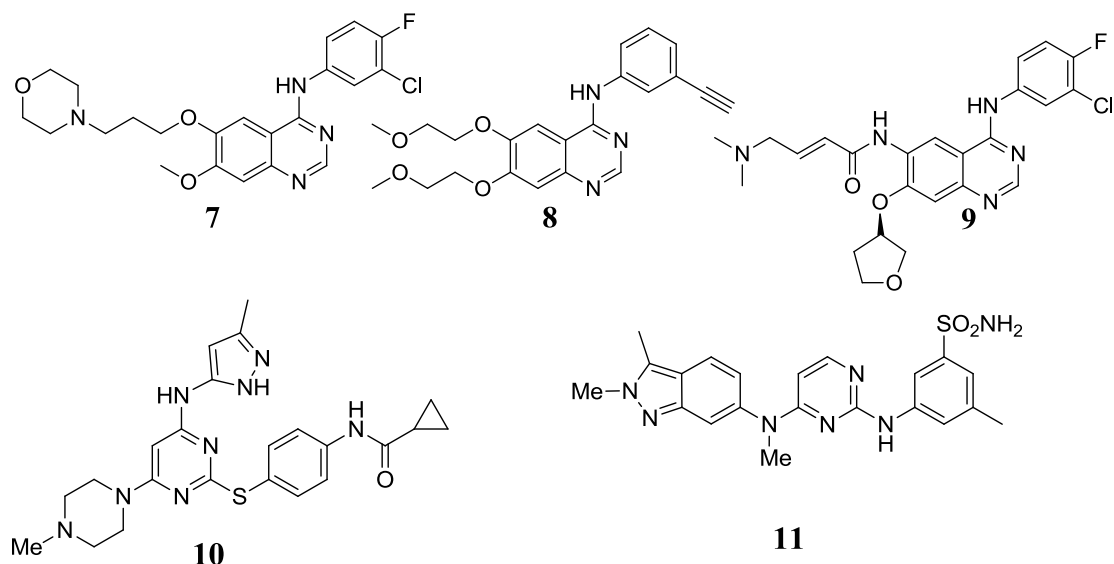


Рисунок 2 – противоопухолевые агенты.

Большинство пиримидиновых противовирусных агентов представляют собой нуклеозидные или нуклеотидные аналоги [8,9,10], такие как 29,39-дидезоксицитидин (ddC, зальцитабин) **12**, 5-йод-29-дезоксисуридин (IDU) **13**, фицитабин (FIAC) **14**, бривудин (BVDU) **15** [11], трифлурид **16** [12], зидовудин (ретровир, AZT) **17** [13], ламивудин **18** (рисунок 3) [14,15] и др.

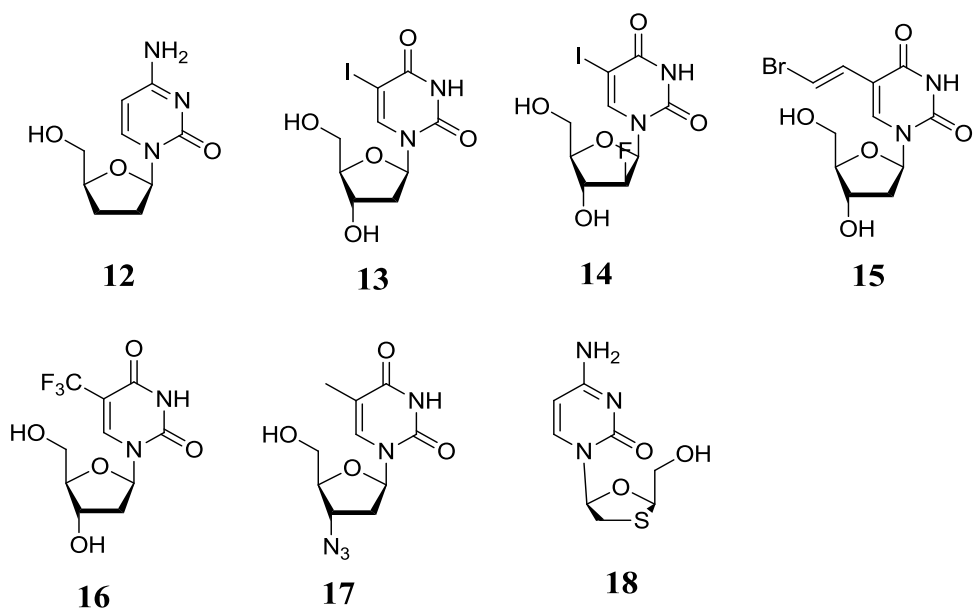


Рисунок 3 – противовирусные агенты.

Диметинопиримидиновое производное триметоприм (ТМП) **19** (R=Me) является селективным ингибитором бактериальной дигидрофолатредуктазы (DHFR), которая является широко консервативной и существенной в бактериальных патогенах [16]. Связанные аналоги включают бродимопроим **19** (R =Br) и тетроксоприм **19** (R=O(CH₂)₂OMe), а также иклаприм (AR-100) (рисунок 4) **20**, который используется клинически в виде рацемической смеси двух энантиомеров [17].

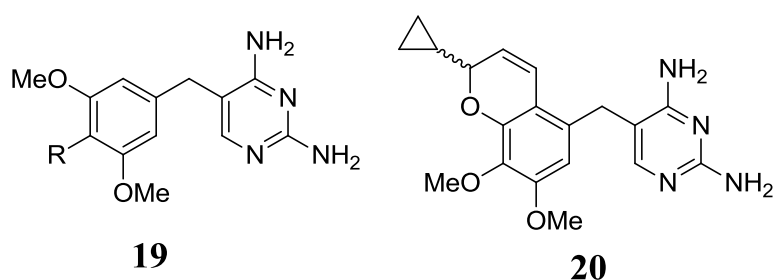


Рисунок 4 – пиримидиновые антибактериальные средства.

2-Фениламинопиримидины (анилинопиримидины) эффективны против множества фитопатогенов, возможно, путем ингибирования биосинтеза метионина [18]. Коммерческие препараты включают пириметанил **21** и опрам **22**, ципродинил **23** и мепапипирим **24** (рисунок 5).

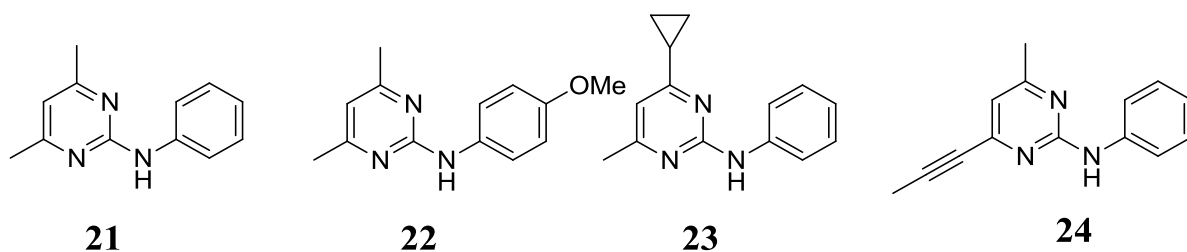


Рисунок 5 - пиримидиновые противогрибковые средства.

1.1.2 Хиназолины

Хиназолиновые производные наравне с производными пиримидина имеют широкие фармацевтические свойства. К таким важным свойствам относится противоопухолевая активность. Так, анилинопроизводные показали высокую активность за АТФ-связывающий сайт нацеленный на тирозинкиназный домен EGFR. Примерами клинически используемых соединений являются гефитиниб **7**, эрлотиниб **8**, афатиниб **9** (рисунок 2). Также в качестве ингибиторов EGFR рассматривают PD 153035 **25** [19,20,21] и PD168393 **26** [22-24], CP-724714 **27** (рисунок 6) и др.

Рецептор VEGF считается еще одной важной мишенью, участвующей в опухолевом ангиогенезе. Клинически исследованными ингибиторами рецептора VEGF являются вандетаниб (Zactima, ZD6474) **28** [25] и кедираниб (AZD 2171) **29** (рисунок 6) [26].

Актуально в настоящее время изучение Аутог-протеинкиназ, так как они играют огромную роль в регуляции митоза. Примерами таких ингибиторов служат ZM447439 **30** [27] и тиазолиламинопроизводное **31** (рисунок 6) [28].

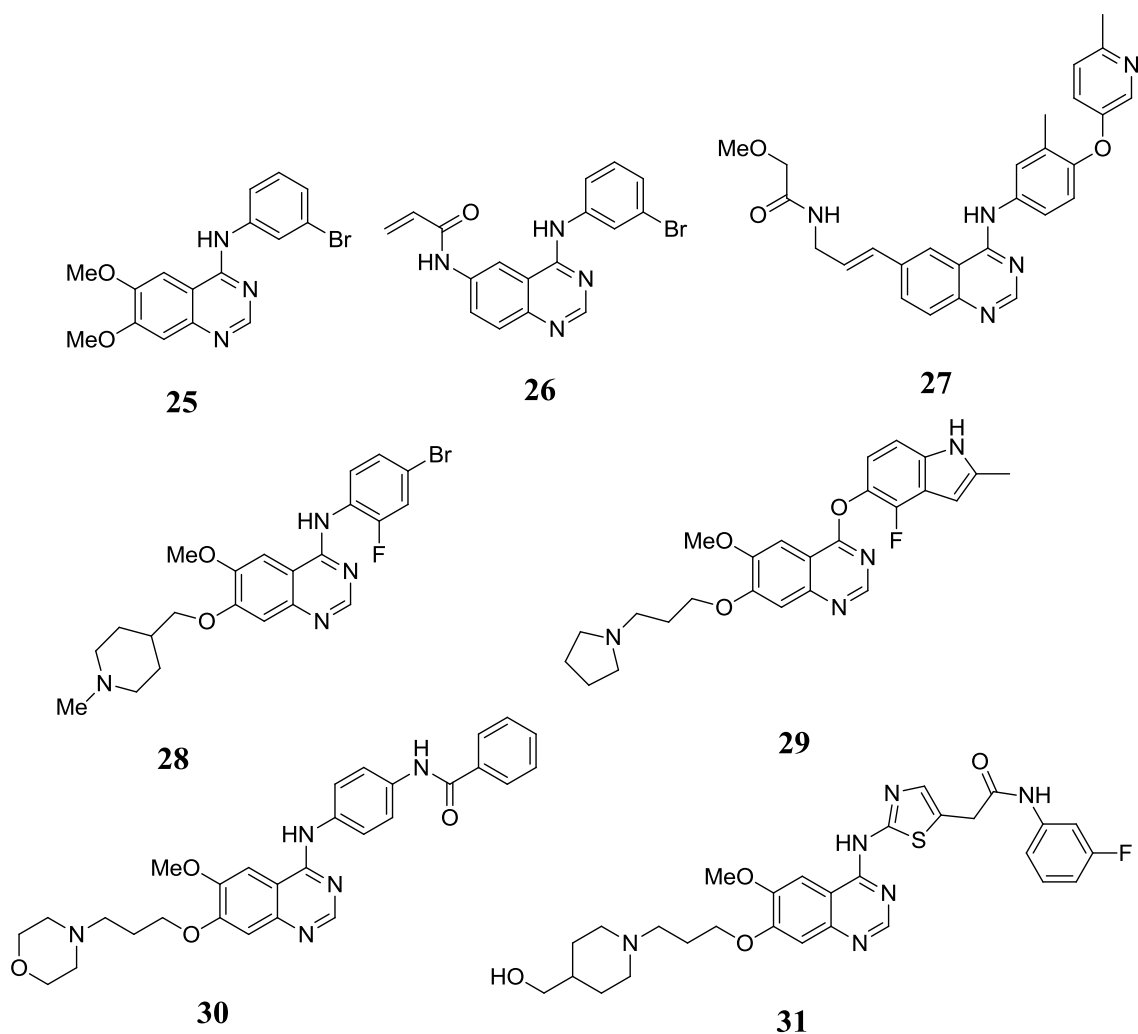


Рисунок 6 – хиназолиновые противоопухолевые препараты.

1.2 Ингибиторы EGFR-киназы

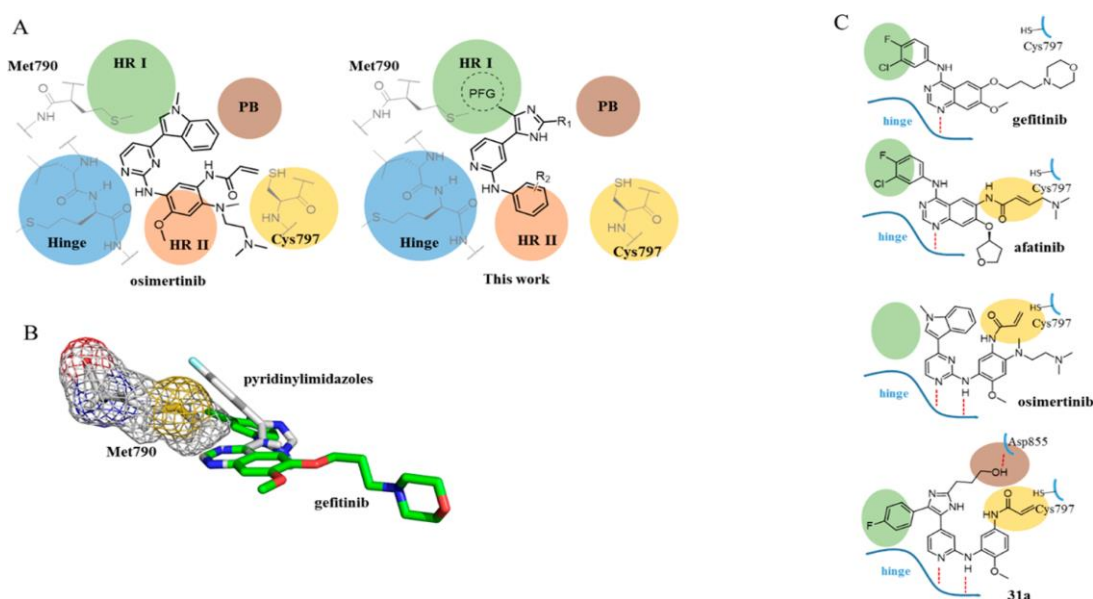
Дерегулированная киназная активность рецептора эпидермального фактора роста отвечает за патогенез немелкоклеточного рака легкого. Ингибирование этого рецептора представляет собой одну из наиболее перспективных стратегий лечения рака легких. Однако, клиническая эффективность при длительном лечении подрывается приобретенной резистентностью к ингибитрам.

Рецептор эпидермального фактора роста является трансмембранным протеином, модулирующим рост клеток, пролиферацию, миграцию и срок

существования клетки [29]. Патологически повышенная активность EGFR тесно связана с ростом и развитием опухолевых клеток, в целом, она является ключевым фактором начала и развития немелкоклеточного рака легкого [30]. Мутации в EGFR-киназе, которые вызывают повышенную каталитическую активность, так называемые активирующие мутации, были идентифицированы как онкогенные факторы для NSCLC [31]. В конечном итоге активирующие мутации приводят к «онкогенной зависимости», что означает, что выживание опухолевых клеток сильно зависит от сигналов EGFR. Таким образом, блокировка сигнализации EGFR с помощью ингибиторов тирозинкиназы, либо моноклональных антител являются главными утвержденными методами для ингибирования клеточного роста в мутациях EGFR-киназы немелкоклеточного рака легких. Некоторые активирующие мутации были идентифицированы у пациентов, однако большинство пациентов имеют точечную мутацию L858R в экзоне 21 и делецию Glu746-Ala750 (d746-750) в экзоне 19 [30,32]. Пациенты, несущие одну из этих активирующих мутаций, в целом хорошо реагируют (50-80%) на терапию первого поколения ингибиторов EGFR (гефитиниб или эрлотиниб) [2,3].

Однако пациенты, которые изначально показали хорошую терапевтическую восприимчивость на терапию тирозин-киназного ингибирования при длительном лечении развивают вторичную лекарственную резистентность. Примерно в 60% случаев у устойчивых пациентов была идентифицирована вторичная соматическая мутация в позиции гейткпера T790M [33-35]. Ингибиторы EGFR первого поколения проявляют низкую ингибирующую активность для этого мутанта, а также для двойного мутанта L858R / T790M, что указывает на то, что эта мутация гейткпера является самой обширной причиной рецидива опухоли у пациентов, которые вначале хорошо отвечали на терапию ингибиторами первого поколения. T790M проявляет в основном два эффекта: значительное увеличение связывания АТФ с этим мутантным белком, а также повышенная

пространственная потребность метионина, по сравнению с треонином, что вызывает стерические столкновения с остатком 3-хлор-4-фторанилина gefитиниба [36]. Большие усилия по преодолению приобретенной резистентности к мутации T790M привели к открытию ингибиторов EGFR второго поколения, таких как афатиниб [4,37]. Эти соединения содержат акриламидные фрагменты в качестве акцепторов Михаэля, которые могут вступать в реакции присоединения Михаэля с тиольной группой некаталитического цистеина (Cys797).



(A) Режим двумерного связывания осимертиниба. HR = гидрофобная область; PB = сайт связывания фосфатов. (B) Разница между двугранным углом gefитиниба и смежно замещенным имидазолом. (C) Ингибиторы EGFR, в сайте связывания АТФ [36].

Рисунок 7. Ингибиторы EGFR первого, второго и третьего поколений и их модели связывания.

Это дополнительное ковалентное взаимодействие восстанавливает ингибирующую активность при увеличении времени пребывания. В доклинических условиях были получены значительные результаты ингибирования. Однако, их клиническая эффективность неудовлетворительна. Ингибиторы EGFR второго поколения являются также

активными ингибиторами EGFR дикого типа [38,39]. Это потребовало идентификации третьего поколения ингибиторов EGFR.

Ингибиторы EGFR третьего поколения, например, осимертиниб, проявили характерную специфичность в отношении резистентных мутантов L858R / T790M и d746-750 / T790M, сохраняя при этом дикий тип и обходя токсичные побочные эффекты и ковалентное алкилирование реакционноспособного цистеина [40,41]. Так как активность ингибиторов EGFR третьего поколения основана только на их ковалентных взаимодействиях с белком, то эти соединения уязвимы для мутации Cys797. Поскольку эта аминокислота не является каталитической и не сохраняется, неудивительно, что появление третичной мутации C797S вызвало новую лекарственную устойчивость [42]. Кроме того, в избирательном ингибировании мутантов с усилением функции по EGFR дикого типа необходимо обойти различные серьезные побочные эффекты.

1.3 Способы получения производных пиримидина

В литературе описано множество способов получения производных пиримидина. В большинстве случаев, атом азота из тиомочевины или мочевины является нуклеофилом для атома углерода. Усиление нуклеофильности азота или электрофильности углерода способствуют циклизации. Синтетически, этот подход обычно используется для синтеза карбоциклических нуклеозидов и других *N*-1-замещенных урацилов **34**. Синтез исходных *N*-ацилирурей **32** достигается реакцией амина с 3-метокси- или 3-этокси-2-пропенилизотиоцианатом **33**. Закрытие кольца, как правило, осуществляют с помощью кислотного катализа (рисунок 8) [43].

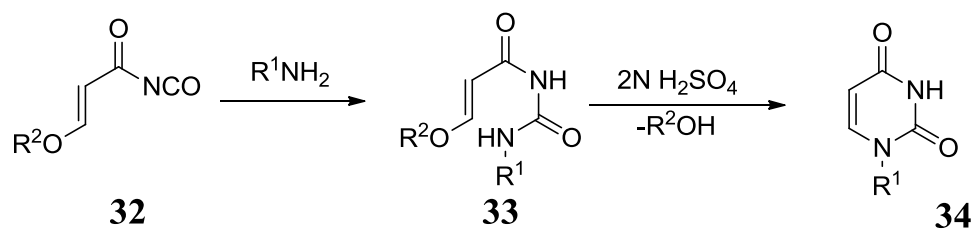


Рисунок 8. Закрытие кольца с помощью кислотного катализа.

1.3.1 Синтез цикла из двух компонентов, соединенных через первый и пятый кольцевые атомы

N-1 или N-3 атом в циклизации

Эта схема синтеза основана на реакции циклизации енамидных эфиров **35** с первичными аминами и триметилалюминием (рисунок 9) [44]. Оксазинон **36**, промежуточный продукт реакции, подвергается открытию цикла и дальнейшей реакции с первичным амином с получением 3-замещенного

3*H*-пиримидин-4-она **37**. Могут быть использованы как первичные ароматические амины, так и алифатические.

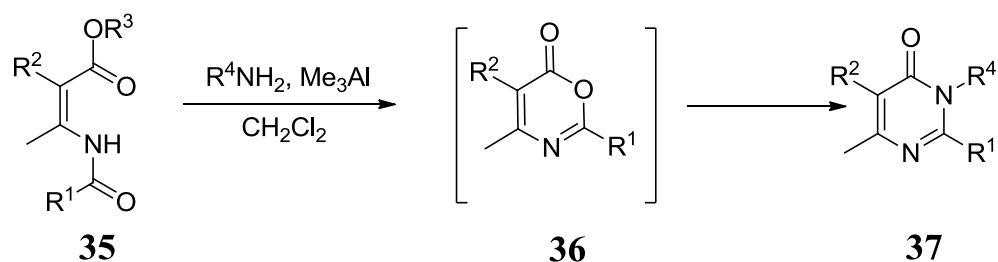


Рисунок 9. Циклизация енамидных эфиров.

C-2 атом в циклизации

Этот подход, как правило, используется для синтеза насыщенных пиримидинов из 1,3-пропандиаминов **38** [45,46]. В подобного рода реакциях

так же участвуют циклические гуанидины, мочевины и тиомочевины [47-51]. Реакцию проводят при микроволновом облучении с использованием различных катализаторов. Например, реакция с мочевиной **39** и оксидом цинка в качестве катализатора дает тетрагидро-2(1*H*)пиримидинон **40** (рисунок 10) [52].

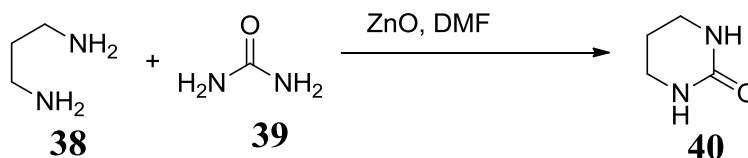


Рисунок 10. Получение пиримидинов методом микроволнового облучения.

А 2-пиримидинетины **42** (рисунок 11) и гуанидины **43** (рисунок 12) были получены реакцией 2-замещенных 1,3-пропандиаминов **41** с дисульфидом углерода и цианидом брома соответственно [53].

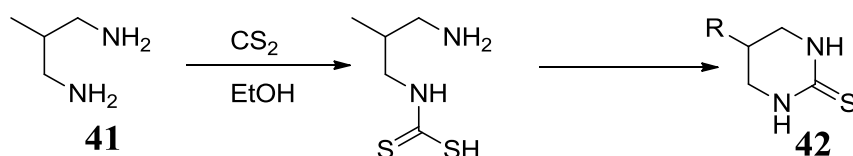


Рисунок 11. Получение насыщенных пиримидинов.

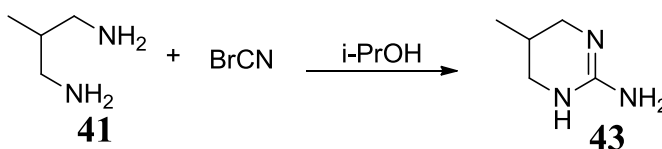


Рисунок 12. Получение насыщенных пиримидинов.

C-4/C-6 атом в циклизации

Довольно специфичным методом синтеза пиримидина является использование веществ, имеющих активный C-4 или C-6 атом в качестве реагентов. Примером может служить синтез 4-арил-2-хлорпиримидина **45** из *N*-циано **44** (рисунок 13), где углерод C-6 поступает из ДМФА через реагент Вильсмейера [54].

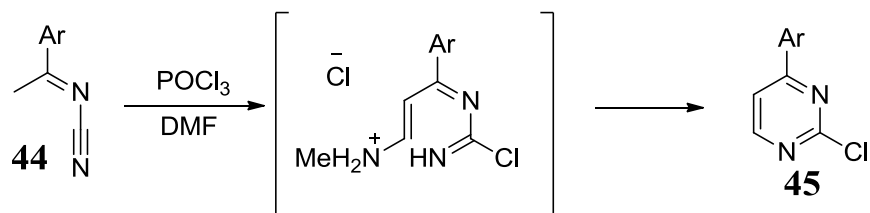


Рисунок 13. C-4/C-6 атом в циклизации

1.3.2 Синтез цикла из двух компонентов, соединенных через второй и четвертый кольцевые атомы

Синтез из компонентов N (2) + C (2)

В этом синтетическом подходе блок с четырьмя атомами представляет собой ненасыщенный β -аминоэфир, α -аминитрил, α -аминоамид или эквивалентную структуру, тогда как двухатомная структура может быть различного вида. В качестве примера может служить образование 2-трихлорметил- и 2-трифторметилпиримидинов **47** путем термической реакции соответствующих нитрилов с аминазобутадиеном **46** (рисунок 14) [55].

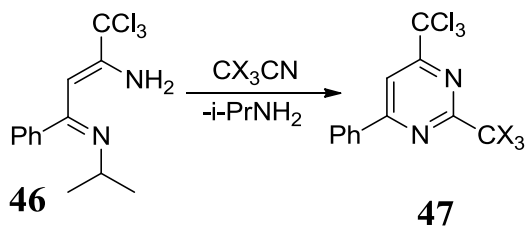


Рисунок 14. Синтез из компонентов N (2) + C (2)

Синтез из компонентов N(3)-C(4)

Данный способ синтеза пиридина включает конденсацию нитрилов с виниламидами, которые активируют хлорпиридином и ангидридом трифторметансульфокислоты. Этот способ иллюстрируется синтезом

4-циклогексил-2,5-дифенилпиридина **50** из *N*-стирилбензамида **48** и циклогексанкарбонитрила **49** (рисунок 15) [56].

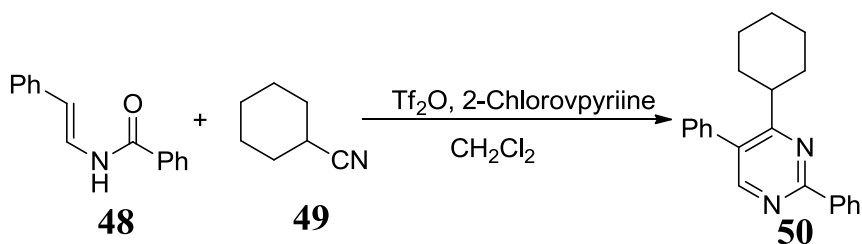


Рисунок 15. Синтез из компонентов N(3)-C(4)

Синтез из компонентов C(4)+C(5)

Циклоприсоединение [4+2] диазобутадиенов **52** и кетенов **51** в настоящее время является хорошо изученным путем получения пиридинонов **53** (рисунок 16) [57].

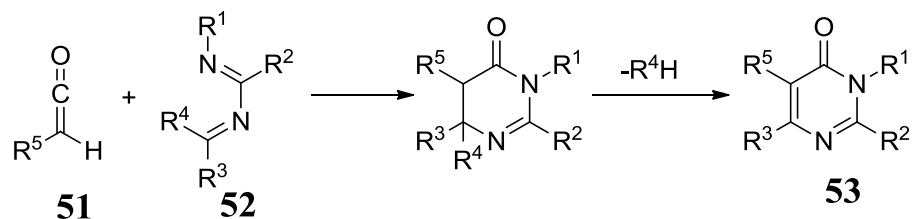


Рисунок 16. Синтез из компонентов C(4)+C(5).

Для получения различных производных пиридина зачастую используют такие универсальные реагенты как *S*-метилаза- и диазadiensые йодиды получаемые при реакции тиоамидов с метилйодидом [58-61]. Например, пиридин-4,5-дикарбоксилаты **56** могут быть получены реакцией диазadiensов **54** с диметилацетилендикарбоксилатом **55** (рисунок 17) [60], а реакция изомерных диазadiensов **57** с кетенами **58** давала 3-замещенные 2-метилтио-4-пиридины **59** (рисунок 18) [58].

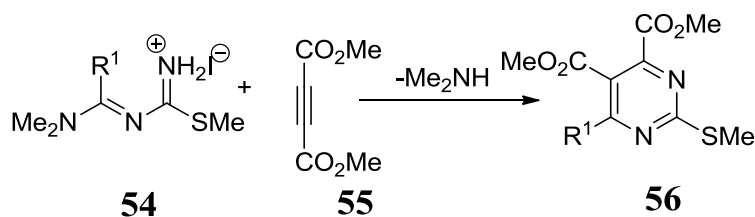


Рисунок 17. Синтез из компонентов C(4)+C(5).

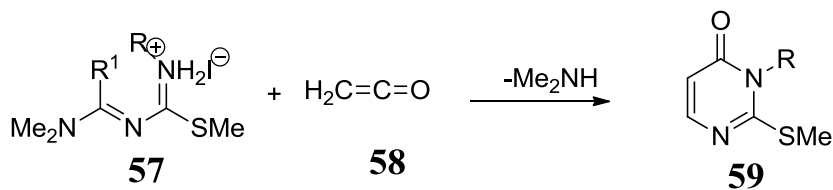


Рисунок 18. Синтез из компонентов C(4)+C(5).

Синтез моноазидаиновой соли **60** с изотиоцианатами **61** дает 1-замещенные 4-метилтио-2-пиримидинтионы **62** (рисунок 19) [61,62], а для получения пиримидинового нуклеозида используют гликозилотиоцианаты. Реакция с арилизоцианатами происходила аналогичным образом с получением 1-арил-4-метилтио-2-пиримидинонов **63**, но с использованием алкилазоцианатов требовалась двухстадийная процедура для получения аналогичных 1-алкил-2-пиримидинонов [61,62].

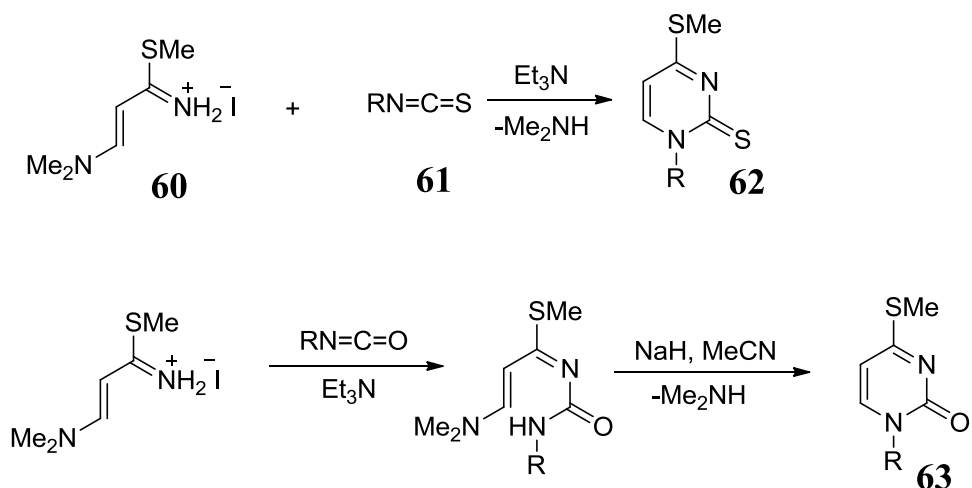


Рисунок 19. Синтез из компонентов C(4)+C(5).

1.3.3 Синтез цикла из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами

Комбинация N(1)-C(2)-N(3) + C(4)-C(5)-C(6)

Традиционно, атомы кольца, в 3-углеродном компоненте относятся к 1,3-дикарбонильному производному, но в последнее время стало более распространено использование алкинилкетонов. Для 1,3-дикарбонильного производного оксогруппа может представлять собой группы альдегидную, кето-, сложноэфирную или эквивалентную, таким как амидная или нитрильная, в любой комбинации. Компонент N(1)-C(2)-N(3) чаще всего

является гуанидином, амидином, тиомочевинной или мочевиной, или же их эквивалентами [63,64].

β -Диальдегиды, α -альдегидокетоны и β -дикетоны

Безусловно, основным путем синтеза пиримидинов **66** является путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами. В последнее время наиболее распространено использование алкинилкетонных, но, так же для этих целей используют дикарбонильные производные. Малональдегид нестабилен и поэтому используется в качестве диацетала тетраметоксипропана **64** в реакции с гидрохлоридами амидинов **65** (рисунок 20) [65].

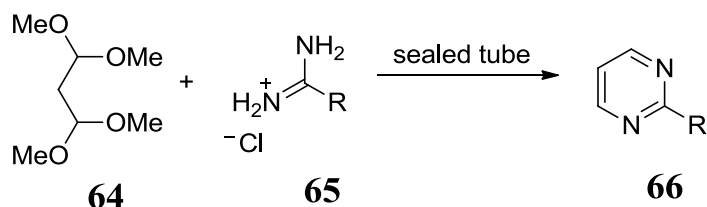


Рисунок 20. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Для получения пиримидинов, замещенных в 5-положении галогенным или гетероатомным заместителем используют малондиальдегиды. 4- и 6-положения у такого пиримидина остаются свободными. Для получения пиримидина замещенного в 4- и 6-положении используют эквивалентные диальдегиды, например 3-алкокси- или 3-аминопролеины. Формильную группу в кетоне обычно маскируют в виде алкоксиметилкетона или в виде аминометилкетона. Обычно используемая процедура включает получение енамина **68** реакцией метилкетона **67** с диметилацеталем в ДМФ и последующей реакцией с амидином или гуанидином с образованием целевого пиримидина **69** (рисунок 20) [66].

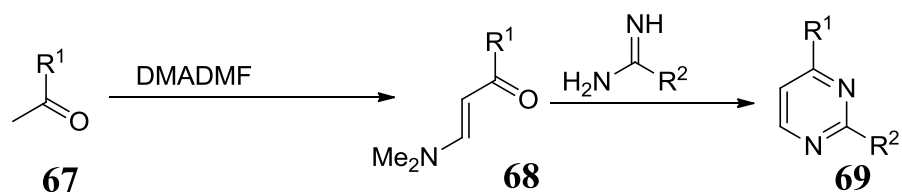


Рисунок 20. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Этот подход использовался для получения биологически важных производных пиримидина, таких как иматиниб и др [67-70]. Так же была разработана реакция диметиламинометиленкетонном идиазабиклоундеценем в качестве основы. Особенно примечателен энаминокетон **70**, где присоединение к твердой подложке осуществляется через аминокетон. Смещение продукта **72** от подложки происходило во время этапа окончательного удаления амина в стратегии, которая позволяла рециркулировать связанный амин **71** (рисунок 21) [71].

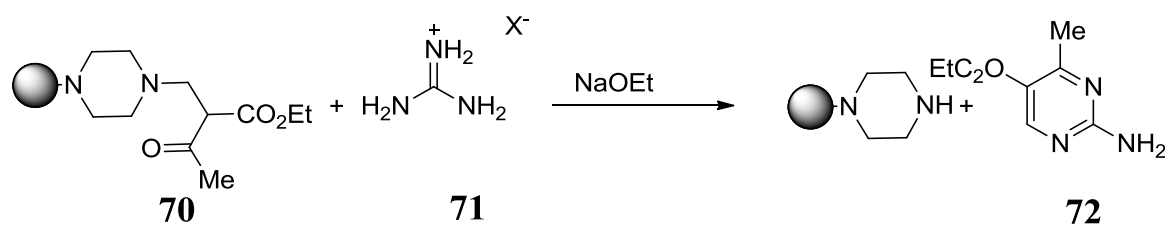


Рисунок 21. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Еноляты также могут выступать в качестве маскировочных агентов. Так, в синтезе 2-замещенного пиримидин-5-карбонового эфира **75** представлен двумаскировочный диальдегид, где первый защищен в виде ацетала **73**, а другой в форме енолята натрия **74** (рисунок 22) [72].

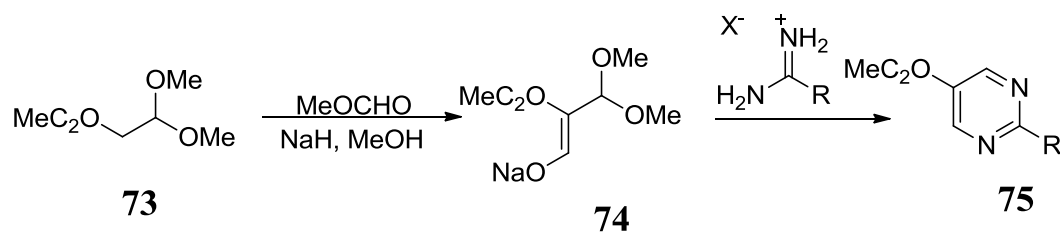


Рисунок 22. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Тиомочевина легко реагируют с β -дикетонами и дает более высокий выход в сравнении с мочевиной. Так же *S*-алкилизотиомочевина часто используется вместо тиомочевины. Примером реакции с защищенным кетоальдегидом может служить реакция *S*-метилтиурония **77** с 2,3-дихлормальдегидной кислотой **76** (рисунок 23) [73].

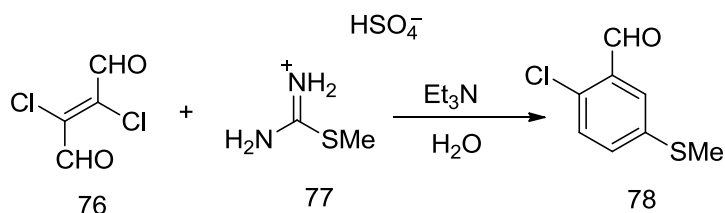


Рисунок 23. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

β -Альдегидоэфиры, β -кетозиферы и β -диэфиры

Для конденсации β -альдегидных эфиров с мочевиной обычно используют алкоксиметиленовые эфиры. Промежуточный ациклический продукт, для индукции закрытия кольца, требует дополнительной обработки. Так, в реакции α -кетозифера с мочевиной для образования промежуточного ациклического продукта используют кислотный катализ, а для закрытия кольца обработка сильной щелочью], как показано в результате синтеза

5-(2-гидроксиэтил)-4-пиримидинон **80** и 6-(2-гидроксифенил)-пиримидин **82** (рисунок 24) [74].

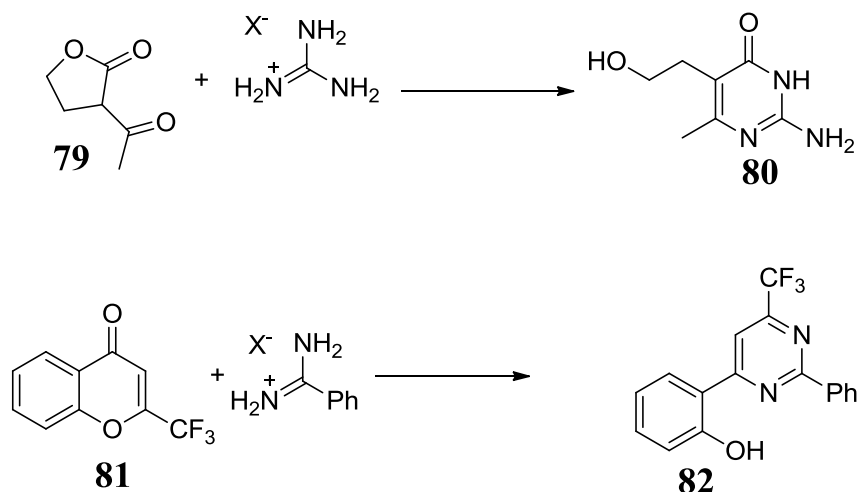


Рисунок 24. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Реакцию с β -кетоефирами **83** возможно провести, после присоединения амидинового компонента **84** к твердой подложке, как показано в результате синтеза 2,4-пиримидиндионов **85**, где после окисления тиолинкера **86** (рисунок 25) следовало гидролитическое расщепление [75].

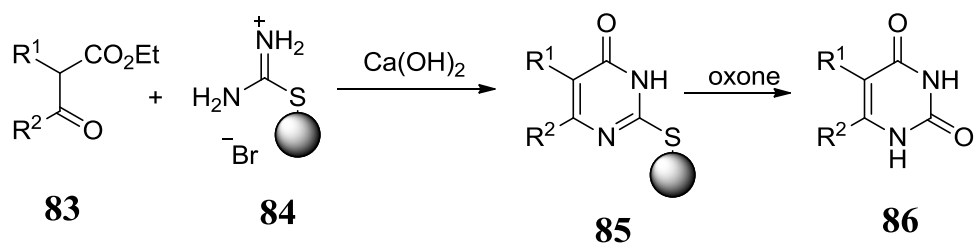


Рисунок 25. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Для синтеза барбитуратов, в качестве малонатов, используют β -диэфиры. Малонилдихлориды можно использовать вместо малонилэфиров, но в этом случае реакцию проводят при комнатной температуре, о чем свидетельствует синтез *N*-фенил и *N*-пиридил-2-тиобарбитуровых кислот **89** из малонилдихлорида **87** и N^1, N^3 -диарилмочевины **88** (рисунок 26) [76].

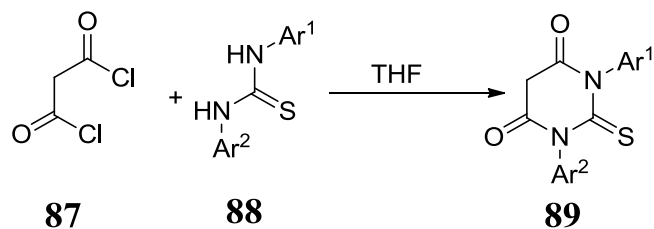


Рисунок 26. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Так же, для конденсации замещенных амидинов, возможно использование микроволнового излучения. Реакция замещенных мочевины **91** с малоновой кислотой **90** в присутствии уксусного ангидрида давала 1,3-дизамещенные барбитуровые кислоты **92**, а с цианоуксусной кислотой **93** производные 6-аминопурацила **94** (рисунок 27) [77].

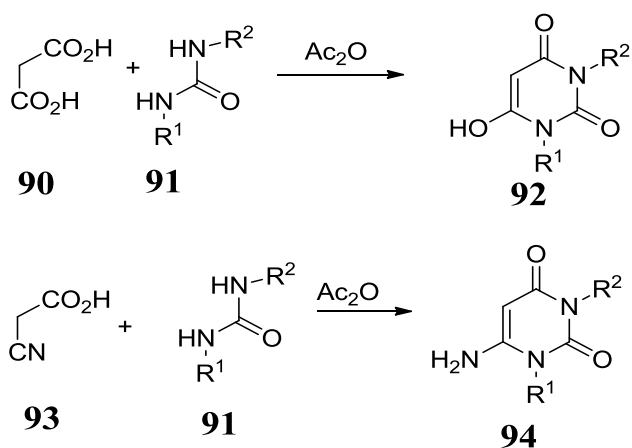


Рисунок 27. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Для размещения в 4- или 6-положении тиоалкильной группы, для последующего смещения нуклеофилами, можно использовать дитиоацетали кетина. Например, реакция 3,3-бис(метилтио)-2-цианоакрилонитрила **95** с

2-алкилтиоамидинамими **96** дает 4-амино-2,6-диалкилтиопиримидин-5-нитрилы **97** (рисунок 28) [78,79].

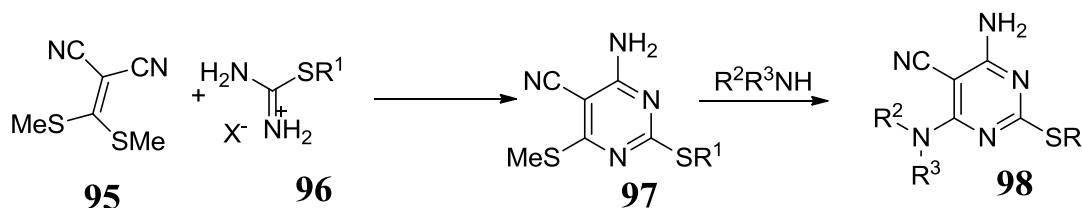


Рисунок 28. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Также алкоксидами, без выделения промежуточного соединения, в одну стадию, может быть осуществлено смещение метилтиогруппы, о чем свидетельствует синтез 2-амино-6-этоксипиримидин-4-карбальдегида **102** из защищенных альдегидов **99** и **101** (рисунок 29) [80].

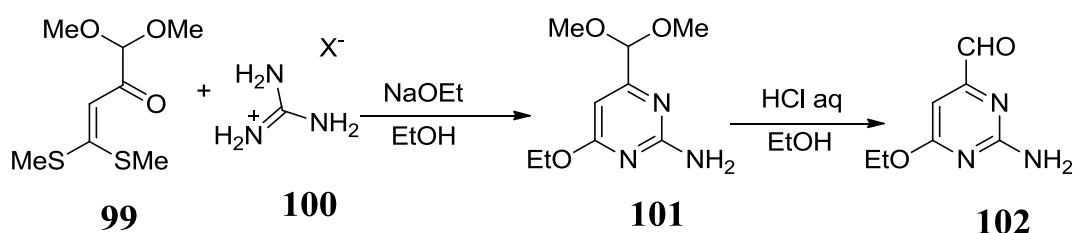


Рисунок 29. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Группа кетеновых дитиоацетальных методов оказалась полезной для синтеза ряда биологически интересных молекул [81,82], включая производные 5-цианопиримидина, которые являются ингибиторами р38α MAP-киназы [83].

β-Альдегидонитрилы, *β*-кетонитрилы, *β*-эфиронитрилы и *β*-динитрилы

Для получения 4-амино-6-незамещенных пиримидинов часто используют легкодоступные *β*-альдегидонитрилы и их эквиваленты. Малонитрилы и замещенные малонитрилы легко реагируют с

тиомочевинной и *N*-замещенными тиомочевинами с образованием пиримидин-4,6-диаминов. Примером является реакция малононитрила **103** с тиомочевинной **104** с получением пиримидинетииона **105** (рисунок 30) [84].

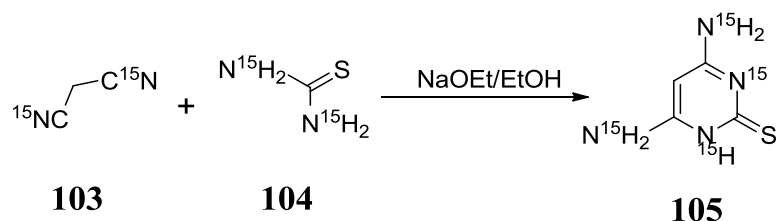


Рисунок 30. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

2-Пропинальдегиды, 2-пропинилкетоны и 2-пропилиловые эфиры

Алкиновые группы могут формально рассматриваться как высокомаскированные альдегидные или кетоновые, а на практике 2-пропинилкетоны **106** легко реагируют с амидиновыми производными **107** с получением 2,4-дизамещенных пиримидинов **108** с хорошими выходами (схема 25) [85-87]. При использовании диацетиленовых кетонов **109** реакция протекает по тройной связи с более электроннодефицитным остатком, с образованием 4- или 6-алкинилпиримидинов **110** (рисунок 31) [88,89].

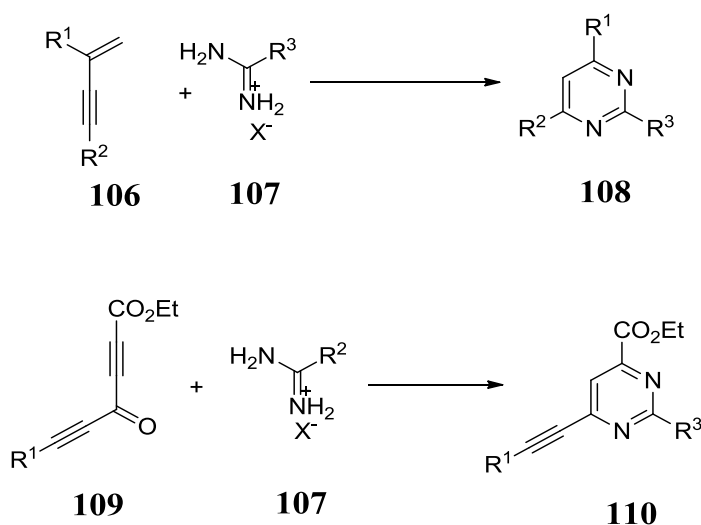


Рисунок 31. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Было также показано, что 2-пропинил-альдегиды так же подвергаются реакции [90,91], хотя они менее широко используются, 2-пропиниловые эфиры также используют для получения 4Н пиридинов [92]. В этом методе используют микроволновое излучение, и применение этой технологии позволило получать пиридиновые производные с высокими выходами. Например, 2,4-дифенилпиримидин **113** получали с выходом более 98% после 40 минут микроволнового облучения независимо от того, был ли использован фенилалкинильный альдегид **111** или алкинилфенилкетон **112** (рисунок 32) в качестве исходного материала [90,91].

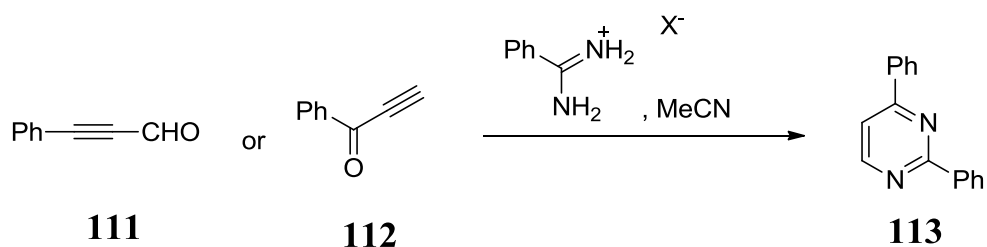


Рисунок 32. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Доступность пропинилкетонов из кислых хлоридов по модифиции Соногаширы [54-56] помогла сделать этот метод очень ценным для пиридинов. Были разработаны процедуры, позволяющие проводить как реакции Соногаширы, так и амидиновые реакции в одной колбе, что продемонстрировано на примере превращения хлоридов ариловой кислоты **114** в 4-арилпиридины **116** через триметилсилилалкины **115** (рисунок 33) [93,94].

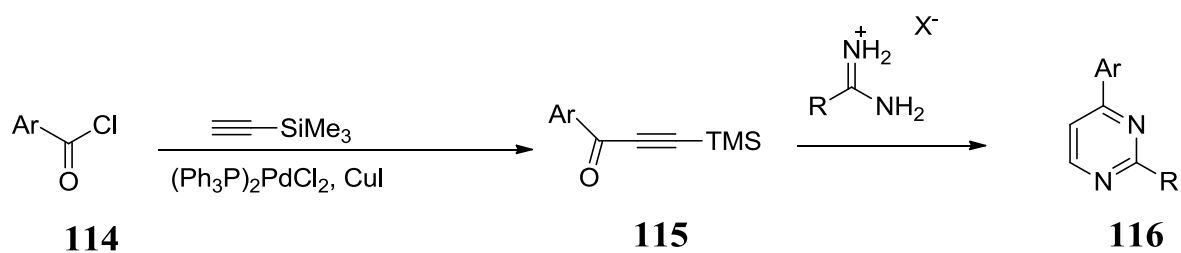


Рисунок 33. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Альтернативным источником алкинилкетона является присоединение алкина к альдегиду с последующим окислением алкинилового спирта. Было использовано несколько различных окислителей, хотя наиболее часто используется двуокись марганца [95-98]. Была разработана методика, позволяющая провести синтез в одной колбе, для выполнения как стадии окисления, так и циклизации при микроволновом облучении, о чем свидетельствует синтез 4-фенилпиримидинов **118** из алкинилового спирта **117** (рисунок 34) [95].

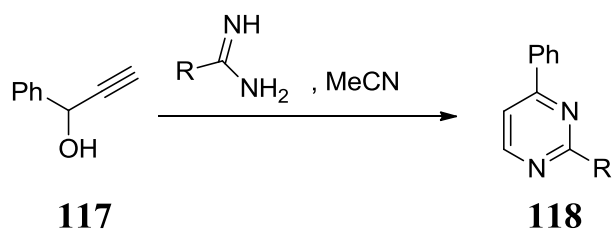


Рисунок 34. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

В настоящее время путь алкинилкетона к пиримидинам хорошо изучен, и примером его использования в химии натуральных продуктов является синтез нескольких аналогов меридианина, включая меридиниан D **120** из индольного предшественника **119** (рисунок 35) [99].

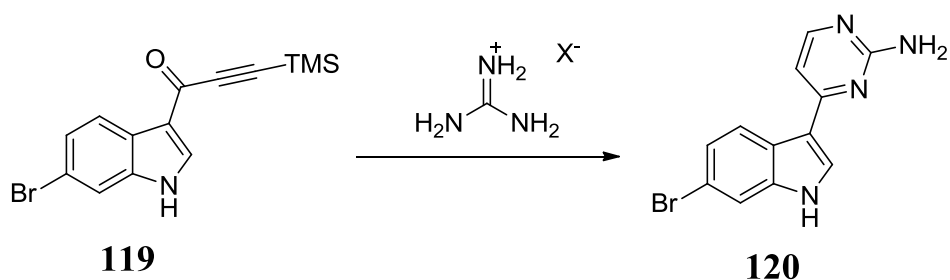


Рисунок 35. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Алкенильные кетоны

Хотя алкенилкетоны **121** или халконы имеют более низкий уровень окисления, чем алкинилкетоны, и не имеют уходящей группы энаминокетонов, их все еще можно использовать в качестве источника полностью конъюгированных производных пиримидина при условии, что может возникнуть окисление промежуточного 4,5-дигидропиримидина **123** (рисунок 36). Во многих случаях не требуется дополнительного окислителя, и кислорода в воздухе достаточно для обеспечения выделения пиримидинов **124** с хорошим выходом [100-102]. Когда требуется дополнительный окислитель, используют пероксид водорода [103] и палладий на древесном угле.

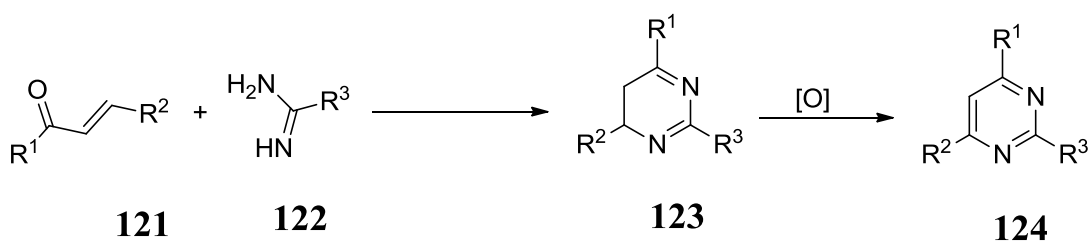


Рисунок 36. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Синтез из компонентов C(2)–N(3)–C(4) + C(5)–C(6)–N(1)

Компонент C(5)–C(6)–N(1) традиционно был енамином, реагировавший с ацилизотиоцианатом. В подтверждение можно привести реакцию энантиоэфиров **125** с ацилом изотиоцианаты **126** с образованием 4-(3H)-пиримидинетионов **127** (рисунок 37) [104,105].

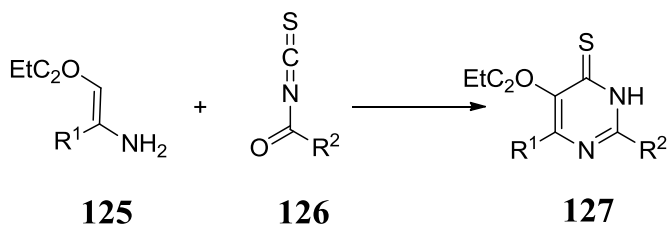


Рисунок 37. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

Когда новый подход к данной категории синтезов включает в себя в себя димеризацию галогенированных оксимовых эфиров **128** реакцией с реактивами Гриньяра (рисунок 38) [106,107].

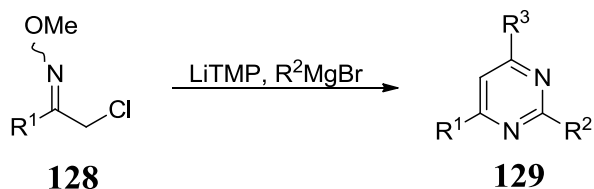


Рисунок 38. Путь из двух компонентов с тремя кольцевыми атомами.

1.3.4 Синтез цикла из трех компонентов

Синтез из компонентов C(2)–N(3), C(4)–C(5), И C(6)–N(1)

В этом подходе компоненты C(2)-N(3) и C(6)-N(1) обычно одинаковы. Формамиды или нитрилы являются общими компонентами C-N. Классическим примером является тримеризация ацетонитрила с получением 2,6-диметил-4-пиримидинамина [46], в то время как современный пример

включает аналогичную тримеризацию ряда алкильных и бензиловых нитрилов **130** в условиях СВЧ-излучения (рисунок 39) [107].

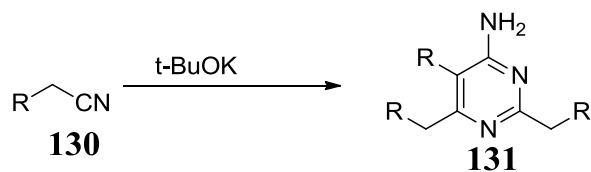


Рисунок 39. Синтез цикла из трех компонентов.

Другим недавним примером является конденсация этилцианоацетата **132** с 2 экв. трифторацетонитрила в присутствии трет-бутоксид калия с получением 5-циано-2,6-бис(трифторметил)-4(3H)-пиримидинона **133** с выходом 84% (рисунок 40) [108].

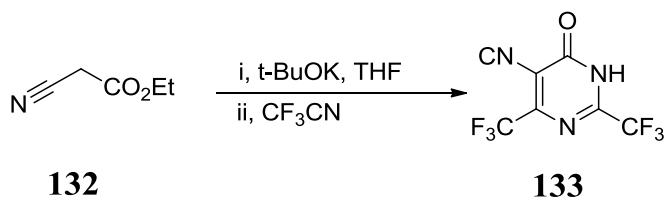


Рисунок 40. Синтез цикла из трех компонентов.

Трифликовый ангидрид можно также использовать для активации сложных эфиров **134** в конденсации с нитрилами, и в этом случае получают 4-алкоксипиримидины **135** (рисунок 41) [109].

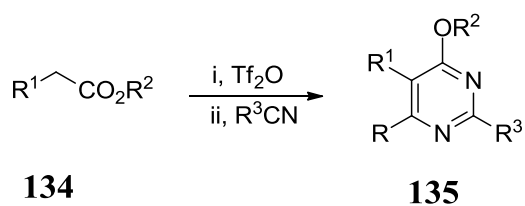


Рисунок 41. Синтез цикла из трех компонентов.

Когда кетоны **136** используют в той же реакции вместо сложного эфира, получают три- или тетраалкилпиримидины, а когда вместо нитрила используют метилтиоцианат, получают 2,4- или 2,6-бис(метилтио)пиримидины **137** (рисунок 42) [110, 111].

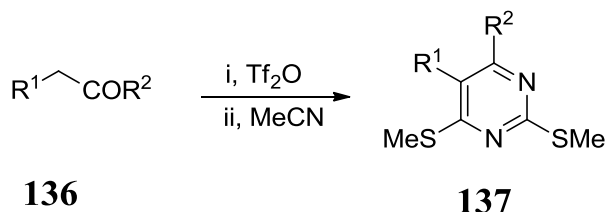


Рисунок 42. Синтез цикла из трех компонентов.

Синтез из компонентов N(1)–C(2)–N(3)+C(4)–C(5)+C-6

Наиболее важным синтезом в этой подгруппе является реакция Бигинелли, которая включает реакцию между метиленкетонем **249**, альдегидом **138** и либо мочевиной **139** (Z=O), либо тиомочевиной **140** (Z=S) с получением дигидро-2-пиримидинона **141** (Z = O) или дигидро-2-пиримидинетиион (Z=S) (рисунок 43) [112-114].

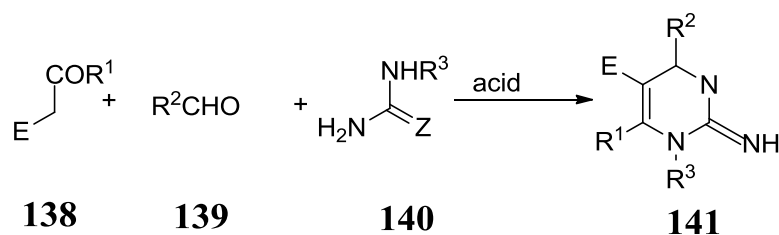


Рисунок 43. Синтез цикла из трех компонентов.

В принятом в настоящее время механическом пути, обозначенном на рисунке 44, ключевым этапом в последовательности Бигинелли является катализируемое кислотой образование промежуточного соединения N-ацилиминия-иона типа **143** из исходных альдегида и мочевины [115].

Перехват иминиум-иона **144** СН-кислотным карбонильным компонентом **142**, предположительно через его енольный таутомер, продуцирует уреид **147** с открытой цепью, который затем циклизуется до гексагидропиримидина **148**. Катализируемое кислотой удаление воды из **148** в конечном итоге приводит к окончательному продукту **145** дигидропиримидинона. Поэтому механизм реакции можно классифицировать как α -амидоалкилирование или, более конкретно, в качестве α -уридоалкилирования. В соответствии с этой механистической рецептурой монозамещенные мочевины и тиомочевина обеспечивают исключительно *N*-1 алкилированные дигидропиримидиноны. *N*, *N'*-дизамещенные мочевины не реагируют в условиях реакции [113,114].

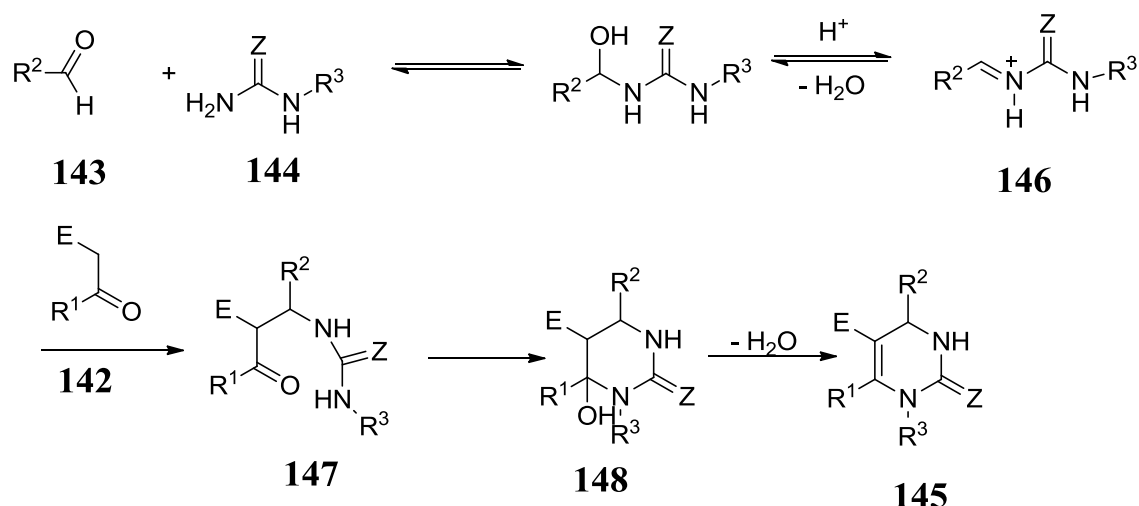


Рисунок 44. Синтез цикла из трех компонентов.

Для получения производных 2-метилтио-5-цианопиримидинона использовалась *S*-метилизотиомочевина, а также связанные с полимерами соли тиоурия **148**, которые могут быть вытеснены из твердой фазы окислением атома серы с получением сульфона **150** с последующим замещением (рисунок 45) [116].

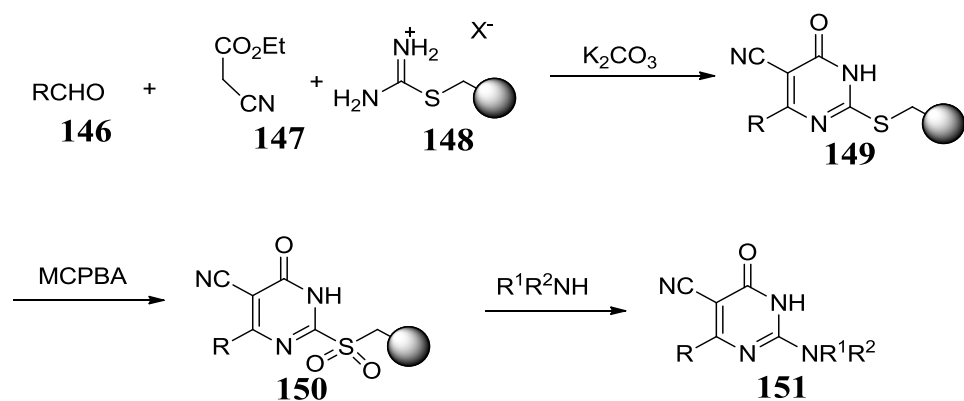


Рисунок 45. Синтез цикла из трех компонентов.

1.4 Химические свойства пиримидинов

1.4.1 Электрофильная атака по атому углерода

Нитрозирование

Нитрозирование происходит в 5-положение в пиримидинах с тремя сильными электронно-донорными группами. Оно осуществляется действием азотистой кислоты или нитритными эфирами, но есть и более простой метод, основанный на обработке изоамилнитритом в ДМСО, без какого-либо добавления кислоты [117]. Например, обработка 4-амино-2,6-диметоксипиримидина **152** изоамилнитритом в ДМСО при комнатной температуре дает 5-нитрозопроизводное **153** с выходом 75% (рисунок 46) [117].

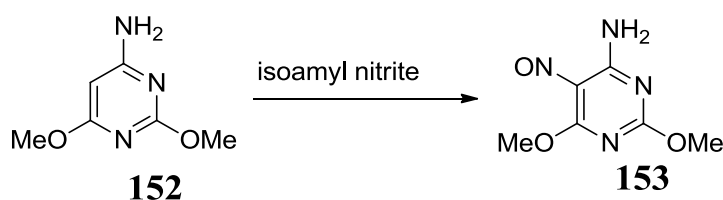


Рисунок 46. Электрофильная атака по атому углерода.

Диазосоединения

Электрофил диазония очень слабый и для реакции требуются его сильные нуклеофильные аналоги. Например, связывание тетрафторбората 3-карбокситетрафторбензолдиазония **154** с 2,6-диаминопиридин-4(3H)-оном **155** происходит с выходом 91% (рисунок 47) [118].

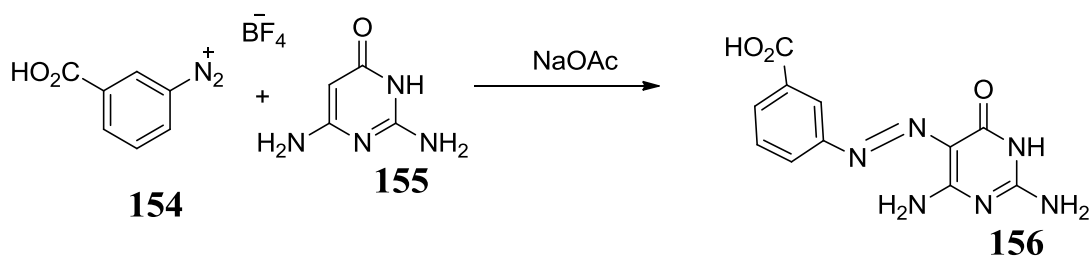


Рисунок 47. Электрофильная атака по атому углерода.

Диазо присоединение в хинолинах происходит в бензольном кольце, или в кольце нафталина в присутствии сильных электронно-донорных заместителей.

Галогенирование

Галогенирование пиридинонов идет в 5-ое положение бензольного кольца, так, например, для образования 5-хлорпиридинонов **158** используют N-хлорсукцинимид, хлорный газ или сульфурилхлорид (рисунок 48) [119, 120].

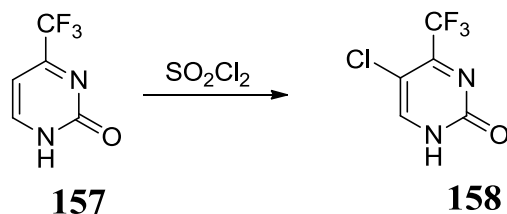


Рисунок 48. Электрофильная атака по атому углерода.

Бромирование пиридина проводят как правило при высоких температурах, но наличие гидрокси-, оксо- или аминогрупп позволяют существенно снизить температуру бромирования [121, 122].

Они облегчают бромирование даже в водном растворе. Наиболее распространенным реагентом является молекулярный бром, но также для этих целей используют *N*-бромсукцинимид. С помощью них получают бромзамещенные урацил и цитозин. Стоит отметить, что при их бромировании также получаются и побочные продукты, включающие ковалентные гидраты [121, 122]. Чтобы преодолеть связанные с ними трудности, возможно использование безводных, включающих ионные жидкости реактивов и *N*-бромсукцинимид в тетрабутиламмоний бромиде (рисунок 49) [123, 124].

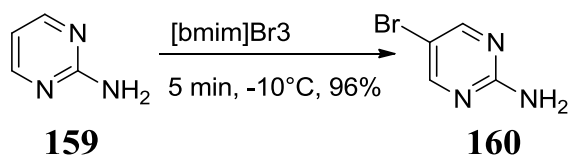


Рисунок 49. Электрофильная атака по атому углерода.

Йодирование, в отличие от хлорирования и бромирования, происходит при воздействии монохлорида иода или *N*-йодсукцимида при микроволновом излучении, в присутствии активирующего заместителя.

1.4.2 Нуклеофильная атака по атому углерода

Алкилирование и арилирование

Обычно литийорганические соединения подвергаются нуклеофильному присоединению к азометиновой части пиридинов и хиназолинов, с получением дигидро- продуктов, которые затем могут быть окислены с образованием замещенных пиридинов или хиназолинов. Однако, если все азометиновые группы замещены, нуклеофильное присоединение может активировать позиции хлором. Затем, следует удалить хлор с получением

замещенных пиримидинов или хиназолинов, что продемонстрировано реакцией 2,4-дихлорхиназолина **161** с 2-тиениллитием **162** с образованием 4-тиенильного производного **163** с выходом 76% (рисунок 50) [125].

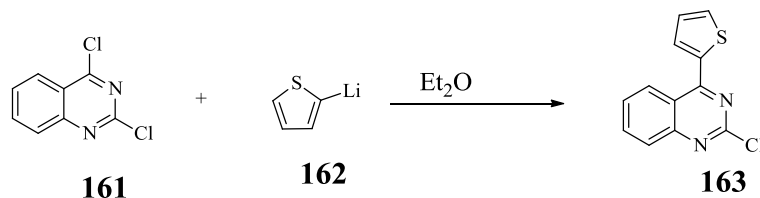


Рисунок 50. Нуклеофильная атака по атому углерода.

Еноляты также могут присоединяться к активированным пиримидинам и хиназолинам, как показано на примере синтеза 4-(3-оксиндолил)хиназолина **166** из смолосодержащих 4-алкилтиохиназолинов **164** (рисунок 51) [126].

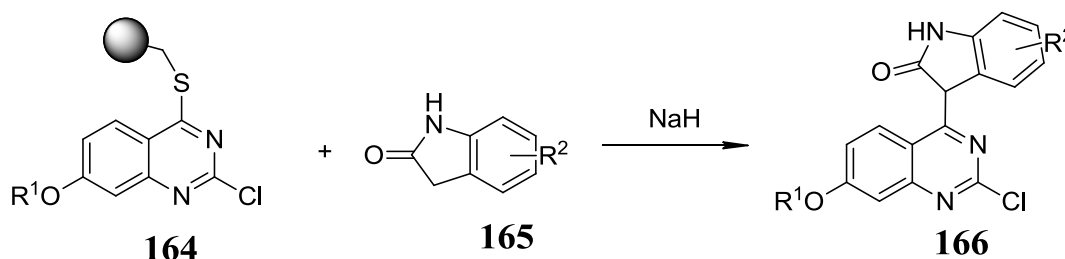


Рисунок 51. Нуклеофильная атака по атому углерода.

Галогенирование

Синтез хлорпроизводных пиримидина обычно происходит при действии хлорида фосфора на гидроксильные соединения. Алкокси и амино группы как правило не затрагиваются, хотя оксимы часто превращаются в нитрильные группы [127]. В последнее время такие реакции проводят при помощи четвертичных аммониевых солей, хотя ранее, для этих целей использовали третичные аминовые основания. За счет увеличения

концентрации иона хлора скорость реакции значительно увеличивается (рисунок 52) [128,129].

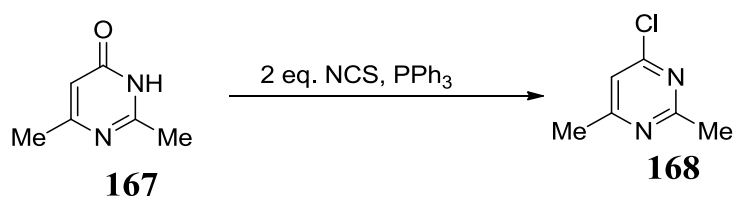


Рисунок 52. Нуклеофильная атака по атому углерода.

В качестве бромлирующего агента чаще всего используется соль фосфония, полученная при взаимодействии трифенилфосфина с N-бромсукцинимидом [130]. Например, при использовании комплекса фосфония NBS был получен бромпириимидин **170** с выходом 84% (рисунок 53).

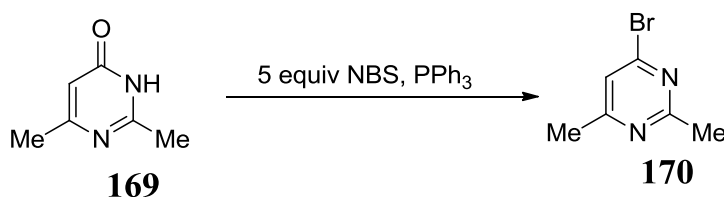


Рисунок 53. Нуклеофильная атака по атому углерода.

Йодирование

С помощью трансгалогенирования соответствующих бром- или хлорпириимидинов получают йодпириимидины используя в качестве реагента холодную йодистоводородную кислоту [131,132]. Наиболее эффективной комбинацией для осуществления подобного рода реакций считается йодистоводородная кислота и йодид натрия [133,134]. Так, с помощью хлорсодержащих соединений, была осуществлена двухэтапная конверсия пириимидинонов **171** в йодопириимидины **172** (рисунок 54) [135].

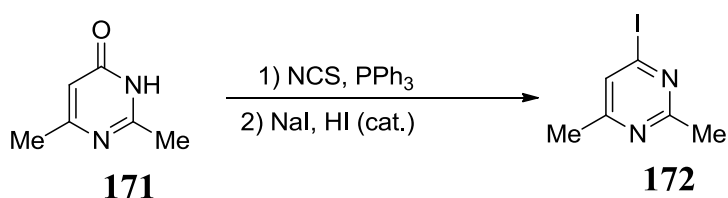


Рисунок 54. Нуклеофильная атака по атому углерода.

Фторирование

Фторирование пиримидинов, как правило, происходит при замещении других галогенидов в (2-, 4- и 6-) электронно-дефицитных положениях. В качестве фторирующего агента часто используют фтороводородную кислоту. Так, для получения 5-трифторметилурацила **175** в 2,4-дихлор-5-трихлорметилпиримидине **173** при действии кислоты атомы хлора замещаются на фтор с получением 2,4-дифтор-5-трифторметилпиримидина **174**, который затем гидролизуют с получением целевого продукта (рисунок 55) [136].

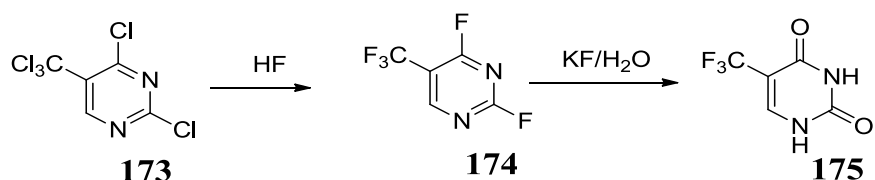


Рисунок 55. Нуклеофильная атака по атому углерода.

Выводы по разделу

По данному разделу можно сделать вывод о том, что пиримидины имеют высокую биологическую активность, обширные химические свойства пиримидинов позволяют нам варьировать заместителями для получения более активного ингибитора.

2 Обсуждение результатов

Дерегулирование активности киназы стало основным механизмом, с помощью которого раковые клетки избегают нормальных физиологических ограничений, связанных с ростом и выживаемостью. Несмотря на то, что на сегодняшний день большинство ингибиторов EGFR получило одобрение FDA и по-прежнему ведущими мировыми исследовательскими центрами прилагаются значительные усилия для разработки селективных низкомолекулярных ингибиторов киназ, вовлеченных в онкогенез, лекарственная устойчивость стала основным препятствием для дальнейшего успеха использования таргетных препаратов, направленных на EGFR-киназу. Например, развитие резистентности при лечении немелкоклеточного рака легкого, резко сокращает безрецидивную выживаемость и является ограничением для применения серии ингибиторов EGFR. Детальное исследование устойчивых мутантов EGFR киназы (L858R/T790M) выявило одну аминокислоту – так называемую «гейткиперскую» аминокислоту – которая индуцирует устойчивость к препаратам первого и второго поколения. Более того, сравнительно недавно выделенная форма EGFR (C797S) оказывается устойчивой ко всем известным ингибитором, включая недавно предложенный AZD9291. Учитывая данные факты нам срочно необходимы новые химические подходы для обнаружения и синтеза перспективных соединений, которые способны ингибировать мутантные формы протеинкиназ семейства рецепторов эпидермального фактора роста.

Цель данного исследования – разработать химические стратегии синтеза для избирательных ингибиторов EGFR, несущих мутации в АТР сайте. Поскольку киназы обычно существуют в неактивном состоянии и требуют структурных перестроек для активации их ферментативной активности, мы предположили, что соединения, которые предотвращают эту активацию, могут обеспечить стратегию селективного ингибирования киназ, в том числе устойчивых к традиционным АТР-конкурентным ингибиторам

из-за имеющихся мутаций. В дальнейшем мы рассмотрим результаты молекулярного моделирования, методы и подходы к синтезу найденных соединений, а также результаты биологических испытаний.

2.1 Синтез производных 4-амино-5-цианопиримидина

Анализ литературы, приведенный в первой главе настоящей работы, выявил широкий арсенал синтетических подходов построения пиримидинового цикла. Среди главных стоит отметить реакции двух- и трехкомпонентной гетероциклизации. Учитывая, что в данной работе необходимо было получить полифункциональные производные пиримидина, содержащие вполне определённые функциональные группы в четвертом (аминогруппа) и пятом (цианогруппа) положениях мы остановились на 3+3 гетероциклизации.

В качестве реагентов, несущих N-C-N фрагмент были выбраны Сизотиуруниеиевые соли, в качестве биелектрофила генерируемые *in situ* аддукты Кновенагеля, полученные из арилальдегида и этилцианоацетата.

S-изотиуруниеиевые соли были получены в ходе алкилирования тиомочевины с соответствующим алкилгалогенидом в этиловом спирте.

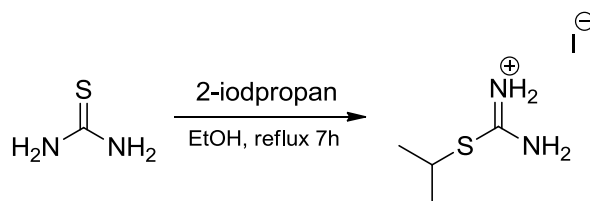


Рисунок 56. Получение *S*-изотиуруниеиевой соли.

Синтез 4-гидрокси-5-цианопиримидинов 2 проводили в ходе трехкомпонентной циклизации соли 1, арилальдегида и этилцианоацетата в условиях основного катализа (карбонат калия).

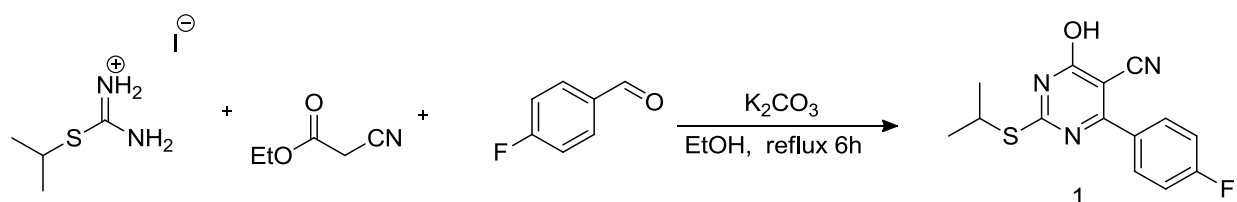


Рисунок 57. Синтез 4-гидрокси-5-цианопиримидина.

Конверсию соответствующих гидроксипиримидинов 2 в хлориды 3 осуществляли под действием оксихлорида фосфора в кипящем диоксане.

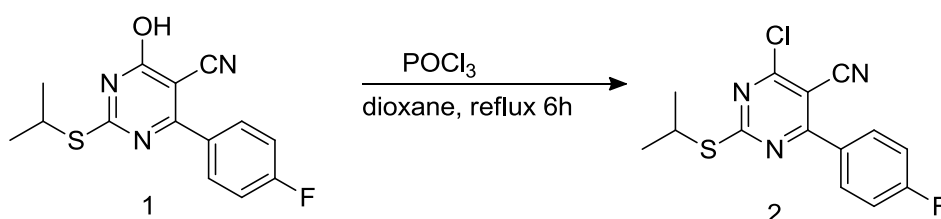


Рисунок 58. Конверсия гидроксипиримидина.

Амины 4 получали в ходе нуклеофильного замещения хлора в сульфидах 3 под действием двух эквивалентов вторичного амина (пирролидин, морфолин) путем продолжительного кипячения в изопропиловом спирте.

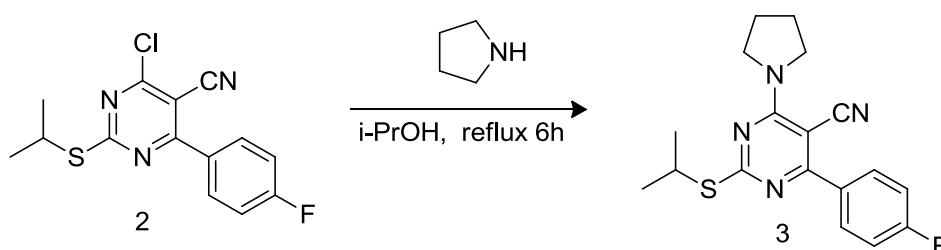


Рисунок 59. Получение амина в ходе нуклеофильного замещения.

Целевые сульфоны 5 были получены по ранее разработанному в НИЛ ФГС методу окисления пиримидинсодержащих сульфидов под действием оксона в среде DMF/H₂O. Несмотря на имеющиеся в литературе противоречивые данные по окислению пиримидинсульфидов, порой приводящего к образованию 2-оксопроизводных, в ходе оптимизации данной стадии наблюдалось гладкое окисление сульфида 4а до сульфона 5а при 53 использовании двух эквивалентов оксона при умеренном нагревании (60 оС) без образования значительного количества побочных продуктов.

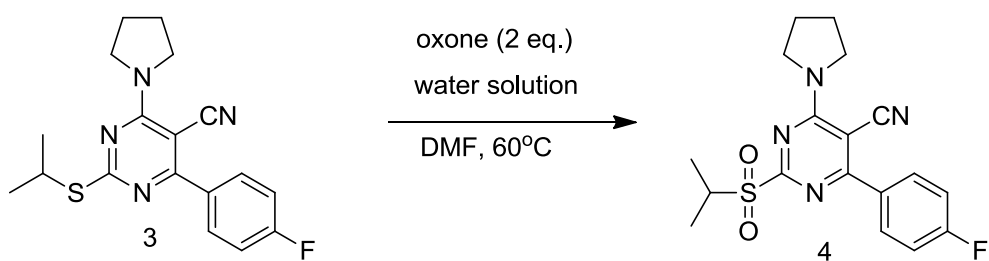
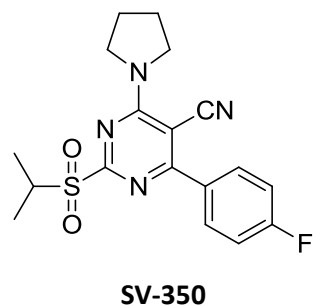


Рисунок 60. Получение целевого соединения.

2.2 Биологические испытания

Для оценки эффективности разработанных ингибиторов EGFR было осуществлено исследование цитотоксичности на клеточной линии эпидермоидной карциномы A431, обильно экспрессирующих EGFR дикого типа. Оценка цитотоксичности производилась с применением МТТ-теста. В таблице 1 представлены результаты цитотоксичности в виде значений EC₅₀ (эффективная концентрация, при которой 50% клеток на момент исследования погибают).



EC₅₀ (μM)

1,67

Как видно из представленных данных синтезированное соединение проявляет высокую цитотоксичность в отношении исследуемых опухолевых клеток линии A-431.

2.3 Материальный баланс производства

Рассчитаем материальный баланс синтеза 1 кг целевого продукта с учетом потерь производства 2%. Расчет начнем с последней стадии. Производство организовано как периодический процесс.

V. Стадия:

Уравнение реакции:

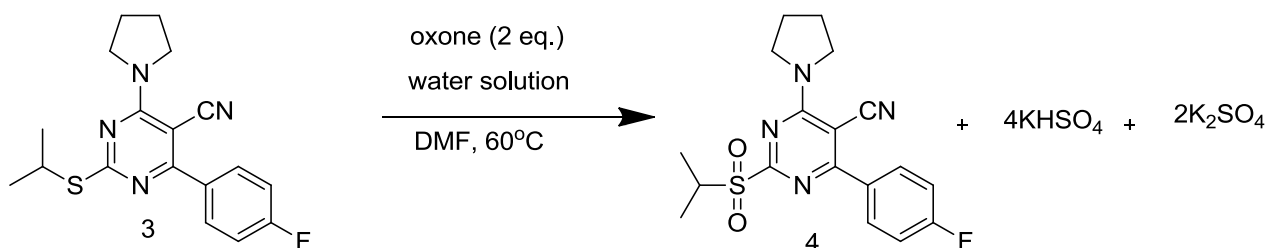


Рисунок 61. Уравнение реакции V стадии.

Вещество	3	oxone	4	KHSO₄	K₂SO₄
Молярная масса, г/моль	342.44	614.76	374.43	136.17	174.26
Количество по уравнению, моль	1	2	1	4	2
Содержание основного вещества (по паспорту или данным ВЭЖХ), %	98.6	100	97.7	-	-
Масса, г	-	-	1000		

Выход продукта окисления **4** 37 %.

1. Рассчитаем массу продукта стадии окисления **4** с учетом потерь производства 2%:

$$m_4 = \frac{1000}{1 - \frac{2}{100}} = 1020 \text{ г}$$

2. Рассчитаем массу исходного вещества **3** m_3 :

$$m_3'' = m_4 \cdot \frac{M_3}{M_4} = 1020 \cdot \frac{342}{374} = 914 \text{ г}$$

С учетом 37 %-го выхода продукта окисления необходимо:

$$m_3' = \frac{m_3''}{W_4} = \frac{914}{0.37} = 2470 \text{ г}$$

С учетом примесей в исходном амине **3**:

$$m_3 = \frac{m_3'}{\omega_3} = \frac{2470}{0.986} = 2505 \text{ г}$$

Масса примесей, содержащихся в исходном амине **3**:

$$m_3^{\text{прим.}} = m_3 - m_3' = 2505 - 2470 = 35 \text{ г}$$

3. Рассчитаем массу непрореагировавшего амина **3**:

$$m_3^{\text{непр.}} = m_3 - m_3'' - m_3^{\text{прим.}} = 2505 - 914 - 35 = 1556 \text{ г}$$

4. Рассчитаем массу оксона:

$$M_{\text{оконе}}'' = m_4 \cdot \frac{2 \cdot M_{\text{оконе}}}{M_4} = 1020 \cdot \frac{2 \cdot 615}{374} = 3355 \text{ г}$$

С учетом 37 %-го выхода продукта окисления необходимо:

$$M_{\text{оконе}}' = \frac{m_{\text{оконе}}''}{W_4} = \frac{3355}{0.37} = 9067 \text{ г}$$

5. Рассчитаем массу непрореагировавшего оксона:

$$m_{\text{оконе}}^{\text{непр.}} = m_{\text{оконе}} - m_{\text{оконе}}'' = 9067 - 3355 = 5712 \text{ г}$$

6. Рассчитаем массу выделившегося гидросульфата калия:

$$T_{\text{з.к.}} = m_4 \cdot \frac{4 \cdot M_{\text{з.к.}}}{M_4} = 1020 \cdot \frac{4 \cdot 136}{374} = 1484 \text{ г}$$

Рассчитаем массу выделившегося сульфата калия:

$$T_{з.к.} = m_4 \cdot \frac{2 \cdot M_{с.к.}}{M_4} = 1020 \cdot \frac{2 \cdot 174}{374} = 949 \text{ г}$$

7. Составим таблицу материального баланса:

8.

Таблица 1- Материальный баланс реакционного узла

Статьи прихода			Статьи расхода		
Статья	<i>m</i> , г	ω , %	Статья	<i>m</i> , г	ω , %
Сульфид 3	2470	21.4	Продукт окисления 4	1020	8.8
Примеси 3	35	0.3	Сульфид 3	1556	13.4
Оксон	9067	78.3	Примеси 3	35	0.3
			Оксон	5712	56.5
			Гидросульфат калия	1484	12.8
			Сульфат калия	949	8.2
Итого:	11572	100.0	Итого:	11572	100.0

IV. Стадия:

Уравнение реакции:

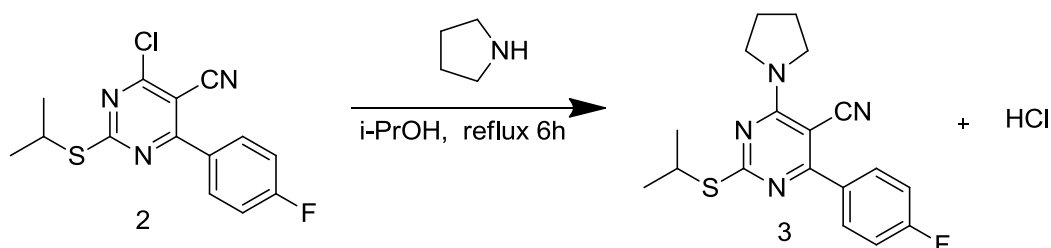


Рисунок 62. Уравнение реакции IV стадии.

Вещество	2	C₄H₉N	3	HCl
Молярная масса, г/моль	307,77	71.11	342.43	36.46
Количество по уравнению, моль	1	1	1	1
Содержание основного вещества (по паспорту или данным ВЭЖХ), %	93.4	99	98.6	-
Масса, г	-	-	2505	

Выход продукта замещения **3** 89 %.

1. Рассчитаем массу продукта стадии замещения **3** с учетом потерь производства 2%:

$$m_3 = \frac{2505}{1 - \frac{2}{100}} = 2556 \text{ г}$$

2. Рассчитаем массу исходного вещества **2** m_2 :

$$m_2'' = m_3 \cdot \frac{M_2}{M_3} = 2556 \cdot \frac{308}{342} = 2302 \text{ г}$$

С учетом 89 %-го выхода продукта замещения необходимо:

$$m_2' = \frac{m_2''}{W_3} = \frac{2302}{0.89} = 2586 \text{ г}$$

С учетом примесей в исходном хлориде **2**:

$$m_2 = \frac{m_2'}{\omega_2} = \frac{2586}{0.934} = 2769 \text{ г}$$

Масса примесей, содержащихся в исходном хлориде **2**:

$$m_2^{\text{прим.}} = m_2 - m_2' = 2769 - 2586 = 183 \text{ г}$$

3. Рассчитаем массу непрореагировавшего хлорида **2**:

$$m_2^{\text{непр.}} = m_2 - m_2'' = 2586 - 2302 = 284 \text{ г}$$

4. Рассчитаем массу *пирролидина*:

$$m_{\text{пирролидин}}'' = m_3 \cdot \frac{2 \cdot M_{\text{пирролидин}}}{M_3} = 2556 \cdot \frac{71.11}{342} = 532 \text{ г}$$

С учетом 89 %-го выхода продукта замещения необходимо:

$$m_{\text{пирролидин}}' = \frac{m_{\text{пирролидин}}''}{W_3} = \frac{532}{0.89} = 597 \text{ г}$$

С учетом примесей в исходном пирролидине:

$$m_{\text{нур}} = \frac{m_{\text{нур}}'}{\omega_{\text{нур}}} = \frac{597}{0.99} = 603 \text{ г}$$

Масса примесей, содержащихся в исходном пирролидине:

$$m_{\text{нур}}^{\text{прим.}} = m_{\text{нур}} - m_{\text{нур}}' = 603 - 597 = 6 \text{ г}$$

5. Рассчитаем массу непрореагировавшего *пирролидина*:

$$m_{\text{пирролидин}}^{\text{непр.}} = m_{\text{пирролидин}} - m_{\text{пирролидин}}^{\text{II}} = 603 - 532 = 71 \text{ г}$$

6. Рассчитаем массу выделившейся соляной кислоты:

$$T_{\text{к.}} = m_3 \cdot \frac{M_{\text{к.}}}{M_3} = 2556 \cdot \frac{36}{342} = 272 \text{ г}$$

Составим таблицу материального баланса:

Таблица 2- Материальный баланс реакционного узла

Статьи прихода			Статьи расхода		
Статья	<i>m</i> , г	ω , %	Статья	<i>m</i> , г	ω , %
Хлорид 2	2586	65	Продукт 3	2556	69.1
Примеси 2	183	4.7	Хлорид 2	284	12.9
пирролидин	597	30	Примеси 2	183	5.7
Примеси пирролидин	6	0.3	пирролидин	71	4
			Примеси пирролидин	6	0.3
			Соляная кислота	272	8
Итого:	3372	100.0	Итого:	3369	100.0

III. Стадия:

Уравнение реакции:

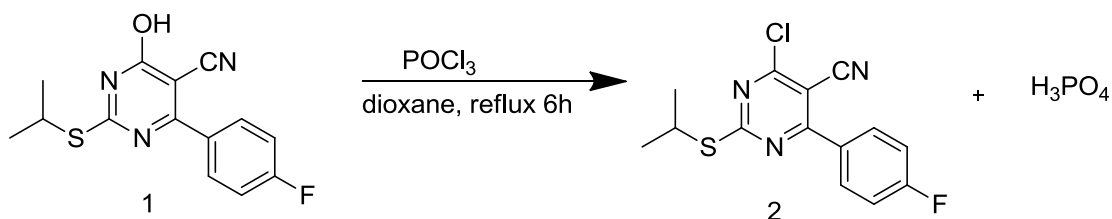


Рисунок 63. Уравнение реакции III стадии.

Вещество	1	POCl₃	2	H₃PO₄
Молярная масса, г/моль	289.33	153.33	307.77	98
Количество по уравнению, моль	1	0,33	1	1
Содержание основного вещества (по паспорту или данным ВЭЖХ), %	99.5	99	93.4	-
Масса, г	-	-	2769	

Выход продукта хлорирования **2** 89 %.

1. Рассчитаем массу продукта стадии хлорирования **2** с учетом потерь производства 2%:

$$m_2 = \frac{2769}{1 - \frac{2}{100}} = 2826 \text{ г}$$

2. Рассчитаем массу исходного вещества **1** m_1 :

$$m_1'' = m_2 \cdot \frac{M_1}{M_2} = 2826 \cdot \frac{289}{308} = 2652 \text{ г}$$

С учетом 89 %-го выхода продукта хлорирования необходимо:

$$m_1' = \frac{m_1''}{W_2} = \frac{2652}{0.89} = 2980 \text{ г}$$

С учетом примесей в исходном гидроксиде **1**:

$$m_1 = \frac{m_1'}{\omega_1} = \frac{2980}{0.995} = 2995 \text{ г}$$

Масса примесей, содержащихся в исходном гидроксиде **1**:

$$m_1^{\text{прим.}} = m_1 - m_1' = 2995 - 2980 = 15 \text{ г}$$

3. Рассчитаем массу непрореагировавшего гидроксида **1**:

$$m_1^{\text{непр.}} = m_1 - m_1'' = 2995 - 2652 = 343 \text{ г}$$

4. Рассчитаем массу оксихлорида фосфора:

$$m_{\text{о.ф.}}'' = m_2 \cdot \frac{1 \cdot M_{\text{о.ф.}}}{M_2} = 2826 \cdot \frac{1 \cdot 153}{308} = 1404 \text{ г}$$

С учетом 89 %-го выхода продукта замещения необходимо:

$$m_{\text{о.ф.}}' = \frac{m_{\text{о.ф.}}''}{W_2} = \frac{1404}{0.89} = 1577 \text{ г}$$

С учетом примесей в исходном оксихлориде фосфора:

$$M_{o.ф.} = \frac{m'_{o.ф.}}{\omega_{o.ф.}} = \frac{1577}{0.99} = 1593 \text{ г}$$

Масса примесей, содержащихся в исходном оксихлориде фосфора:

$$M_{o.ф.}^{прим.} = m_{o.ф.} - m'_{o.ф.} = 1593 - 1577 = 16 \text{ г}$$

5. Рассчитаем массу непрореагировавшего оксихлорида фосфора:

$$M_{o.ф.}^{непр.} = m_{o.ф.} - m''_{o.ф.} = 1593 - 1404 = 189 \text{ г}$$

6. Рассчитаем массу выделившейся ортофосфорной кислоты:

$$T_{к.} = m_2 \cdot \frac{M_{к.}}{M_2} = 2826 \cdot \frac{98}{308} = 899 \text{ г}$$

Составим таблицу материального баланса:

Таблица 3-Материальный баланс реакционного узла

Статьи прихода			Статьи расхода		
Статья	<i>m</i> , г	ω , %	Статья	<i>m</i> , г	ω , %
Гидроксид 1	2980	69.5	Продукт 2	2826	65.9
Примеси 1	15	0.35	Гидроксид 1	343	8
POCl ₃	1577	29.78	Примеси 1	15	0.35
Примеси POCl ₃	16	0.37	POCl ₃	189	4.41
			Примеси POCl ₃	16	0.37
			Ортофосфорная кислота	899	20.97
Итого:	4288	100.0	Итого:	4288	100.0

II. Стадия:

Уравнение реакции:

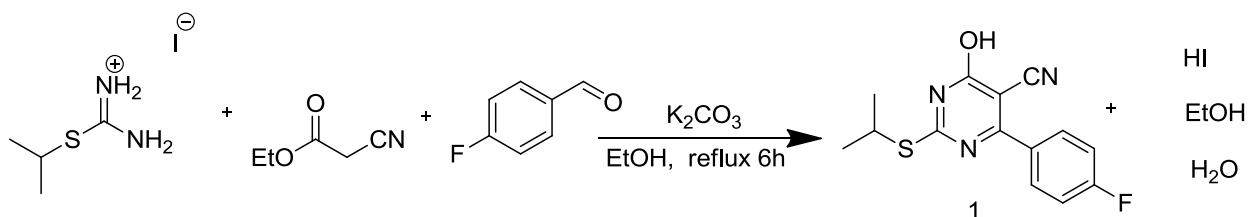


Рисунок 64. Уравнение реакции II стадии.

Вещество	соль	EtOAc	RCHO	K_2CO_3	1	HI	EtOH	вода
Молярная масса, г/моль	246.11	113.11	124.11	138.2	289.33	127.9	46	18
Количество по уравнению, моль	1	1	1	1	1	1	1	1
Содержание основного вещества (по паспорту или данным ВЭЖХ), %	100	100	100	100	99.5			
Масса, г					2995			

Выход продукта **1** 25 %.

1. Рассчитаем массу продукта **1** с учетом потерь производства 2%:

$$m_1 = \frac{2995}{1 - \frac{2}{100}} = 3056 \text{ г}$$

2. Рассчитаем массу исходного вещества **C** m_c :

$$m_c'' = m_1 \cdot \frac{M_c}{M_1} = 3056 \cdot \frac{246}{289} = 2601 \text{ г}$$

С учетом 25 %-го выхода продукта необходимо:

$$m_c' = \frac{m_c''}{W_1} = \frac{2601}{0.25} = 10404 \text{ г}$$

3. Рассчитаем массу непрореагировавшей соли:

$$m_c^{\text{непр.}} = m_c - m_c'' = 10404 - 2601 = 7803 \text{ г}$$

4. Рассчитаем массу *этилцианоацетата*:

$$m_{\text{э.а.}}'' = m_1 \cdot \frac{1 \cdot M_{\text{э.а.}}}{M_1} = 3056 \cdot \frac{1 \cdot 113}{289} = 1195 \text{ г}$$

С учетом 25 %-го выхода продукта необходимо:

$$m_{\text{э.а.}}' = \frac{m_{\text{э.а.}}''}{W_1} = \frac{1195}{0.25} = 4780 \text{ г}$$

Рассчитаем массу *альдегида*:

$$m_{\text{а.}}'' = m_1 \cdot \frac{1 \cdot M_{\text{а.}}}{M_1} = 3056 \cdot \frac{1 \cdot 124}{289} = 1311 \text{ г}$$

С учетом 25 %-го выхода продукта необходимо:

$$m_{a.} / = \frac{m_{a.}^{//}}{W1} = \frac{1311}{0.25} = 5245 \text{ г}$$

Рассчитаем массу K_2CO_3 :

$$m_{карб.}^{//}} = m1 \cdot \frac{1 \cdot M_{карб.}}{M1} = 3056 \cdot \frac{1 \cdot 138}{289} = 1459 \text{ г}$$

С учетом 25 %-го выхода продукта необходимо:

$$m_{карб.} / = \frac{m_{карб.}^{//}}{W1} = \frac{1459}{0.25} = 5837 \text{ г}$$

5. Рассчитаем массу непрореагировавшего *этилцианоацетата*:

$$m_{э.а.}^{непр.} = m_{э.а.} - m_{э.а.}^{//}} = 4780 - 1195 = 3585 \text{ г}$$

Рассчитаем массу непрореагировавшего *альдегида*:

$$m_{a.}^{непр.} = m_{a.} - m_{a.}^{//}} = 5245 - 1311 = 3934 \text{ г}$$

Рассчитаем массу непрореагировавшего K_2CO_3 :

$$m_{карб.}^{непр.} = m_{карб.} - m_{карб.}^{//}} = 5837 - 1459 = 4378 \text{ г}$$

6. Рассчитаем массу выделившегося йодоводорода:

$$T_{\text{й.}} = m_1 \cdot \frac{M_{\text{й.}}}{M1} = 3056 \cdot \frac{128}{289} = 1354 \text{ г}$$

Рассчитаем массу выделившегося этанола:

$$T_{\text{э.}} = m_1 \cdot \frac{M_{\text{э.}}}{M1} = 3056 \cdot \frac{46}{289} = 486 \text{ г}$$

Рассчитаем массу выделившегося воды:

$$T_{\text{в.}} = m_1 \cdot \frac{M_{\text{в.}}}{M1} = 3056 \cdot \frac{18}{289} = 190 \text{ г}$$

Составим таблицу материального баланса:

Таблица 4- Материальный баланс реакционного узла стадии хлорирования

Статьи прихода			Статьи расхода		
Статья	<i>m</i> , г	ω , %	Статья	<i>m</i> , г	ω , %
соль	10404	39.61	Продукт 1	3056	12.7
этилцианоацетат	4780	18.2	соль	7803	29.71
альдегид	5245	19.97	этилцианоацетат	3585	15.65
K ₂ CO ₃	5837	22.22	альдегид	3934	14.98
			K ₂ CO ₃	4378	18.67
			йодоводород	1354	5.65
			этанол	486	1.85
			вода	190	0.72
Итого:	26266	100.0	Итого:	26266	100.0

I. Стадия:

Уравнение реакции:

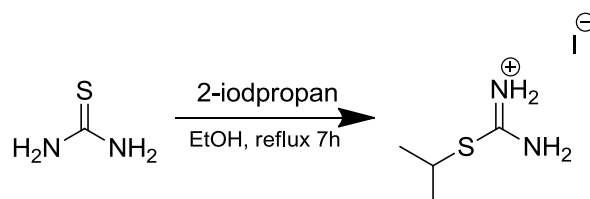


Рисунок 65. Уравнение реакции I стадии.

Вещество	тиомочевина	2йодпропан	соль
Молярная масса, г/моль	76.12	169.99	246.11
Количество по уравнению, моль	1	1	1
Содержание основного вещества (по паспорту или данным ВЭЖХ), %	100	100	100
Масса, г	-	-	10404

Выход продукта 72 %.

1. Рассчитаем массу продукта с учетом потерь производства 2%:

$$m_c = \frac{10404}{1 - \frac{2}{100}} = 10616 \text{ г}$$

2. Рассчитаем массу исходного вещества m_m :

$$m_m // = m_c \cdot \frac{Mm}{Mc} = 10616 \cdot \frac{76}{264} = 3056 \text{ г}$$

С учетом 72 %-го выхода продукта:

$$m_m' = \frac{m_m''}{W_c} = \frac{3056}{0.72} = 4245 \text{ г}$$

3. Рассчитаем массу непрореагировавшей тиомочевины:

$$m_m^{\text{непр.}} = m_m - m_m'' = 4245 - 3056 = 1189 \text{ г}$$

4. Рассчитаем массу 2-йодпропана:

$$m_{\text{й.п.}}'' = m_c \cdot \frac{1 \cdot M_{\text{й.п.}}}{M_c} = 10616 \cdot \frac{1 \cdot 170}{246} = 7336 \text{ г}$$

С учетом 72 %-го выхода продукта замещения необходимо:

$$m_{\text{й.п.}}' = \frac{m_{\text{й.п.}}''}{W_c} = \frac{7336}{0.72} = 10189 \text{ г}$$

5. Рассчитаем массу непрореагировавшего 2-йодпропана:

$$m_{\text{й.п.}}^{\text{непр.}} = m_{\text{й.п.}}' - m_{\text{й.п.}}'' = 10189 - 7336 = 2853 \text{ г}$$

Составим таблицу материального баланса:

Таблица 5. Материальный баланс реакционного узла стадии хлорирования

Статьи прихода			Статьи расхода		
Статья	<i>m</i> , г	ω , %	Статья	<i>m</i> , г	ω , %
тиомочевина	4245	29.41	соль	10404	70.08
2-йодпропан	10189	70.59	тиомочевина	1177	8.15
			2-йодпропан	2853	19.77
Итого:	14434	100.0	Итого:	14434	100.0

2.3.1 Разработка принципиальной технологической схемы производства 2-(Изопропилсульфонил)-4-(4-фторфенил)-6-(пирролидин-1-ил)пиримидин-5-карбонитрила

I. Стадия:

Суспензия состоящая из красного фосфора изопропиловом спирте из емкости E1 поступает в реактор P1, снабженный мешалкой и рубашкой, в которую подается хладагент с температурой 0°C. Из емкости E2 в реактор P1 подается молекулярный йод. Реакционная смесь перемешивается в течении двух часов. Затем, при помощи насоса H1 подается в реактор P2, снабженный рубашкой с теплоносителем и змеевиковым холодильником X1. Реакция проводится в течении трех часов. Затем реакционная смесь при помощи насоса H2 подается на друк-фильтр Ф1, где отфильтровывается от красного фосфора. Фильтрат поступает в емкость E3, снабженного мешалкой. Из емкости E4 в емкость E3 поступает 10% раствор Na₂S₂O₃. Смесь перемешивается в течении одного часа, затем смесь поступает в отстойник O1, откуда насосом H3 нижний слой изопротийодида подается в следующую стадию.

II. Стадия:

Изопротийодид поступает в реактор P3 снабженный рубашкой с теплоносителем и змеевиковым холодильником X2. Из емкости E5 в реактор P3 поступает раствор тиомочевины в спирте. Реакция проводится в течении семи часов. Затем, насосом H4 реакционная смесь подается в реактор P4 снабженный рубашкой, мешалкой и холодильником X3, в котором происходит удаление спирта. Полученная соль подается на следующую стадию.

III. Стадия:

Соль гидройодид 2-изопропилизотиурония подается в реактор P5. Из емкости E6 в реактор P5 поступает раствор 4-фторальдегида в спирте. Так как реакция проводится при нагревании и перемешивании реактор P5 снабжен мешалкой, рубашкой с теплоносителем и холодильником X4.

Реакция проводится в течении 24-ех часов. Затем реакционная смесь насосом Н6 подается в емкость Е7 снабженный мешалкой, куда из емкости Е8 подается 1% раствор соляной кислоты. Затем реакционную смесь при помощи насоса Н7 подается на друк-фильтр, откуда фильтрат подается на утилизацию, а твердый осадок просушивается в сушилке С1 и подается на следующую стадию.

IV. Стадия:

4-гидрокси-2-(изопропилтио)-6-(4-фторфенил)пиримидин-5-карбонитрил подается в реактор Р6. Из емкости Е8 в реактор Р6 поступает раствор оксихлорида фосфора в диоксане. Так как реакция проводится при нагревании реактор Р6 снабжен рубашкой с теплоносителем и холодильником Х5. Реакция проводится в течении 7 часов. Затем реакционная смесь насосом Н8 подается в емкость Е9 снабженный мешалкой, куда из емкости Е10 подается вода. Затем реакционную смесь при помощи насоса Н9 подают на друк-фильтр, откуда фильтрат подается на утилизацию, а твердый осадок просушивается в сушилке С2 и подается на следующую стадию.

V. Стадия:

2-(изопропилтио)-4-хлоро-6-(4-фторфенил)пиримидин-5-карбонитрила подается в реактор Р7. Из емкости Е11 в реактор Р7 поступает раствор пирролидина в изопропиловом спирте. Так как реакция проводится при нагревании реактор Р7 снабжен рубашкой с теплоносителем и холодильником Х6. Реакция проводится в течении 5 часов. Затем реакционная смесь насосом Н10 подается в емкость Е12 снабженный мешалкой, куда из емкости Е13 подается вода. Затем реакционную смесь при помощи насоса Н11 подается на друк-фильтр, откуда фильтрат подается на утилизацию, а твердый осадок просушивается в сушилке С3 и подается на следующую стадию.

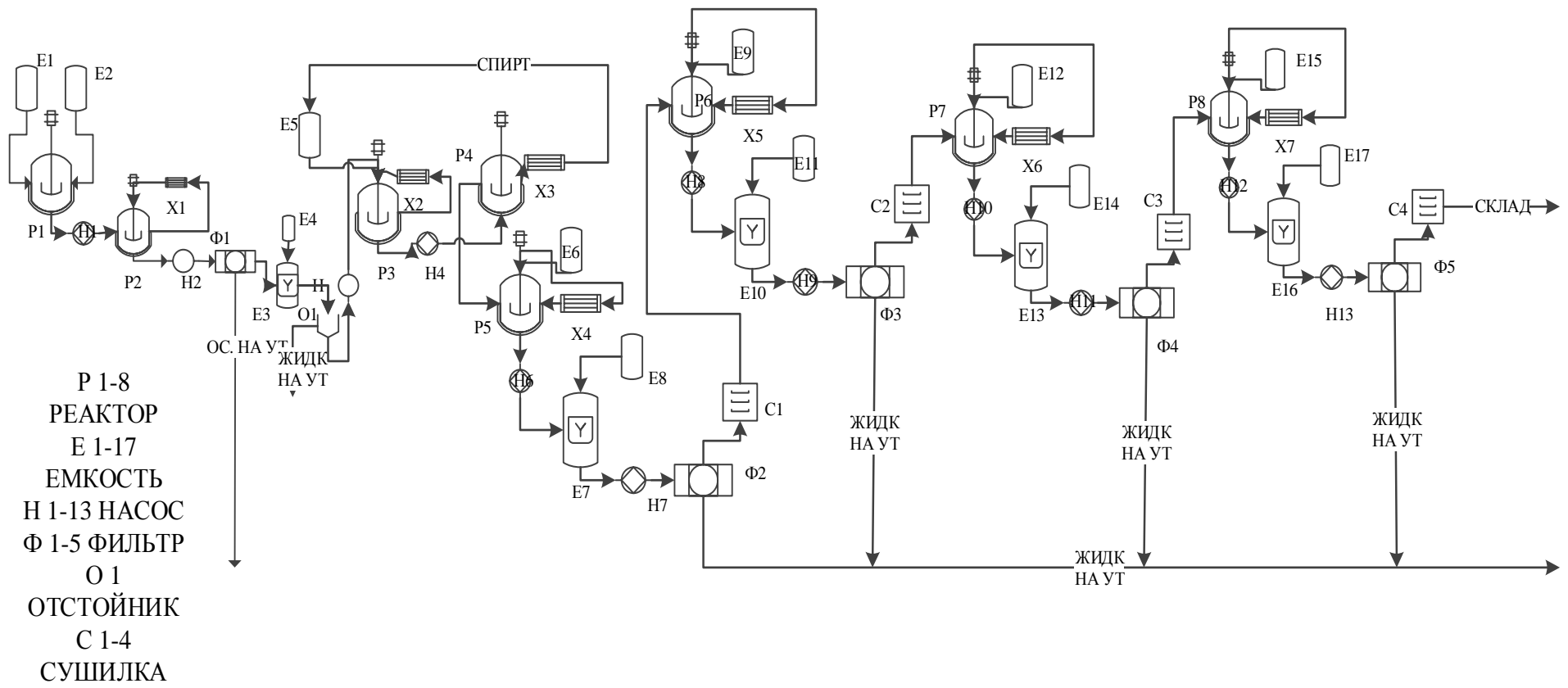
VI. Стадия:

2-(изопропилтио)-4-(4-фторфенил)-6-(пирролидин-1-ил)пиримидин-5-карбонитрил подается в реактор Р8. Из емкости Е14 в реактор Р8 поступает раствор оксона в воде. Из емкости Е15 в реактор Р8 подается диоксан. Так как реакция проводится при 60°С и перемешивании реактор Р8 снабжен мешалкой, рубашкой с теплоносителем и холодильником Х7. Реакция проводится в течении 2-х часов. Затем реакционная смесь насосом Н12 подается в емкость Е15 снабженную мешалкой, куда из емкости Е16 подается вода. Затем реакционную смесь при помощи насоса Н13 подается на друк-фильтр, откуда фильтрат подается на утилизацию, а твердый осадок просушивается в сушилке С4 и подается на склад.

Выводы по разделу

Во второй главе «**Результаты и обсуждения**» подробно описано выполнение каждой задачи, которые были сформулированы для достижения поставленной цели, а именно:

1. Выполнен синтетический маршрут по получению соответствующих пиримидинов.
2. Представлено методическое описание МТТ-теста. Результат цитотоксичности позволил определить соединение – лидер;
3. Рассчитан материальный баланс производства соединения – лидера;
4. Подробно описана принципиальная технологическая схема ингибитора EGFR-киназы.



3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты, вспомогательные материалы и оборудование

Ход реакций и чистоту целевых продуктов оценивали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением хроматографа «Agilent 1220 м» с спектрофотометрическим детектором на колонке ZORBAX C-18; элюент представляет собой смесь ацетонитрила и воды в соотношении 8 : 2; скорость потока 1 мл/мин. Обработка данных проводилась с применением программы OpenLab.

Температуры плавления определены в блоке.

3.2 Подготовка растворителей

Этанол

Для удаления воды к 1 л этилового спирта добавляли 7 г металлического натрия и 25 г диэтилового эфира щавелевой кислоты, кипятили в колбе с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой кипячения в течение 2 ч. Затем перегоняли при атмосферном давлении. $T_{\text{кип.}} = 78.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $d^{25} = 0.7893$, $n_{20}^D = 1.3611$.

Диметилформамид

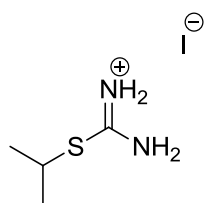
1 л диметилформамида сушили над 25 г гидроксида калия, затем перегоняли над оксидом кальция. $T_{\text{кип.}} = 153 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Другие растворители, реагенты и вспомогательные вещества производства фирм Acros Organics, Merck и Sigma–Aldrich использовали без дополнительной очистки.

3.3 Получение исходных соединений

Изопропилйодид

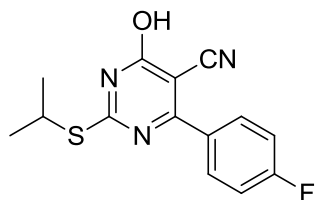
К заранее охлажденной смеси состоящей из изопропилового спирта (0.4 моль) и красного фосфора (0.13 моль, 4.09 г) порционно, при перемешивании и охлаждении, добавляли молекулярный йод (0.2 моль, 50.76 г). Затем реакционную смесь кипятили в течении 2 часов на водяной бане и отгоняли продукт в охлаждаемый приемник с водой. Полученный дистиллят промывали 10% раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, орг. слой сушили прокаленным CaCl_2 . Выход составил 72 %; Т. кип. = 89 °С;



*Гидроидид
изопропилизотиурония*

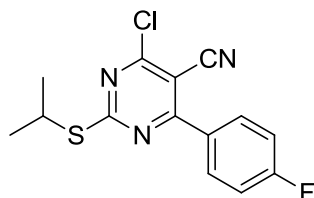
2-

К раствору тиомочевины (0.2 моль, 15.5 г) в спирте (250 мл) добавляли изопропилйодид (0.2 моль). Реакционную массу кипятили в течение 7 часов. Затем удаляли растворитель на роторном испарителе. Выход составил 98%;



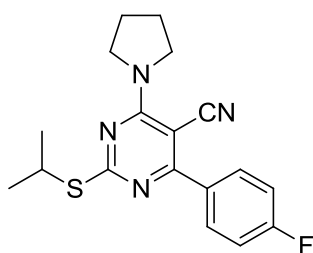
4-Гидрокси-2-(изопропилтио)-6-(4-фторфенил)пиримидин-5-карбонитрил

Последовательно в колбу поместили спирт (50 мл), соль гидройодид 2-изопропилизотиурония (15 ммоль), 4-фторальдегид (15 ммоль). Реакционную массу кипятили при постоянном перемешивании 24 ч. Затем реакционную массу разбавляли водой и довели до кислой среды раствором соляной кислоты и воды в соотношении 2 : 8. Полученный осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход составил 25%, т. пл. 188-190 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.5%.



2-(Изопропилтио)-4-хлоро-6-(4-фторфенил)пиримидин-5-карбонитрил

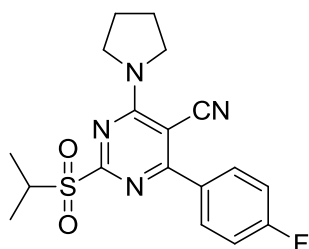
К раствору 4-гидрокси-2-(изопропилтио)-6-(4-фторфенил)пиримидин-5-карбонитрила (5.9 ммоль) в диоксане (30 мл) добавляли оксихлорид фосфора (17.6 ммоль). Кипятили с хлоркальциевой трубкой в течение 7ч. По истечении времени смесь выливали в воду со льдом и отфильтровывали осадок. Выход составил 89%, т. пл. 78-80 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 93.4%.



2-(Изопропилтио)-4-(4-фторфенил)-6-(пирролидин-1-ил)пиримидин-5-карбонитрил

Смесь из 2-(Изопропилтио)-4-хлоро-6-(4-фторфенил)пиримидин-5-карбонитрила (2 ммоль), изопропилового спирта (30 мл) и пирролидина (4 ммоль) кипятили в течении 5 ч. Затем реакционную массу выливали на лед с водой и отфильтровывали осадок. Выход составил 89%, т. пл. 91-93 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 98.6%.

3.4 Синтез целевого соединения



2-(Изопропилсульфонил)-4-(4-фторфенил)-6-(пирролидин-1-ил)пиримидин-5-карбонитрил

При $t = 60$ °С и перемешивании к ДМФ (30 мл) добавляли 2-(изопропилтио)-4-(4-фторфенил)-6-(пирролидин-1-ил)пиримидин-5-карбонитрил (5 ммоль), после полного растворения исходного соединения к реакционной массе приливали растворенный в 10 мл воды оксон (10 ммоль) и оставляли перемешиваться при заданной температуре 2 ч. Затем реакционную массу выливали на лед с водой и отфильтровывали выпавший осадок. Выход составил 37%, т. пл. 105-107 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 97.7%.

3.5 Биологические испытания

3.5.1 Культивирование клеток и исследование цитотоксичности

В работе использовалась клеточная линия A431 (эпидермоидная карцинома). Культивирование производили в среде DMEM Advanced (Gibco) с 3% FBS (Gibco), в присутствии пенициллина 50 Ед/мл и гентамицина 50 мкг/мл, при 37 °С и 5% содержании CO₂. Все опыты с клетками проводили начиная с 4 пассажа. Общее количество пассажей при культивировании не превышало 10.

В 96-луночные плоскодонные планшеты (Eppendorf) помещали 7 10³ клеток в 200 мкл полной ростовой среды и оставляли в инкубаторе на 24 ч для прикрепления. Далее производили раститровку исследуемых соединений, начиная с 500 μМ (концентрация в полной ростовой среде), и инкубировали планшет в течение 48 ч. Далее в каждую лунку добавляли 40 мкл раствора 77 МТТ (3-(4,5-диметил-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид) в PBS с концентрацией 0.5 мг/мл и инкубировали 4 часа. По истечении времени среду удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 200 мкл ДМСО и фотометрировали при 560 нм.

Выводы по разделу

В третьей главе «Экспериментальная часть» прописаны методики получения всех промежуточных и конечных соединений. У каждого соединения определен его выход, температура плавления. Дополнительно определена чистота (методом ВЭЖХ) соответствующих халконов и производных 6-(имидазо[2,1-b]тиазол-5-ил)-2-метоксиникотинитрилов.

Данная глава показывает, что каждая стадия синтетического маршрута является простой в воспроизведении, не требующая сложных дополнительных манипуляций.

Заключение

1. Разработана синтетическая методология получения производных 4-аминопиримидина;
2. Синтезировано целевое соединение в концепции drug like;
3. Исследована цитотоксичность синтезированного соединения в отношении клеточной линии эпидермоидной карциномы A431. Показана высокая цитотоксичность синтезированного соединения;
4. Разработана принципиальная технологическая схема получения 4-аминопиримидина, которая может быть применима для широкого круга производных данной гетеросистемы;

В работе рассмотрен вопрос о создании противоопухолевого агента таргетного типа. На сегодняшний день активно развивается индустрия в области производства отечественных фармацевтических субстанций. А создание инновационных противораковых агентов является стратегически важной задачей по разработке отечественного лекарственного средства. Причиной этому является ежегодный прирост людей с выявленными случаями злокачественного новообразования. Более того, на фармацевтическом рынке представлены препараты, в основном, компаний зарубежных фирм. Российские разработчики, к сожалению, в данной области практически не фигурируют.

В магистерской диссертации разработан способ получения совершенно нового ингибитора рецептора эпидермального фактора роста, который ранее не был описан в литературе. Разработка принципиальной технологической схемы производства ингибитора EGFR-киназы, позволит описать полную технологическую схему для внедрения на малотоннажное производство отечественной фарм. платформы.

Практическая значимость исследования состоит в возможности дальнейших биологических исследований, для более точного понимания взаимодействия ингибитора EGFR-киназы на саму клетку в целом.

Разработанная принципиальная технологическая схема может служить основой для разработки полной технологической схемы.

Работа логична построена, написана грамотно, изложена с научных позиций, обладает должной исследовательской культурой, аккуратно оформлена. Содержание автореферата соответствует основным положениям магистерской диссертации – автореферат имеет ту же структуру, и отображает все авторские идеи.

Диссертация представляет собой инновационное, значимое, завершённое исследование в области медицинской химии.

Диссертация обладает актуальностью, новизной и практической значимостью, содержит ряд новых теоретических и практических решений в области разработки инновационных противораковых агентов.

Список используемой литературы.

1. Lamberth C. Nucleoside chemistry in crop protection //Heterocycles. – 2005. – Т. 65. – №. 3. – С. 667-695.
2. Pao W. et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Т. 101. – №. 36. – С. 13306-13311.
3. Takeda M., Okamoto I., Nakagawa K. Survival Outcome Assessed According to Tumor Response and Shrinkage Pattern in Patients with EGFR Mutation–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer Treated with Gefitinib or Erlotinib //Journal of Thoracic Oncology. – 2014. – Т. 9. – №. 2. – С. 200-204.
4. Yun C. H. et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Т. 105. – №. 6. – С. 2070-2075.
5. Harrington E. A. et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo //Nature medicine. – 2004. – Т. 10. – №. 3. – С. 262.
6. Manley P. J. et al. 2, 4-Disubstituted pyrimidines: A novel class of KDR kinase inhibitors //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2003. – Т. 13. – №. 10. – С. 1673-1677.
7. Anderson M. et al. Imidazo [1, 2-a] pyridines: a potent and selective class of cyclin-dependent kinase inhibitors identified through structure-based hybridisation //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2003. – Т. 13. – №. 18. – С. 3021-3026.
8. Jain K. S. et al. Biological and medicinal significance of pyrimidines //Current science. – 2006. – С. 793-803.
9. Zhou X. X., Littler E. Nucleoside analogs as anti-HBV agents //Current topics in medicinal chemistry. – 2006. – Т. 6. – №. 9. – С. 851-865.
10. Littler E. et al. In Comprehensive Medicinal Chemistry II //J. Eds. – 2006. – Т. 7. – С. 295-327.

11. Clercq E. D. (E)- 5- (2- bromovinyl)- 2'- deoxyuridine (BVDU) //Medicinal research reviews. – 2005. – T. 25. – №. 1. – C. 1-20.
12. Komatsu H., Umetani H. Synthesis of trifluorothymidine: green glycosylation condition using neither chloroform nor transition metals //Organic process research & development. – 2002. – T. 6. – №. 6. – C. 847-850.
13. Parang K., Wiebe L. I., Knaus E. E. Novel Approaches for Designing 5'-O-Ester Prodrugs of 3'-Azido-2'3'-Dideoxythymidine (AZT) //Current medicinal chemistry. – 2000. – T. 7. – №. 10. – C. 995-1039.
14. Li J., Gao L., Ding M. THE CHEMICAL RESOLUTION OF RACEMIC CIS-2-HYDROXYMETHYL-5-(CYTOSINE-1'-YL)-1, 3-OXATHIOLANE (BCH-189)—ONE DIRECT METHOD TO OBTAIN LAMIVUDINE AS ANTI-HIV AND ANTI-HBV AGENT //Synthetic communications. – 2002. – T. 32. – №. 15. – C. 2355-2359.
15. Goodyear M. D. et al. Practical enantioselective synthesis of lamivudine (3TC™) via a dynamic kinetic resolution //Tetrahedron letters. – 2005. – T. 46. – №. 49. – C. 8535-8538.
16. Hawser S., Lociuro S., Islam K. Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents //Biochemical pharmacology. – 2006. – T. 71. – №. 7. – C. 941-948.
17. Fekner T., Müller-Bunz H., Guiry P. J. Synthesis and Application of Quinazoline– Oxazoline-Containing (Quinazox) Ligands //Organic letters. – 2006. – T. 8. – №. 22. – C. 5109-5112.
18. Lamberth C. Pyrimidine chemistry in crop protection //Heterocycles. – 2006. – T. 68. – №. 3. – C. 561-603.
19. Bridges A. J. et al. Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure– activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6, 7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor //Journal of medicinal chemistry. – 1996. – T. 39. – №. 1. – C. 267-276.

20. Rewcastle G. W. et al. Tyrosine kinase inhibitors. 5. Synthesis and structure-activity relationships for 4-[(phenylmethyl) amino]-and 4-(phenylamino) quinazolines as potent adenosine 5'-triphosphate binding site inhibitors of the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor //Journal of medicinal chemistry. – 1995. – T. 38. – №. 18. – C. 3482-3487.
21. Fry D. W. et al. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase //Science. – 1994. – T. 265. – №. 5175. – C. 1093-1095.
22. Fry D. W. et al. Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – T. 95. – №. 20. – C. 12022-12027.
23. Smaill J. B. et al. Tyrosine kinase inhibitors. 15. 4-(Phenylamino) quinazoline and 4-(phenylamino) pyrido [d] pyrimidine acrylamides as irreversible inhibitors of the ATP binding site of the epidermal growth factor receptor //Journal of medicinal chemistry. – 1999. – T. 42. – №. 10. – C. 1803-1815.
24. Tsou H. R. et al. 6-Substituted-4-(3-bromophenylamino) quinazolines as putative irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and human epidermal growth factor receptor (HER-2) tyrosine kinases with enhanced antitumor activity //Journal of medicinal chemistry. – 2001. – T. 44. – №. 17. – C. 2719-2734.
25. Hennequin L. F. et al. Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors //Journal of medicinal chemistry. – 2002. – T. 45. – №. 6. – C. 1300-1312.
26. Wedge S. R. et al. AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer //Cancer research. – 2005. – T. 65. – №. 10. – C. 4389-4400.
27. Heron N. M. et al. SAR and inhibitor complex structure determination of a novel class of potent and specific Aurora kinase inhibitors //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2006. – T. 16. – №. 5. – C. 1320-1323.

28. Jung F. H. et al. Discovery of novel and potent thiazoloquinazolines as selective Aurora A and B kinase inhibitors //Journal of medicinal chemistry. – 2006. – T. 49. – №. 3. – C. 955-970.
29. Chen P. et al. Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement //The Journal of cell biology. – 1994. – T. 127. – №. 3. – C. 847-857.
30. Lynch T. J. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib //New England Journal of Medicine. – 2004. – T. 350. – №. 21. – C. 2129-2139.
31. Gazdar A. F. Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer //The New England journal of medicine. – 2009. – T. 361. – №. 10. – C. 1018-1020.
32. Kawahara A. et al. Molecular diagnosis of activating EGFR mutations in non-small cell lung cancer using mutation specific antibodies for immunohistochemical analysis //Clinical Cancer Research. – 2010. – T. 16. – C. 3163-3170.
33. Kobayashi S. et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib //New England Journal of Medicine. – 2005. – T. 352. – №. 8. – C. 786-792.
34. Pao W. et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain //PLoS medicine. – 2005. – T. 2. – №. 3. – C. e73.
35. Yu H. et al. Analysis of Mechanisms of Acquired Resistance to EGFR TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant Lung Cancers //Clinical cancer research. – 2013. – T. 19. – C. 2240-2247.
36. Kwak E. L. et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – T. 102. – №. 21. – C. 7665-7670.

37. Klüter S. et al. Characterization of irreversible kinase inhibitors by directly detecting covalent bond formation: a tool for dissecting kinase drug resistance //ChemBioChem. – 2010. – T. 11. – №. 18. – C. 2557-2566.
38. Katakami N. et al. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both //J Clin Oncol. – 2013. – T. 31. – №. 27. – C. 3335-3341.
39. Miller V. A. et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial //The lancet oncology. – 2012. – T. 13. – №. 5. – C. 528-538.
40. Cross D. A. E. et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer //Cancer discovery. – 2014. – T. 4. – C. 1046-1061.
41. Engel J., Lategahn J., Rauh D. Hope and disappointment: covalent inhibitors to overcome drug resistance in non-small cell lung cancer //ACS Med. Chem. Lett. – 2015. – T. 7. – C. 2-5.
42. Thress K. S. et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M //Nature medicine. – 2015. – T. 21. – №. 6. – C. 560-562.
43. F. Fernandez, X. Garcia-Mera, M. Morales, and J. E. Rodríguez-Borges, Synthesis, 2001, 239;
44. Jeong J. U. et al. An Efficient Synthesis of 3-Substituted 3 H-Pyrimidin-4-ones //Organic letters. – 2004. – T. 6. – №. 6. – C. 1013-1016.
45. Jochims J. C. et al. Comprehensive Heterocyclic Chemistry II //Pergamon Press: Oxford. – 1996. – T. 4. – C. 179.
46. AL-Radha N. A. A. et al. Synthesis and identification of new derivatives of pyrimidine analogous via Suzuki reaction //Al-Qadisiyah Journal Of Pure Science. – 2017. – T. 22. – №. 3. – C. 1-19.

47. Jeong J. U. et al. An Efficient Synthesis of 3-Substituted 3 H-Pyrimidin-4-ones //Organic letters. – 2004. – T. 6. – №. 6. – C. 1013-1016.
48. Marmillon C., Bompart J., Calas M. Solution parallel synthesis of cyclic guanidines //Heterocycles. – 2000. – T. 53. – №. 6. – C. 1317-1328.
49. Clark J. D. et al. Pilot plant preparation of an $\alpha\upsilon\beta$ integrin antagonist. Part 1. Process research and development of a (S)- β -amino acid ester intermediate: Synthesis via a scalable, diastereoselective imino-reformatsky reaction //Organic process research & development. – 2004. – T. 8. – №. 1. – C. 51-61.
50. Kim M. et al. Expanding the Substrate Scope for C– H Amination Reactions: Oxidative Cyclization of Urea and Guanidine Derivatives //Organic letters. – 2006. – T. 8. – №. 6. – C. 1073-1076.
51. Katritzky A. R., Khashab N. M., Gromova A. V. Preparations of diversely substituted thiosemicarbazides and N-hydroxythioureas //Arkivoc. – 2006. – T. 3. – C. 226-236.
52. Kim Y. J., Varma R. S. Microwave-assisted preparation of cyclic ureas from diamines in the presence of ZnO //Tetrahedron Letters. – 2004. – T. 45. – №. 39. – C. 7205-7208.
53. Sandin H., Swanstein M. L., Wellner E. A fast and parallel route to cyclic isothioureas and guanidines with use of microwave-assisted chemistry //The Journal of organic chemistry. – 2004. – T. 69. – №. 5. – C. 1571-1580.
54. Cuccia S. J., Fleming L. B., France D. J. A novel and efficient synthesis of 4-phenyl-2-chloropyrimidines from acetophenone cyanoimines //Synthetic communications. – 2002. – T. 32. – №. 19. – C. 3011-3018.
55. Sosnovskikh V. Y. et al. Reaction of polyhaloalkyl-substituted chromones, pyrones, and furanones with salicylaldehydes as a direct route to fused 2 H-chromenes //The Journal of organic chemistry. – 2006. – T. 71. – №. 12. – C. 4538-4543.

56. Movassaghi M., Hill M. D. Single-step synthesis of pyrimidine derivatives //Journal of the American Chemical Society. – 2006. – T. 128. – №. 44. – C. 14254-14255.
57. Sharma A. K., Mahajan M. P. Synthesis and [4+ 2] cycloaddition reactions of 4-(N-allyl-N-aryl) amino-1, 3-diaza-1, 3-butadienes with vinyl-, isopropenyl-and chloroketenes: Entry to novel pyrimidinone/fused pyrimidinone derivatives //Tetrahedron. – 1997. – T. 53. – №. 40. – C. 13841-13854.
58. Landreau C., Deniaud D., Reliquet F. [4+ 2] Cycloaddition reactions between 2, 4-diamino-1-thia-3-azabutadienes and ketene. Synthesis of new 1, 3-thiazin-6-ones, 1, 3-thiazine-6-thiones and 2-thioxopyrimidin-4-ones //Heterocycles. – 2000. – T. 53. – №. 12. – C. 2667-2677.
59. Friot C. et al. New 1, 3-Diazadienes Used in Heterocyclic Synthesis //Synthesis. – 2000. – T. 2000. – №. 05. – C. 695-702.
60. Landreau C. et al. Cationic 1, 3- diazadienes in annulation reactions. Synthesis of pyrimidine, thiadiazinedioxide and triazine derivatives //Journal of Heterocyclic Chemistry. – 2001. – T. 38. – №. 1. – C. 93-98.
61. Robin A. et al. Straightforward pyrimidine ring construction: A versatile tool for the synthesis of nucleobase and nucleoside analogues //European journal of organic chemistry. – 2006. – T. 2006. – №. 3. – C. 634-643.
62. Pearson M. S. M. et al. An efficient route to pyrimidine nucleoside analogues by [4+ 2] cycloaddition reaction //The Journal of organic chemistry. – 2003. – T. 68. – №. 22. – C. 8583-8587.
63. Connolly D. J. et al. Synthesis of quinazolinones and quinazolines //Tetrahedron. – 2005. – T. 61. – №. 43. – C. 10153-10202.
64. Prashad M. et al. An efficient and practical N-methylation of amino acid derivatives //Organic letters. – 2003. – T. 5. – №. 2. – C. 125-128.
65. Wang T., Cloudsdale I. S. One-Pot Synthesis of 2-Aryl-and 2-Alkyl-pyrimidines //Synthetic communications. – 1997. – T. 27. – №. 14. – C. 2521-2526.

66. Vardaki M. Z., Kontoyannis C. G., Orkoula M. G. Raman Spectroscopy of Osteoporotic Rat Tibiae //Carcinogenesis. – 1988. – T. 9. – C. 2065-2072.
67. Zimmermann J. et al. Phenylamino- pyrimidine (PAP) derivatives: a new class of potent and selective inhibitors of protein kinase C (PKC) //Archiv der Pharmazie. – 1996. – T. 329. – №. 7. – C. 371-376.
68. Fabbro D. et al. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs //Pharmacology & therapeutics. – 2002. – T. 93. – №. 2-3. – C. 79-98.
69. Zimmermann J. et al. Potent and selective inhibitors of the Abl-kinase: phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives //Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 1997. – T. 7. – №. 2. – C. 187-192.
70. Ultimo S. et al. PI3K isoform inhibition associated with anti Bcr-Abl drugs shows in vitro increased anti-leukemic activity in Philadelphia chromosome-positive B-acute lymphoblastic leukemia cell lines //Oncotarget. – 2017. – T. 8. – №. 14. – C. 23213.
71. Porcheddu A. et al. A “catch and release” strategy for the parallel synthesis of 2, 4, 5-trisubstituted pyrimidines //Journal of combinatorial chemistry. – 2004. – T. 6. – №. 1. – C. 105-111.
72. Liang Y. et al. Efficient synthesis of a new pyrimidine derivative //Synthetic communications. – 2002. – T. 32. – №. 1. – C. 153-157.
73. Liang Y. et al. Efficient synthesis of a new pyrimidine derivative //Synthetic communications. – 2002. – T. 32. – №. 1. – C. 153-157.
74. V. Y. Sosnovskikh, B. I. Usachev, A. Y. Sizov, and M. A. Barabanov, Synthesis, 2004, 942;
75. Parlato M. C. et al. Solid phase synthesis of 5, 6-disubstituted pyrimidinone and pyrimidindione derivatives //Arkivoc. – 2004. – T. 349. – C. 363.
76. Deady L. W. et al. On the synthesis of pyridinylthiobarbituric acids //Australian journal of chemistry. – 2002. – T. 55. – №. 4. – C. 287-289.

77. Goswami S. et al. Microwave-expedited one-pot, two-component, solvent-free synthesis of functionalized pyrimidines //Australian journal of chemistry. – 2007. – T. 60. – №. 2. – C. 120-123.
78. Scavengers M. Polymer-Supported Catalysts and Reagents //Polymer. – T. 5. – №. 11.
79. Yu S. Y., Cai Y. X. Synthesis of polysubstituted pyrimidines from ketene dithioacetals using KF/Al₂O₃ catalyst //Synthetic communications. – 2003. – T. 33. – №. 22. – C. 3989-3995.
80. Mahata P. K. Syamkumar UK. Sriram V. Ila H. Junjappa H //Tetrahedron. – 2003. – T. 59. – C. 2631.
81. Tuğcu F. T., Turhan K. Synthesis and spectroscopic studies of substituted 6, 7-dihydrocyclopentapyrimidin-2-amine compounds via one-pot method //Journal of Molecular Structure. – 2018. – T. 1174. – C. 90-95.
82. Suryawanshi S. N. et al. Chemotherapy of leishmaniasis. Part XI: Synthesis and bioevaluation of novel isoxazole containing heteroretinoid and its amide derivatives //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2012. – T. 22. – №. 21. – C. 6559-6562.
83. Bissantz C., Kuhn B., Stahl M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions //Journal of medicinal chemistry. – 2010. – T. 53. – №. 14. – C. 5061-5084.
84. Laxer A. et al. (15N⁵)-Labeled adenine derivatives: synthesis and studies of tautomerism by 15N NMR spectroscopy and theoretical calculations //The Journal of organic chemistry. – 2001. – T. 66. – №. 16. – C. 5463-5481.
85. Obrecht D. et al. A novel and efficient approach for the combinatorial synthesis of structurally diverse pyrimidines on solid support //Helvetica chimica acta. – 1997. – T. 80. – №. 1. – C. 65-72.
86. Johns B. A. et al. Pyrazolo [1, 5-a] pyridines: synthetic approaches to a novel class of antiherpetics //Tetrahedron. – 2003. – T. 59. – №. 45. – C. 9001-9011.

87. Smith J. D., Walton D. R. M. The organometallic chemistry of the main group elements—a guide to the literature //Advances in Organometallic Chemistry. – Academic Press, 1975. – T. 13. – C. 453-542.
88. Collins I. Rapid analogue syntheses of heteroaromatic compounds //Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. – 2002. – №. 17. – C. 1921-1940.
89. MFA A. Adlington RM. Baldwin JE. Pritchard GJ. Rathmell RE //Tetrahedron. – 2003. – T. 59. – C. 2197.
90. Bagley M. C. et al. Microwave-assisted synthesis of N-pyrazole ureas and the p38 α inhibitor BIRB 796 for study into accelerated cell ageing //Organic & biomolecular chemistry. – 2006. – T. 4. – №. 22. – C. 4158-4164.
91. Martinez-Palou R. Advances in microwave-assisted combinatorial chemistry without polymer-supported reagents //Molecular diversity. – 2006. – T. 10. – №. 3. – C. 435-462.
92. Medwid J. B. et al. Preparation of triazolo [1, 5-c] pyrimidines as potential antiasthma agents //Journal of medicinal chemistry. – 1990. – T. 33. – №. 4. – C. 1230-1241.
93. Knochel P. et al. Synthese hoch funktionalisierter Organomagnesiumreagentien durch Halogen- Metall- Austausch //Angewandte Chemie. – 2003. – T. 115. – №. 36. – C. 4438-4456.
94. Willy B., Rominger F., Mueller T. J. J. Novel microwave-assisted one-pot synthesis of isoxazoles by a three-component coupling-cycloaddition sequence //Synthesis. – 2008. – T. 2008. – №. 02. – C. 293-303.
95. Groziak M. P. .2 Six-membered ring systems: Diazines and benzo derivatives //Progress in heterocyclic chemistry. – Elsevier, 2005. – T. 16. – C. 347-384.
96. Otero I. et al. Nucleoside analogues from branched-chain pyranosides //Australian journal of chemistry. – 2005. – T. 58. – №. 2. – C. 104-111.

97. Johns B. A. et al. Pyrazolopyridine antiherpetics: SAR of C2' and C7 amine substituents //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2005. – T. 13. – №. 7. – C. 2397-2411.
98. Gudmundsson K. S. et al. FLB Jr, CJ Sexton, DW Sellese, KR Monirib and KL Creech //Bioorg. Med. Chem. – 2005. – T. 13. – C. 5346.
99. Karpov A. S. et al. Concise syntheses of meridianins by carbonylative alkynylation and a four- component pyrimidine synthesis //Angewandte Chemie International Edition. – 2005. – T. 44. – №. 42. – C. 6951-6956.
100. Marzinzik A. L., Felder E. R. Key intermediates in combinatorial chemistry: access to various heterocycles from α , β -unsaturated ketones on the solid phase //The Journal of organic chemistry. – 1998. – T. 63. – №. 3. – C. 723-727.
101. TJJ M. Braun R. Ansorge M //Org. Lett. – 2000. – T. 2. – C. 1967.
102. Morimoto H. et al. Potent and Selective ET-A Antagonists. 1. Syntheses and Structure– Activity Relationships of N-(6-(2-(Aryloxy) ethoxy)-4-pyrimidinyl) sulfonamide Derivatives //Journal of medicinal chemistry. – 2001. – T. 44. – №. 21. – C. 3355-3368.
103. Varga L. et al. Solution-phase parallel synthesis of 4, 6-diarylpyrimidine-2-ylamines and 2-amino-5, 5-disubstituted-3, 5-dihydro-imidazol-4-ones via a rearrangement //Tetrahedron. – 2003. – T. 59. – №. 5. – C. 655-662.
104. Erian A. W. β - Enaminoesters as building blocks in heterocyclic synthesis. A novel synthesis of fused azines by using blaise reaction as a key step //Journal für praktische Chemie. – 1999. – T. 341. – №. 2. – C. 147-151.
105. Kamal E. D. AM, and Abdel-Moneam, ME //Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem. – 2002. – T. 177. – №. 12. – C. 2745-2751.
106. Kakiya H. et al. Reaction of α , α -dibromo oxime ethers with grignard reagents: Alkylative annulation providing a pyrimidine core //Journal of the American Chemical Society. – 2002. – T. 124. – №. 31. – C. 9032-9033.

107. TSURITANI T., SHINOKUBO H., OSHIMA K. Comprehensive Heterocyclic Chemistry II Comprehensive Heterocyclic Chemistry II 1A, 1996 //Chemistry letters. – 2004. – T. 33. – №. 2. – C. 122-123.
108. Parker M. H. A convenient preparation of trifluoroacetonitrile: application to the synthesis of a novel pyrimidinone building block //Synthetic communications. – 2004. – T. 34. – №. 5. – C. 903-907.
109. Baxendale I. R., Ley S. V. Formation of 4-aminopyrimidines via the trimerization of nitriles using focused microwave heating //Journal of combinatorial chemistry. – 2005. – T. 7. – №. 3. – C. 483-489.
110. Martínez A. G. et al. New procedures for the synthesis of heterocyclic substituted and 2, 4-difunctionalized pyrimidines //Tetrahedron. – 1996. – T. 52. – №. 23. – C. 7973-7982.
111. Tu S. J. et al. A convenient ferric chloride catalyzed synthesis of 5-alkoxycarbonyl-4-aryl-3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones under microwave irradiation //Synthetic communications. – 2002. – T. 32. – №. 1. – C. 147-151.
112. Kappe C. O. 100 years of the Biginelli dihydropyrimidine synthesis //Tetrahedron. – 1993. – T. 49. – №. 32. – C. 6937-6963.
113. Kappe C. O. Recent advances in the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. New tricks from an old dog //Accounts of Chemical Research. – 2000. – T. 33. – №. 12. – C. 879-888.
114. Kappe C. O., Stadler A. The Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis //Organic reactions. – 2004. – T. 63. – C. 1-116.
115. Kappe C. O. A reexamination of the mechanism of the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. Support for an N-Acyliminium ion intermediate //The Journal of organic chemistry. – 1997. – T. 62. – №. 21. – C. 7201-7204.
116. Karpov A. S., Müller T. J. J. New entry to a three-component pyrimidine synthesis by TMS– Ynones via Sonogashira coupling //Organic letters. – 2003. – T. 5. – №. 19. – C. 3451-3454.
117. A. S. Karpov and J. J. Muller, Synthesis, 2003, 2815.

118. Fu Y. et al. The Influence of Main Group Metallic Lewis Acids on the Formation and Reactivity of Grignard Reagents //Current Organic Chemistry. – 2015. – T. 19. – №. 24. – C. 2324-2343.
119. S. Moore, H. Jaeschke, G. Kleinau, S. Neumann, S. Costanzi, J. Jiang, J. Childress, B. M. Raaka, A. Colson, R. Paschke, G. Krause, C. J. Thomas, and M. C. Gershengorn, J. Med. Chem., 2006, 49, 3988.
120. A. Marchal, M. Melguizo, M. Nogueras, A. Sanchez, and J. N. Low, Synlett, 2002, 255.
121. Sanders W. J. et al. Discovery of potent inhibitors of dihydroneopterin aldolase using CrystaLEAD high-throughput X-ray crystallographic screening and structure-directed lead optimization //Journal of medicinal chemistry. – 2004. – T. 47. – №. 7. – C. 1709-1718.
122. Brown D. J. Chemistry of Heterocyclic Compounds. – Wiley-Interscience, 1994. – T. 52.
123. Ondi L., Lefebvre O., Schlosser M. Brominated 4- (Trifluoromethyl) pyrimidines: A Convenient Access to Versatile Intermediates //European journal of organic chemistry. – 2004. – T. 2004. – №. 17. – C. 3714-3718.
124. Undheim K. et al. Comprehensive Heterocyclic Chemistry //Katritzky, AR, Rees, CW, Scriven, EFV, and McKillop, A., Eds. – 1996. – C. 93.
125. S. von Angerer; in ‘Science of Synthesis’, D. E. Kaufmann and D. S. Matteson, Eds.; Thieme, Stuttgart, 2003, vol. 16, p. 379.
126. Ganguly N. C., De P., Dutta S. Mild regioselective monobromination of activated aromatics and heteroaromatics with N-bromosuccinimide in tetrabutylammonium bromide //Synthesis. – 2005. – T. 2005. – №. 07. – C. 1103-1108.
127. Smith M. B. et al. Regioselective One-Pot Bromination of Aromatic Amines1 //Organic letters. – 2002. – T. 4. – №. 14. – C. 2321-2323.
128. Hennequin L. F., Piva-Le Blanc S. Novel synthesis of oxindole quinazolines using solid phase multiparallel chemistry //Tetrahedron letters. – 1999. – T. 40. – №. 20. – C. 3881-3884.

129. Sugimoto O. et al. Application of phosphonium salts to the reactions of various kinds of amides // *Helvetica Chimica Acta*. – 2001. – Т. 84. – №. 5. – С. 1112-1118.
130. Ogan M. D., Tran S. B., Rinehart J. K. Synthesis of [¹³C₄, ¹⁵N₂] pyrrolo [2, 1- f][1, 2, 4] triazinone // *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals: The Official Journal of the International Isotope Society*. – 2006. – Т. 49. – №. 2. – С. 139-145.
131. Vlád G., Horváth I. T. Improved synthesis of 2, 2 ‘-bipyrimidine // *The Journal of organic chemistry*. – 2002. – Т. 67. – №. 18. – С. 6550-6552.
132. Takahashi T., Sugimoto O., Koshio J. Solvent-free reaction using phosphonium salts: Chlorination of hydroxyheteroaromatics and dehydration of primary amides // *Heterocycles*. – 2006. – Т. 68. – №. 9. – С. 1973-1979.
133. Lutz F., Kawasaki T., Soai K. Asymmetric autocatalysis of a ferrocene-containing chiral compound with amplification of chirality // *Tetrahedron: Asymmetry*. – 2006. – Т. 17. – №. 4. – С. 486-490.
134. Tavares F. X. et al. N-Phenyl-4-pyrazolo [1, 5-b] pyridazin-3-ylpyrimidin-2-amines as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase 3 with good cellular efficacy // *Journal of medicinal chemistry*. – 2004. – Т. 47. – №. 19. – С. 4716-4730.
135. Andres P., Marhold A. A new synthesis of 5-trifluoromethyluracil // *Journal of fluorine chemistry*. – 1996. – Т. 77. – №. 1. – С. 93-95.
136. Смит М.Б. и соавт. Региоселективное бромирование в одном сосуде ароматических аминов1 // *Органические буквы*. - 2002. - Т. 4. - №. 14. - С. 2321-2323.