**ГБОУ Школа на Юго-Востоке им. Маршала В.И. Чуйкова**

**Синтез ДНК-связывающих тиазолопиримидиниевых систем, содержащих диметиламиностирильные заместители**

**11 класс**

**ГБОУ Школа на Юго-Востоке им. Маршала В. И. Чуйкова**

**Ракитянский Данил Александрович**

**Научный руководитель:**

**к.х.н.,**

**ГБОУ Школа на Юго-Востоке им. Маршала В.И. Чуйкова**

**Папонов Борис Владимирович**

**Москва, 2023**

**Оглавление**

Введение и литературный обзор**2**

Экспериментальная часть**6**

Осуждение результатов**16**

Выводы **21**

Список литературы **21**

1. **Введение и литературный обзор**

Поиск, дизайн и синтез новых низкомолекулярных соединений с противоопухолевой активностью стал одной из важнейших целей в современной медицинской химии. Одну из наиболее эффективных групп химиотерапевтических агентов, используемых в химиотерапии рака, представляют молекулы, взаимодействующие с ДНК. При этом механизм связывания с макромолекулами ДНК, может носить различный характер, включая встраивание в малую борозду двойной спирали, алкилирование и интеркаляцию.

Интеркаляторы ДНК (молекулы, интеркалирующие между парами оснований ДНК) привлекли особое внимание из-за их высокой противоопухолевой активности. Например, ряд интеркалирующих ДНК производных акридина и антрациклина известны с 60-х годов 20-го столетия и широко представлены на рынке химиотерапевтических агентов. Однако клиническое применение этих соединений столкнулось с такими проблемами, как множественная лекарственная устойчивость (MЛУ) и вторичные и/или побочные эффекты. Эти недостатки мотивировали поиск новых соединений для использования либо вместо, либо в сочетании с существующими соединениями. К сожалению, этот поиск не оправдал возложенных на него ожиданий. Подавляющее большинство интеркаляторов ДНК, как соединения-кандидаты, испытанных в качестве противораковых агентов либо показали недостаточную биологическую активность или вовсе не показали заявленной биологической активности. Таким образом, появилось понимание, что одного связывания с макромолекулой ДНК недостаточно [1]. И изначально существовавшее предположение о прямой корреляции между энергией связывания малой молекулы и ДНК с ее противоопухолевой активностью [2-4] было опровергнуто.

Была показана необходимость дополнительного взаимодействия с белками, влияющими на процессы репликации [5]. И такими белками оказались отрытые в 70-е годы 20-го столетия ферменты – топоизомеразы первого и второго типа. [6-9].

В обзоре [10] описаны основные классы ингибиторов топоизомераз, проявляющих противоопухолевую активность и связывающихся с макромолекулами ДНК, образуя тройной комплекс ДНК-лиганд-белок. Также показано, что интеркаляция не является единственным способом связывания молекулы лиганда с ДНК. Встраивание в малую борозду двойной спирали также может эффективно ингибировать работу топоизомераз.



Рис. 1.1 Основные скаффолды противоопухолевых антибиотиков

К сожалению, общее число классов малых молекул, связывающихся с ДНК и, одновременно, проявляющих выраженную противоопухолевую и антибиотическую активность сравнительно невелико. Можно выделить аминоакридиновый (Рис 1.1а), антрациклиновый (Рис 1.1b) и камптотециновый (Рис 1.1с) скафолды.

В то же время, для многих других соединений отсутствует информация о системных исследованиях в этой области. Для некоторых известна возможность связывания с макромолекулами ДНК, для других есть данные об их антибактериальной и противоопухолевой активностях. Однако, отсутствуют данные о биологических мишенях и механизмах действия этих соединений.

Так, для известных метиновых красителей – солей 2- или 4-(4-диметиламиностирил)хинолиния (Рис. 2) антибактериальная активность известна с 1920-х г. [11-16], а противоопухолевая с начала 1950-х [17-19]. Значительное количество информации о исследованиях биологической активности солей хинолиния, в том числе, содержащих стирильные заместители, суммировано в обзоре [20]. При этом отмечено, что эти данные противоречивы и часто взаимоисключающие.



Рис. 1.2. Соли 2- или 4-(4-диметиламиностирил)хинолиния. Фармакофорные центры молекул выделены цветом.

На сегодня системные исследования биологической активности азиниевых, в том числе хинолиниевых солей, содержащих стирильные заместители системно ведутся только одной научной группой (Cosimo G. Fortuna University of Catania, Italy). Они исследуют противораковую и антибактериальную активность этого ряда соединений. Несмотря на значительное объем исследований, проведенных этой группой и ряд выводов о соотношениях структура-активность для исследуемых соединений [21-24] никаких предположений по механизму действия азиниевых солей, содержащих стирильные заместители, сделано не было; биологические мишени, с которыми должны связываться исследуемые молекулы, также не предложены.

В тоже время доказана способность азиниевых, в том числе хинолиниевых солей, содержащих стирильные заместители, связываться с ДНК и образовывать устойчивые высоколюминесцентные комплексы; показана возможность их использования в качестве маркеров G-квадруплексов [25, 26].

Таким образом, можно предположить, что выраженная противоопухолевая и антибактериальная активность азиниевых, в том числе хинолиниевых солей, содержащих стирильные заместители напрямую связана с их способностью связываться с макромолекулами ДНК. В то же время, механизм связывания однозначно не доказан. Существуют гипотезы о интеркаляции и встраивании в малую борозду двойной спирали, однако, не одна из них однозначно не доказана.

Не менее интересным и перспективным, но значительно меньше изученным является класс гетероциклических солей, содержащих один или несколько стирильных заместителей и узловой, кватернизованный атом азота.

Гетероароматические конденсированные системы, содержащие хотя бы один узловой кватернизованый атом азота, также называемые в англоязычной научной литературе «azonia», подразделяются на два подкласса – соли азиноазиния и соли азолоазиния [27]. Соли азиноазиния представляют собой конденсированные 6-членные гетероциклы, а азолоазиниевые соли – пятичленный гетероцикл, конденсированный с шестичленным (Рис. 1.3).



Рис. 1.3. Простейшие структуры катионов азиноазиния и азолоазиния

(Х,Y,Z,A – гетероатомы).

Широко известными природными представителями этого ряда соединений являются алкалоиды каролин и берберин, а также ряд других природных соединений (Рис. 1.4).



Рис. 1.4. Природные гетероароматические конденсированные системы, содержащие узловой кватернизованый атом азота.

Уже в 1960-е г. обнаружено, что каролин и берберин, содержащие узловой кватернизованый атом азота, могут связываться с ДНК [28]. Биологические свойства этих производных и их связывание с биомишенями активно изучаются до настоящего времени [29-31].

Во второй половине 1990-х годов было показано, что конденсированные гетероциклические системы на основе γ-карболина, содержащие узловой кватернизованный атом азота, проявляют свойства эффективных ДНК-интеркаляторов (Рис. 1.5) [32, 33]. Более того, проведенные исследования позволили сделать вывод о том, что производные хинолизиний бромида связываются преимущественно с парами оснований GC. Облучение ДНК в присутствии производных этих гетероциклических систем приводит к одноцепочечным разрывам в цепях нуклеиновой кислоты [34].



Рис. 1.5. ДНК-интеркаляторы, содержащие фрагмент карболина и узловой кватернизованный атом азота.

Дальнейшее изучение взаимодействия азолоазиниевых и хинозолиниевых систем с нуклеиновыми кислотами в условиях фотооблучения позволило сделать вывод об их фотоцитотоксичности и предположить возможность их использования в фотодинамической терапии раковых заболеваний [35]. В 2013 году было показано, что гетероциклические системы, содержащие узловой кватернизованный атом азота, обладают интенсивной флуоресценцией в ближней ИК-области и могут проявлять свойства эффективных клеточных красителей. Также была обнаружена их способность образовывать коньюгаты с макромолекулами ДНК, с одновременным усилением флуоресценции [36]. В 2017 в этом качестве впервые были использованы катионные метиновые красители, состоящие из хинозолиниевого компонента и сопряженного стирильного заместителя, как боковой цепи, содержащей электронодонорную группу [37]. Оказалось, что такие красители могут выступать в качестве маркеров митохондриальной ДНК [38] и сенсорных элементов на нитроредуктазу в митохондриях и лизосомах [39] (Рис. 1.6).



Рис. 1.6. Катионные метиновые красители, состоящие из хинозолиниевого компонента и сопряженного стирильного заместителя.

Соли хинозолиния, содержащие 2 диалкиламиностирильных фрагмента, были рассмотрены в качестве зондов для G-квадруплексов ДНК [40]. Также, диалкиламиностирильные производные алкалоида каролина были рассмотрены как флуоресцентные ДНК-зонды и клеточные красители [41] (Рис. 1.7).



Рис. 1.7. ДНК-связывающие соли хинозолиния, содержащие диалкиламиностирильные фрагменты.

Следует отметить, что все вышеописанные данные относятся к гетероароматическим конденсированным системам, содержащим узловой кватернизованый атом азота, на основе ядра хинозолиния. Взаимодействие азолоазиниевых систем (Рис. 1.8) с ДНК до настоящего времени остается практически неизученным. Впервые такое комплексообразование описано только в 2014 г. [42], что послужило отправной точкой исследования азолоазиниевых систем, как интеркаляторов и ДНК-зондов [43-45].



Рис 1.8. ДНК-интеркаляторы пиридазино-бензимидазолиевого ряда – первый пример ДНК-тропных азолоазиниевых систем (общая формула).

Несмотря на то, что синтетические подходы к получению азолоазиниевых систем на основе гетероциклического 5-6 бицикла известны с начала 1970-х г. [46, 47], а их синтез описан как реакция 5,7-диметилзамещенных солей азолопиримидиния с 4- диметиламинобензальдегидом, полученные азолазиниевые соли не были исследованы с точки зрения ДНК-тропности целевых продуктов. Дальнейшее развитие эти работы получили только через многие годы, став отправной точкой для синтеза ряда ДНК-связывающих солей хинозолиния, и азолоазиния содержащих диалкиламиностирильные фрагменты и описанных выше.

Несмотря на достаточно большой объем материалов по взаимодействию с ДНК и изучению спектрально-люминесцентных свойств гетероароматических конденсированных систем, содержащих узловой кватернизованый атом азота, их биологическая активность системно изучена только для алкалоида берберина [28-30]. В некоторых работах имеются отдельные данные по цитостатическому действию берберина и его аналогов, а также по перспективам их применения в фотодинамической терапии. Для азолоазиниевых систем отсутствует даже такая информация.

1. **Экспериментальная часть**

2-Аминотиазолы, 4-диметиламинобензальдегид, а также другие реагенты и растворители были куплены у коммерческих поставщиков и использовались без дальнейшей отчистки.

Спектры 1H ЯМР были зарегистрированы на спектрометре ЯМР Bruker AVANCE с рабочей частотой 600 МГц (Лаборатория магнитной томографии и спектроскопии ФФМ МГУ). Химические сдвиги приведены в δ-шкале и измерены относительно растворителя (DMSO-d6)

**Синтез перхлоратов 2-аминоазолов 2a-l**



Синтез перхлората 2а

В 5 мл 60% раствора хлорной кислоты малыми порциями растворяют 1 г (10 ммоль) 2-аминотиазола следя за тем, чтобы температура не поднималась выше 20-25ᵒС. Если температура оказывается выше, смесь охлаждают в ледяной бане. После добавления всего 2-аминотиазола, смесь охлаждают в морозильной камере в течение часа. Выпавшее вещество фильтруют под вакуумом.

Выход: 1,96 г (98%)

Синтез перхлората 2b

В 7 мл 60% раствора хлорной кислоты малыми порциями растворяют 2,28 г (20 ммоль) 2-амино-4-метилтиазола следя за тем, чтобы температура не поднималась выше 15-20ᵒС. Если температура оказывается выше, смесь охлаждают в ледяной бане. После добавления всего 2-амино-4-метилтиазола, смесь охлаждают в морозильной камере в течение часа. Выпавшее вещество фильтруют под вакуумом.

Выход: 4.08 г (95%)

Синтез перхлората 2c

1 г (5.67 ммоль) 2-амино-4-фенилтиазола растворяют в минимальном количестве (порядка 50 мл) 60% хлорной кислоты при температуре 80-90ᵒС. После добавления всего 2-амино-4-фенилтиазола, смесь охлаждают сначала при комнатной температуре, а затем в морозильной камере в течение часа. Выпавшее вещество фильтруют под вакуумом.

Выход: 1,43 г (91%)

Синтез перхлората 2d

1,19 г (5.67 ммоль) 2-амино-4-(4-хлорфенил)тиазола растворяют в минимальном количестве (порядка 50 мл) 60% хлорной кислоты при температуре 80-90ᵒС. После добавления всего 2-амино-4-(4-хлорфенил)тиазола, смесь охлаждают сначала при комнатной температуре, а затем в морозильной камере в течение часа. Выпавшее вещество фильтруют под вакуумом.

Выход: 1,57 г (89%)

Синтез перхлората 2e

1,45 г (5.67 ммоль) 2-амино-4-(4-бромфенил)тиазола растворяют в минимальном количестве (порядка 50 мл) 60% хлорной кислоты при температуре 80-90ᵒС. После добавления всего 2-амино-4-(4-бромфенил)тиазола, смесь охлаждают сначала при комнатной температуре, а затем в морозильной камере в течение часа. Выпавшее вещество фильтруют под вакуумом.

Выход: 1,88 г (93%)

Синтез перхлората 2f

3,08 г (20 ммоль) 2-амино-4,5,6,7-тетрагидробензо[d]тиазола растворяют в минимальном количестве (порядка 50 мл) 60% хлорной кислоты при температуре 80-90ᵒС. После добавления всего 2-амино-4,5,6,7-тетрагидробензо[d]тиазола, смесь охлаждают сначала при комнатной температуре, а затем в морозильной камере в течение часа. Выпавшее вещество фильтруют под вакуумом.

Выход: 4,57 г (90%)

Синтез перхлората 2g

1 г (6.66 ммоль) 2-аминобензотиазола растворяют в минимальном количестве (порядка 50 мл) 60% хлорной кислоты при температуре 80-90ᵒС. После добавления всего 2-аминобензотиазола, смесь охлаждают сначала при комнатной температуре, а затем в морозильной камере в течение часа. Выпавшее вещество фильтруют под вакуумом.

Выход: 1,6 г (96%)

Синтез перхлората 2l

1 г (6.09 ммоль) 2-амино-6-метилбензотиазола растворяют в минимальном количестве (порядка 50 мл) 60% хлорной кислоты при температуре 80-90ᵒС. После добавления всего 2-амино-6-метилбензотиазола, смесь охлаждают сначала при комнатной температуре, а затем в морозильной камере в течение часа. Выпавшее вещество фильтруют под вакуумом.

Выход: 1,5 г (93%)

**Синтез солей тиазолопиримидиния 3a-l**



Синтез соли тиазолопиримидиния 3а

В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.5 ммоль) перхлората 2-аминотиазола, 225 мг (2.25 ммоль) ацетилацетона, после чего смесь нагревают сначала до полного растворения компонентов реакционной смеси, а затем до застывания реакционной массы (суммарно 25-30 мин). Затем в колбу добавляют 10-15 мл спирта, нагревают до кипения, кипятят 5 мин. После остывания смеси осадок фильтруют под вакуумом.

Выход: 328 мг (83%)

Синтез соли тиазолопиримидиния 3b

В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.4 ммоль) перхлората 2-амино-4-метилтиазола, 210мг (2.10 ммоль) ацетилацетона, после чего смесь нагревают сначала до полного растворения компонентов реакционной смеси, а затем до застывания реакционной массы (суммарно 25-30 мин). Затем в колбу добавляют 10-15 мл спирта, нагревают до кипения, кипятят 5 мин. После остывания смеси осадок фильтруют под вакуумом.

Выход: 332 мг (85%)

Синтез соли тиазолопиримидиния 3c

В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.08 ммоль) перхлората 2-амино-4-фенилтиазола, 163 мг (1.63 ммоль) ацетилацетона, после чего смесь нагревают сначала до полного растворения компонентов реакционной смеси, а затем до застывания реакционной массы (суммарно 25-30 мин). Затем в колбу добавляют 10-15 мл спирта, нагревают до кипения, кипятят 5 мин. После остывания смеси осадок фильтруют под вакуумом.

Выход: 298 мг (81%)

Синтез соли тиазолопиримидиния 3d

В круглодонную колбу помещают 300 мг (0.8 ммоль) перхлората 2-амино-4-(4-хлорфенил)тиазола, 145 мг (1.45 ммоль) ацетилацетона, после чего смесь нагревают сначала до полного растворения компонентов реакционной смеси, а затем до застывания реакционной массы (суммарно 25-30 мин). Затем в колбу добавляют 10-15 мл спирта, нагревают до кипения, кипятят 5 мин. После остывания смеси осадок фильтруют под вакуумом.

Выход: 254 мг (70%)

Синтез соли тиазолопиримидиния 3e

В круглодонную колбу помещают 300 мг (0.844 ммоль) перхлората 2-амино-4-фенилтиазола, 127 мг (1.27 ммоль) ацетилацетона, после чего смесь нагревают сначала до полного растворения компонентов реакционной смеси, а затем до застывания реакционной массы (суммарно 25-30 мин). Затем в колбу добавляют 10-15 мл спирта, нагревают до кипения, кипятят 5 мин. После остывания смеси осадок фильтруют под вакуумом.

Выход: 265 мг (75%)

Синтез соли тиазолопиримидиния 3f

В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.18 ммоль) перхлората 2-амино-4-фенилтиазола, 177 мг (1.77 ммоль) ацетилацетона, после чего смесь нагревают сначала до полного растворения компонентов реакционной смеси, а затем до застывания реакционной массы (суммарно 25-30 мин). Затем в колбу добавляют 10-15 мл спирта, нагревают до кипения, кипятят 5 мин. После остывания смеси осадок фильтруют под вакуумом.

Выход: 285 мг (76%)

Синтез соли тиазолопиримидиния 3g

В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.2 ммоль) перхлората 2-аминобензотиазола, 180 мг (1.8 ммоль) ацетилацетона, после чего смесь нагревают сначала до полного растворения компонентов реакционной смеси, а затем до застывания реакционной массы (суммарно 25-30 мин). Затем в колбу добавляют 10-15 мл спирта, нагревают до кипения, кипятят 5 мин. После остывания смеси осадок фильтруют под вакуумом.

Выход: 297 мг (79%)

Синтез соли тиазолопиримидиния 2l

В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.13 ммоль) перхлората 2-амино-6-метилбензотиазола, 170 мг (1.7 ммоль) ацетилацетона, после чего смесь нагревают сначала до полного растворения компонентов реакционной смеси, а затем до застывания реакционной массы (суммарно 25-30 мин). Затем в колбу добавляют 10-15 мл спирта, нагревают до кипения, кипятят 5мин. После остывания смеси осадок фильтруют под вакуумом.

Выход: 305 мг (82%)

**Синтез солей тиазолопиримидиния содержащих одну 4-диметиламиностирильную группу 4a-l**



Синтез целевого соединения 4a

В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.13 ммоль) исходной соли 3a, 169 мг (1.13 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 40 минут (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 345мг (77%)

Синтез целевого соединения 4b

В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.08 ммоль) исходной соли 3b, 161 мг (1.08 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл ДМФА, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 50 минут (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 331 мг (75%)

Синтез целевого соединения 4c

 В круглодонную колбу помещают 300 мг (0.88 ммоль) исходной соли 3c, 131 мг (0.88 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 1 час (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 298 мг (72%)

Синтез целевого соединения 4d

 В круглодонную колбу помещают 300 мг (0.8 ммоль) исходной соли 3d, 119 мг (0.8 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 1 час (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 288 мг (71%)

Синтез целевого соединения 4e

 В круглодонную колбу помещают 300 мг (0.715 ммоль) исходной соли 3e, 107 мг (0.715 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 1 час (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 275 мг (70%)

Синтез целевого соединения 4f

 В круглодонную колбу помещают 300 мг (0.941 ммоль) исходной соли 3f, 140 мг (0.941 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 1 час (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 293 мг (69%)

Синтез целевого соединения 4g

 В круглодонную колбу помещают 300мг (0.95ммоль) исходной соли, 142мг (0.95ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл ДМФА, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 30 минут (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 323мг (76%)

Синтез целевого соединения 4l

 В круглодонную колбу помещают 300мг (0.912ммоль) исходной соли, 136мг (0.912ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл ДМФА, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 35 минут (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 310мг (74%)

**Синтез солей тиазолопиримидиния содержащих две 4-диметиламиностирильные группы 5a-d**



Синтез целевого соединения 5a

 В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.13 ммоль) исходной соли, 845 мг (5.67 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 8 часов (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 463 мг (73%)

Синтез целевого соединения 5b

 В круглодонную колбу помещают 300 мг (1.08 ммоль) исходной соли, 321 мг (2.15 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 2 часа (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 437 мг (75%)

Синтез целевого соединения 5e

 В круглодонную колбу помещают 300 мг (0.715 ммоль) исходной соли, 320 мг (2.14 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время 5 часов (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 338 мг (69%)

Синтез целевого соединения 5g

 В круглодонную колбу помещают 300 мг (0.953 ммоль) исходной соли, 284 мг (1.91 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3 мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 45-50 минут (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 385 мг (70%)

Синтез целевого соединения 5l

 В круглодонную колбу помещают 300 мг (0.912 ммоль) исходной соли, 272 мг (1.83 ммоль) 4-диметиламинобензальдегида и 3мл пропионового ангидрида, после чего нагревают реакционную смесь до завершения протекания реакции. Приблизительное время реакции 45 минут (Контроль по ТСХ – пластинки silufol, элюент – смесь Бутанол-1:уксусная кислота:вода 4:4:1, ). Затем осадок выпавшего вещества фильтруют под вакуумом.

Выход: 383 мг (71%)

**3.Осуждение результатов**

Как было показано в обзоре литературных данных, гетероциклические системы содержащие узловой кватернизованный атом азота и один или два диметиламиностирильных заместителя могут проявлять выраженную противоопухолевую и антибактериальную активность, а также связываться с макромолекулами ДНК. Соли тиазолопиримидиния по нашему мнению могут успешно выступать в качестве таких гетероциклических систем. В солях тиазолопиримидиния содержащих диметиламиностирильные заместители довольно легко угадывается ретрон Кнёвенагеля. Иными словами, конденсация 4-диметиламинобензальда с солями тиазолопиримидиния, содержащими активные метильные группы является удобным синтетическим подходом для формирования целевых соединений. Соли тиазолопиримидиния в свою очередь легко доступны исходя из перхлоратов 2-аминотиазолов и ацетилацетона. Таким образом схему ретросинтетического анализа можно представить следующим образом:



Схема 4.1: схема ретросинтетического анализа

Исходя из схемы ретросинтетического анализа можно легко представить схему синтеза целевых соединений первой ее стадией является получение перхлоратов 2-аминотиазолов 2a-l исходя из свободных оснований 2-аминотиазолов и хлорной кислоты. Следующая стадия заключалась во взаимодействии перхлоратов 2-аминотиазолов 2a-l с полуторным избытком ацетилацетона, в результате чего были получены соли тиазолопиримидиния, содержащие две активированные метильные группы в пиримидиниевом кольце гетероциклического ядра 3a-l. На последней стадии была проведена конденсация солей 3a-l с 4-диметиламинобензальдегидом, в ходе чего возник вопрос региоселективности. Следует отметить, что метильная группа, находящая в α-положении по отношению к кватернизованному атому более реакционно способна, именно она первая вступает в конденсацию. Для получения целевых солей тиазолопиримииния содержащих одну 4-диметиламиностирильную группу 4a,c,d,e,f исходя из солей 3a,c,d,e,f соответственно была проведена реакция с 1 эквивалентом 4-диметиламинобензальдегида в пропионовом ангидриде. В тоже время в виду более высокой реакционной способности солей 3b,g,l попытки ввести их в реакцию Кнёвенагеля используя в качестве растворителя пропионовый ангидрид окончились неудачей – во всех случаях выделялась смесь продуктов стехиометрии 1:1 и 1:2 (соль-альдегид) (продуктов конденсации по одной или обеим метильным группам). При этом, конденсация проводимая в ДМФА для солей 3b,g,l позволила селективно получить моно-диметиламиностерилпроизводные 4b,g,l.солей. Для селективного получения продуктов 5a,e необходимо использовать большой избыток альдегида – от 3 до 5 эквивалентов. В тоже время получение соединений 5b,g,l успешно осуществляется при стехиометрическом соотношении 1:2 (схема 4.2).



Схема 4.2 общий синтетический подход

Строение целевых соединений 4a-l и 5a,b,e,g,l было подтверждено при помощи ЯМР 1Н спектроскопии. Так в спектре соединения 4l снятом в DMSO-d6 проявляются сигналы метильных групп бензотиазолиевого и пиримидиниевого фрагментов молекулы, в виде синглетов с интегральной интенсивностью 3 протона каждый, с химическими сдвигами 2.62 м.д. и 3.44 м.д., соответственно . Сигналы протонов NMe2 группы проявляются в виде синглета интегральной интенсивностью в 6 протонов, с химическим сдвигов 3.11 м.д. В области ароматических протонов проявляются сигналы 4-диметиламиностирильного заместителя, в виде AB-системы протонов при двойной связи, с химическими сдвигами 7.21 м.д. и 8.28 м.д. соответственно. Более слабопольный сигнал принадлежит протону ближнему к гетероциклической системе. Смещение этого сигнала в область слабых полей обусловлена экранированием этого протона четвертичным атомом азота. Константа 15.5Гц говорит о существовании 4-диметиламиностерильного фрагмента в Е-конфигурации. Сигналы орто и пара протонов арильного фрагмента проявляются в виде двух дублетов, с константой 8.8Гц с интегральной интенсивностью в два протона каждый. Химические сдвиг этих сигналов 6.83 м.д. и 7.75 м.д. для о- и м- протонов соответственно. Сигналы фениленового фрагмента проявляются в виде двух дублетов и одного синглета с химическими сдвигами 7.70 м.д., 8.52 м.д. и 7.97 м.д. соответственно. Синглет протона пиримидиниевого ядра молекулы проявляется с химическим сдвигом 8.25 м.д., рис 4.1.



Рис 4.1

В 1Н спектре соединения 5l снятом в DMSO-d6 проявляются сигналы метильной группы бензотиазолиевого фрагмента молекулы в виде синглета интегральной интензивностью 3 протона, с химическим сдвигов 2.50 м.д. Сигналы протонов метильных групп двух диметиламиностирильных заместителей проявляются в виде синглетов интенсианостью 6 протонов каждый при 3.02 м.д. и 3.06 м.д. соответственно в области ароматических протонов проявляются сигналы двух 4-диметиламиностирильных фрагментов молекулы. Сигналы протонов ароматических колец двух пар дублетов интегральной интенсивностью 2 протона каждый с химическими сдвигами 6.74 м.д., 6.82 м.д. и 7.58 м.д., 7.71 м.д.. АВ-система протонов двойных связей проявляются в виде двух пар дублетов интегральной интенсивностью один протон каждый при 7.11 м.д. и 7.83 м.д. для одной пары и 7.45 м.д., 8.13 м.д. для другой пары. Константы соответственно 15.5 и 15.7Гц, дублет при 8.13 м.д. перекрыт сигналом ароматических протонов пиримидиниевого кольца и дублетом протона фениленового фрагмента молекулы, но вычленяется при анализе мультиплета. Второй дублет протона фениленового ядра при 7.58 м.д.. Синглет протона фениленового ядра проявляется при 8.03м.д. рис 4.2.



Рис. 4.2

Все целевые соединения флюоресцируют в красной или NIR-облостях и могут выступать в качестве флуоресцентных красителей, при этом отмечается приоритетное окрашивание структур и органелл клетки содержащих нуклеиновые кислоты, таких ка: ядро, ядрыщко и митохондрии. Исходя из этого можно предположить, что целевые соединения могут эффективно связываться с макромолекулами ДНК, выступая в роли интеркаляторов либо встраиваясь в малую борозду макромолекулы нуклеиновой кислоты рис. 4.3.1 и рис 4.3.2:



Рис 4.3.1 клетки буккального эпителия человека, прокрашенные 4g, флуоресцентный микроскоп

**.**

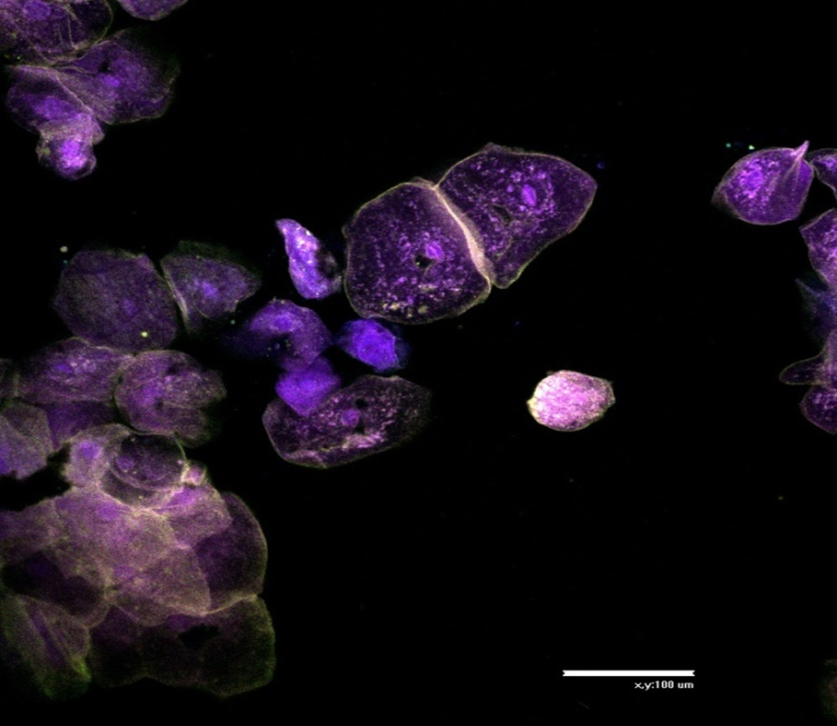


Рис 4.3.2 клетки буккального эпителия человека, прокрашенные 4g, конфокальный микроскоп

Для подтверждения этой гипотезы на качественном уровне было исследовано взаимодействие раствора соединения 4g с водным раствором днк. Так при добавлении водного раствора ДНК к водному водному раствору соединения 4g наблюдалось значительное углубление окраски раствора, что говорит об образовании устойчивого комплекса с ДНК рис 4.4.



Рис 4.4 водные растворы соединения 3с (слева) и его комплекса с ДНК (справа)

Таким образом нами однозначно показано, что соли тиазолопиримидиния содержащие узловой кватернизованный атом азота и 1 или 2 диметиламиностирильных заместителя могут связываться с макромолекулами ДНК, выступать в роли люминесцентных клеточных красителей и с большой вероятностью обладать противораковыми и антибактериальными свойствами.

**4.Выводы**

* Целевые соли тиазолопиримидиния, содержащие 4-диметиламиностирильные заместители были синтезированы 4-х стадийным синтезом из 2-аминотиазолов 1a-l
* Все синтезированные соединения были охарактеризованы методами ЯМР спектроскопии
* Синтезированные соединения были протестированны и показали способность к связывании с ДНК.

**5.Список литературы**

**1.** Martinez R. Chacon-Garsia L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs:

What it Worked and What did not Work. Current Medicinal Chemistry, 2005, 12, 127-

151.

2. Fink, S. L; Leo, A; Yamakawa, M.; Hansch, C; Quinn, F. R. Farmaco, 1980, 35, 965.

3. Denny, W. A.; Atwell, G,J.; Cain, B. F; Leo, A.; Panthananickal, A.; Hansch. C. J. Med.Chem., 1982, 25, 276.

4. Hartley, J. A.; Reszco, K; Zuo, E. T.; Wilson, W. D.; Morgan, A. R.; Lown, J. W. Mol.

Pharmacol., 1988, 33, 265.

5. Baguley, B. C. In Anticancer Drug Development, Baguley B. C.; Kerr, D. J. Ed.; Academic Press 2002, pp. 4-5.

6. Wang J.C. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. Journal of

Molecular Biology. 55 (3): 523–533.

7. Champoux J.J., Dulbecco R. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 69 (1): 143–146.

8. Gellert M., Mizuuchi K., O&R;Dea M.H., Nash H.A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 73 (11): 3872–3876.

9. Sugino A., Peebles C.L., Kreuzer K.N., Cozzarelli N.R. Mechanism of action of

nalidixic acid: purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to

DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74 (11): 4767–4771.

10. Л.Г. Деженкова, В.Б. Цветков, А.А. Штиль. Ингибиторы топоизомераз I и II:

химическая структура, механизмы действия и роль в химиотерапии опухолей

Успехи химии, 2014, 83 (1), 82–94.

11. С Η. Browning , J. B. Cohen , S. Ε11ingwоrth, R. Gu1bгansen, Brit. Med. J., 2, 326 (1923).

12. С Η. Browning , J. B. Cohen , S. Ε11ingwоrth, R. Gu1bгansen, Proc. Roy. Soc , B, 100,

293 (1926).

13. С Η. Browning , J. B. Cohen , S. Ellingworlh , R. Gulbransen , Там же, В, 103, -Ш

(1928).

14. С. Η. Browning , J. В. Cohen , S. Ellingworlh , R. Gulbransen, Там же, В, 105, 99

(1929).

15. G. Агmitage, J. Gordon , J. B. Cohen , S. Ellingworlh, Lancet, 217, 968 (1929).

16. C. IT. Browning, J. B. Cohen , S. Ellingworlh , R. Gulbransen, Proc. &#39;Roy. Soc. B, 108, 119 (1931).

17. Carl T. Bahner, Edwin S. Pace, and Robert Prevost. Quaternary Salts of Styryl Pyridines and Quinolines J. Am. Chem. Soc. 1951, 73, 7, 3407–3408

18. В Hughes, A. L. Bates, С. Т. Вahner, Μ. Lewis, Proc. Soc. Exptl. Biol.and Med., 88, 230 (1955).

19. M. R. Lewis , B. Hughes , Anat. Res., 121, 329 (1955).

20. Б.М. Гуцуляк. Соли хинолиния как биологически активные вещества. Успехи

химии, 1972, 41 (2), 346–374.

21. Cosimo G. Fortuna, Vincenza Barresi, Carmela Bonaccorso, Giuseppe Consiglio,

Salvatore Failla, Angela Trovato-Salinaro, Giuseppe Musumarra. Design, synthesis and

in vitro antitumour activity of new heteroaryl ethylenes. European Journal of Medicinal

Chemistry, V47, 2012, Pages 221-227.

22. Vincenza Barresi, Carmela Bonaccorso, Giuseppe Consiglio, Laura Goracci, Nicolo`

Musso, Giuseppe Musumarra, Cristina Satriano and Cosimo G. Fortuna. Modeling,

design and synthesis of new heteroaryl ethylenes active against the MCF-7 breast cancer

cell-line. Mol. BioSyst., 2013, 9, 2426.

23. Dafne Bongiorno, Nicolò Musso, Paolo G. Bonacci, Dalida A. Bivona, Mariacristina

Massimino, Stefano Stracquadanio, Carmela Bonaccorso, Cosimo G. Fortuna and

Stefania Stefani. Heteroaryl-ethylenes as new lead compounds in the fight against high

priority bacterial strains. Antibiotics 2021, 10(9), 1034.

24. Heteroaryl-Ethylenes as New Effective Agents for High Priority Gram-Positive and

Gram-Negative Bacterial Clinical Isolates. Antibiotics 2022, 11(6), 767.

25. Xiao Xie, Michela Zuffo, Marie-Paule Teulade-Fichou and Anton Granzhan.

Identification of optimal fluorescent probes for G-quadruplex nucleic acids through

systematic exploration of mono- and distyryl dye libraries Beilstein J. Org. Chem. 2019,

15, 1872–1889.

26. Wei LongWei Long, Bo-Xin Zheng, Xuan-He Huang, Meng-Ting She, Ao-Lu Liu, Kun Zhang, Wing-Leung Wong, and Yu-Jing Lu. Molecular recognition and imaging of

human telomeric g-quadruplex dna in live cells: a systematic advancement of thiazole

orange scaffold to enhance binding specificity and inhibition of gene expression. J. Med.

Chem. 2021, 64, 4, 2125–2138.

27. Sucunza D., et al., J. Org. Chem., 2016, 81, 10126.

28. Krey A. K., et al., Science, 1969, 166, 755.

29. Куликов К.Г., Ж. Тех. Физ., 2015, 85, 5.

30. Bhadra K. et al., Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2008, 1780, 1054.

31. Bazzicalupi C., et al., Nucleic Acids Research, 2013, 41, 632.

32. Molina A., et al., Bioorg. &amp; Med. Chem. Lett., 1996, 6, 1453.

33. Molina A., et al., J. Org. Chem. 1996, 61, 5587.

34. Ihmels H., et al., Eur. J. Org. Chem., 2001, 1157.

35. Prasad P., et al., Dalton Trans., 2013, 42, 4436.

36. Bortolozzi R., et al., Chem. Eur. J., 2013, 19, 8736.

37. Xin-Long Sha, et al., Org. Chem. Front., 2018, 5, 555.

38. Yuan Chen, et al., Sensors and Actuators B: Chemical, 2019, 281, 499.

39. Xin-LongSha, et al., Sensors and Actuators B: Chemical, 2020, 307, 127653.

40. Xiao Xie, et al., Beilstein J. Org. Chem. 2019, 15, 1872.

41. Pithan P. M. et al., RSC Adv., 2017, 7, 10660.

42. Suárez R. M. et al., Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 527.

43. Bosch P., et al., Dyes Pigments, 2017, 138.

44. Bosch P., et al., Org Chem Front, 2018, 5, 1916.

45. Bosch P., et al., Dyes Pigments, 2021, 192, 109443.

46. Чуйгук В. А., et al., Укр. Хим. Ж., 1973, 39, 1163.

47. Chuiguk V. А., et al., Chem. Heterocycl. Comp., 1982, 18, 762.