

*На правах рукописи*

**Вигоров Алексей Юрьевич**

**Синтез и исследование стереоизомеров производных  
4-амино-5-оксопролина**

02.00.03 – Органическая химия

**А в т о р е ф е р а т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2008



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Аминокислоты и их производные используются в органическом синтезе в качестве хиральных строительных блоков, компонентов катализаторов асимметрического синтеза, исходных соединений для создания расщепляющих агентов для разделения энантиомеров. Глутаминовая кислота (ГК) и ее лактам 5-оксопролин играют исключительно важную роль в обмене веществ живых организмов. ГК участвует в обмене азота, является возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе и наряду с 5-оксопролином входит в состав некоторых нейропептидов и пептидных гормонов. Среди производных и структурных аналогов ГК и 5-оксопролина имеются мощные агонисты и антагонисты нейрорецепторов глутамата, причастных к нейрональной регуляции многих физиологических функций организма. Включение модифицированных ГК и 5-оксопролина в пептидные структуры изменяет особенности биологического действия последних, в частности, может повышать устойчивость таких структур к ферментативной деградации. Поэтому поиск рациональных путей синтеза индивидуальных стереоизомеров производных глутаминовой кислоты и 5-оксопролина является весьма **актуальным**.

Производные 4-амино-5-оксопролина и 4-аминоглутаминовой кислоты, имеющие в положении 4 вторичную и третичную аминогруппы, а также производные 4-амино-1-арил-5-оксопролинов изучены недостаточно, и в настоящее время отсутствуют общие стереонаправленные методы синтеза таких соединений.

**Целью работы** являлась разработка методов синтеза стереоизомеров ряда новых производных 4-амино-5-оксопролина и 4-аминоглутаминовой кислоты, а также исследование свойств синтезированных соединений.

**Научная новизна.** Разработан оригинальный метод синтеза стереоизомеров ранее не описанных производных 4-амино-5-оксопролина путем нуклеофильного замещения галогена в 4-галогенпроизводных глутаминовой кислоты с последующим разделением диастереомеров, удалением защитных групп и замыканием лактамного цикла. Установлено, что хемо- и стереоселективность взаимодействия диметилового эфира (2*S*,4*RS*)-4-бром-*N*-фталоилглутаминовой кислоты с аминами существенно зависят от строения амина и условий синтеза.

Впервые показано, что удаление защитных групп диметиловых эфиров 4-аминозамещенных *N*-фталоилглутаминовых кислот с третичной аминогруппой в условиях кислотного гидролиза сопровождается частичной эпимеризацией, протекающей вследствие рацемизации преимущественно по С(4)-хиральному центру, а также циклизацией 4-аминозамещенных глутаминовых кислот в соответствующие 5-оксопролины. Частичная рацемизация в данном случае не препятствует получению оптически чистых стереоизомеров, поскольку конфигурация С(2)-хирального центра сохраняется. Установлено, что при изменении последовательности и условий удаления защитных групп диметиловых эфиров 4-аминозамещенных *N*-фталоилглутаминовых

кислот со вторичной ариламиногруппой могут быть получены структурно изомерные (2*S*,4*S*)-4-амино-1-арил-5-оксопролины и (2*S*,4*S*)-4-ариламино-5-оксопролины.

Для стереоизомеров производных 4-амино-5-оксопролина впервые исследована устойчивость лактамного цикла в кислой, нейтральной и щелочной средах. Показано, что относительная устойчивость пятичленного лактамного цикла в кислой среде существенно зависит от строения и конфигурации соединений.

Впервые исследовано восстановление стереоизомеров эфиров 4-аминозамещенных 5-оксопролинов до соответствующих эфиров пролинов и пролинолов.

**Практическая значимость.** Разработаны методы синтеза стереоизомеров ранее неизвестных 4-аминозамещенных 5-оксопролинов с третичной и вторичной аминогруппами, а также 1-арилзамещенных 4-амино-5-оксопролинов. Разработан метод получения производных (2*S*,4*S*)-4-амино-2-оксиметилпирролидина (4-аминопролинола). Среди синтезированных соединений выявлены ингибиторы ангиогенеза, не уступающие по активности известным препаратам, используемым в клинике, что делает перспективным дальнейшее исследование противоопухолевой активности в ряду данных соединений.

**Апробация работы.** По теме диссертации опубликовано 3 статьи в научных журналах и 1 статья в сборнике. Материалы диссертации представлены на 3 международных (Санкт-Петербург, Россия, 2005; Судак, Украина, 2006; Дублин, Ирландия, 2007) и 9 российских (Новосибирск, 2001; Екатеринбург, 2002, 2006; Казань, 2003; Москва, 2006; Москва, 2006; Пермь, 2006; Уфа, 2007; Омск, 2008) конференциях. Диссертация выполнена как часть плановых научно-исследовательских работ, проводимых в ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН по теме: «Новые подходы к синтезу стереоизомеров 4-замещенных 5-оксопролинов и карбораниламино кислот» (гос. рег. № 0120.0 601954), в рамках проектов РФФИ-Урал № 01-03-96424 и № 04-03-96006, Программы поддержки ведущих научных школ (грант НШ 1766.2003.3) и Молодежных конкурсных проектов УрО РАН (2004, 2008 гг.).

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, 7 глав, выводов, списка литературы (155 наименований) и приложения. Объем работы 156 страниц машинописного текста, 23 рисунков и 8 таблиц. В главе 1 приведен аналитический обзор современных методов синтеза производных 4-амино-5-оксопролина.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

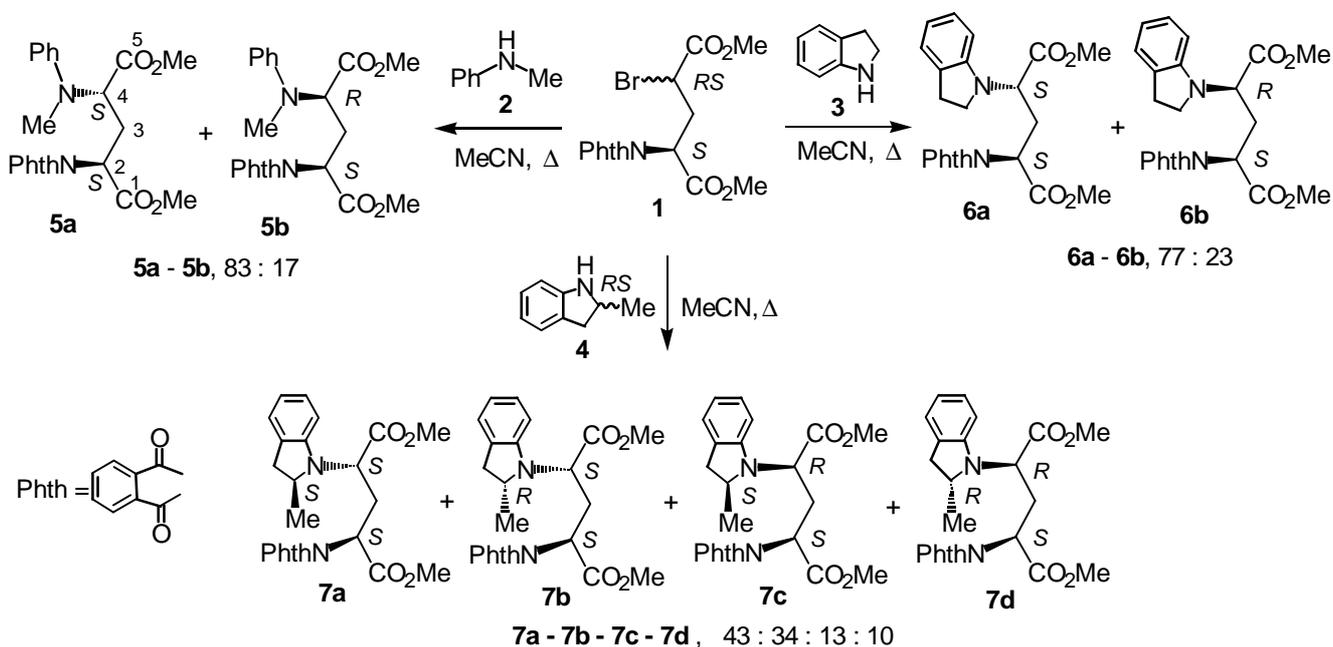
### Глава 2. Синтез стереоизомеров диметилловых эфиров 4-аминозамещенных *N*-фталоилглутаминовых кислот

В качестве исходного соединения для синтеза стереоизомеров диметилловых эфиров 4-аминозамещенных *N*-фталоилглутаминовых кислот использовали диметилловый эфир (2*S*,4*RS*)-4-бром-*N*-фталоилглутаминовой кислоты (**1**),

синтезированный из (*S*)-глутаминовой кислоты. Соединение **1** является смесью диастереомеров (*S*)-ряда и не содержит примеси производных (*R*)-ряда (по данным ВЭЖХ на колонках с хиральными сорбентами).

### 2.1. Взаимодействие диметилового эфира (2*S*,4*RS*)-4-бром-*N*-фталойлглутаминовой кислоты с ароматическими аминами

Проведено исследование взаимодействия бромпроизводного **1** с вторичными жирноароматическими аминами **2–4**. Установлено, что в результате реакции соединения **1** с аминами **2** и **3** образуются с выходами 97–98% продукты нуклеофильного замещения – смеси диастереомерных диметилвых эфиров, **5a,b** и **6a,b**, соответственно, а при взаимодействии с рацемическим амином **4** образуется смесь четырех диастереомерных диметилвых эфиров **7a–d** (ЯМР <sup>1</sup>H, ВЭЖХ).



Установлено, что нуклеофильное замещение галогена в бромпроизводном **1** на остатки ариламинов **2–4** протекает диастереоселективно (вследствие динамического кинетического разделения) с образованием избытка *трео*-диастереомеров продуктов. Соотношения диастереомерных продуктов в реакционных смесях практически не зависят от исходного соотношения диастереомеров соединения **1** и составляют **5a–5b**, 83 : 17; **6a–6b**, 77 : 23; **7a–7b–7c–7d**, 43 : 34 : 13 : 10 (ЯМР <sup>1</sup>H).

Диастереомеры **5a** (*de* 96%), **6a** (*de* 97%) и **7a** (*de* 92%) выделены из соответствующих диастереомерных смесей кристаллизацией с выходами, соответственно, 55%, 56% и 18%. Выделения индивидуальных диастереомеров **5b** и **6b** не проводили, о строении данных соединений судили на основании результатов спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и элементного анализа диастереомерных смесей **5a,b** и **6a,b**. Смеси, обогащенные диастереомерами **7b** (*de* 33%), **7c** (*de* 84%), и смесь **7c–7d**, 1 : 1 выделены хроматографически.

Отнесение конфигурации фрагмента глутаминовой кислоты к *трео*- или к

*эритро*-ряду в диастереомерах соединений **5–7** проводили по данным спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  на основании того, что разность химических сдвигов протонов группы  $\text{C}(3)\text{H}_\text{A}\text{H}_\text{B}$  для 4-замещенных диметилловых эфиров *N*-фталлоилглутаминовой кислоты, имеющих *трео*-конфигурацию, меньше, чем у *эритро*-диастереомеров. Рацемизации по  $\text{C}(2)$ -хиральному центру в процессе взаимодействия бромпроизводного **1** со вторичными ароматическими аминами **2–4** не наблюдается. Для определения конфигурации фрагмента 2-метилиндолина в соединениях **7a–d** проведено взаимодействие (*S*)-2-метилиндолина с бромпроизводным **1**, приводящее к соединениям **7a** и **7c**. Конфигурация диастереомеров **5a** и **7a** подтверждена данными РСА (рис. 2.1.1 и 2.1.2).

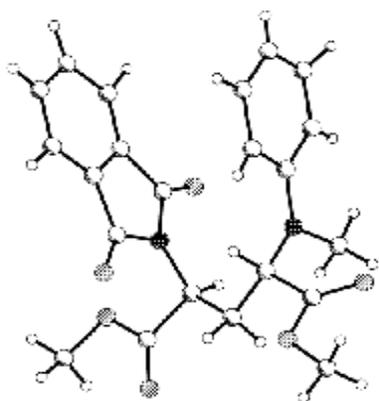


Рис. 2.1.1. Строение молекулы соединения **5a** по данным РСА

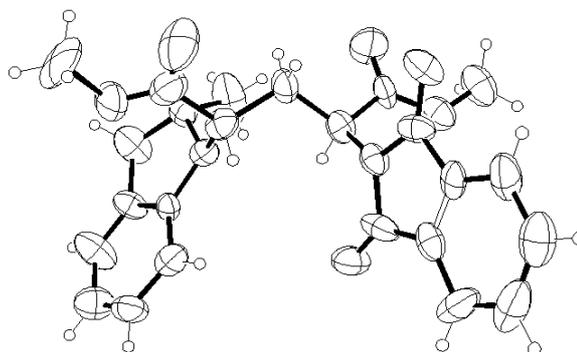
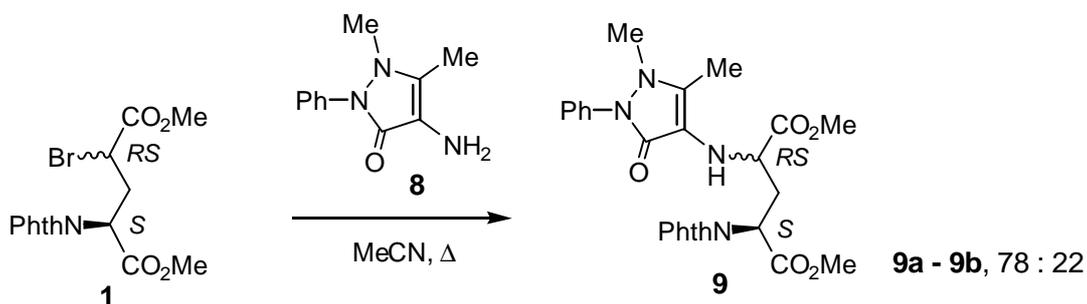


Рис. 2.1.2. Строение молекулы соединения **7a** по данным РСА

Установлено, что взаимодействие бромпроизводного **1** с 4-аминоантипирином (**8**) приводит к смеси диастереомеров **9a–9b**, 78 : 22 (ВЭЖХ). Диастереомер **9a** (*de* > 99%) выделен кристаллизацией с выходом 40%, строение и (2*S*,4*S*)-конфигурация подтверждены спектральными данными и данными РСА (рис. 2.1.3). Таким образом, 4-аминоантипирин реагирует с бромпроизводным **1** подобно вторичным ароматическим аминам.



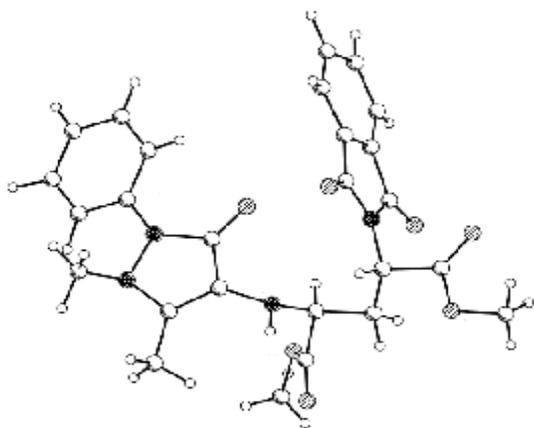


Рис. 2.1.3. Строение молекулы соединения **9a** по данным РСА

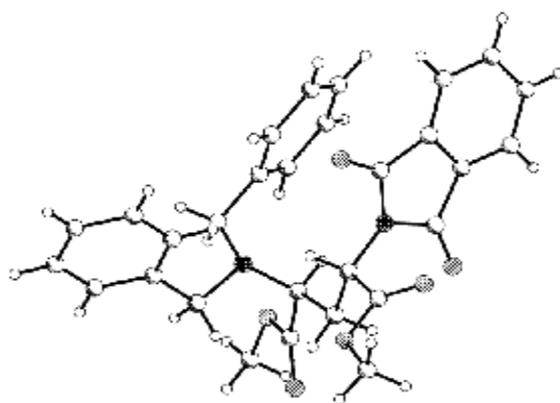
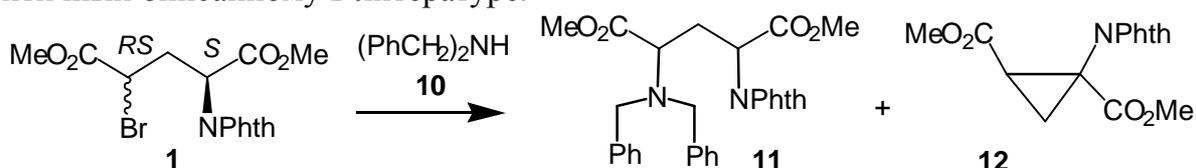


Рис. 2.2.1. Строение молекулы соединения **11a** по данным РСА

## 2.2. Взаимодействие диметилового эфира (2*S*,4*RS*)-4-бром-*N*-фталойлглутаминовой кислоты с алифатическими аминами

Исследовано взаимодействие бромпроизводного **1** с вторичными алифатическими аминами: дибензиламином (**10**) и пиперидином (**13**). Установлено, что при взаимодействии бромпроизводного **1** с амином **10** помимо целевого продукта нуклеофильного замещения **11** образуется продукт  $\gamma$ -элиминирования  $\text{HBr}$  **12**, идентичный описанному в литературе.



С целью оптимизации условий синтеза целевого соединения **11** исследовано взаимодействие соединения **1** с дибензиламином в различных растворителях при кипячении (10 ч) и при 20 °С (14 суток).

**Таблица 2.2.1.** Результаты взаимодействия **1** с дибензиламином при кипячении в течение 10 ч (исходное мольное соотношение **10** – **1**, 2,8 : 1) по данным спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и ВЭЖХ

Растворитель	Т кип. растворителя, °С	Состав реакционной смеси, мол. %		
		<b>1</b>	<b>11 (11a–11b)</b>	<b>12</b>
Диоксан	101	25	75 (50 : 50)	–
Бензол	80	22	78 (48 : 52)	–
Ацетонитрил	82	14	76 (49 : 51)	10
Метанол	65	–	19 (45 : 55)	81

**Таблица 2.2.2.** Результаты взаимодействия **1** с дибензиламином при 20 °С в течение 14 суток (исходное мольное соотношение **10** – **1**, 2,8 : 1) по данным спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и ВЭЖХ

Растворитель	Состав реакционной смеси, мол. %		
	<b>1</b>	<b>11 (11a–11b)</b>	<b>12</b>
Диоксан	88	12 (50 : 50)	–
Бензол	82	18 (40 : 60)	–
Ацетонитрил	14	79 (44 : 56)	7
Метанол	2	16 (41 : 59)	82

Препаративный синтез соединения **11** проводили в бензоле при кипячении в течение 20 ч, выход 94%. В данных условиях побочный продукт **12** образовывался в следовых количествах, а соотношение диастереомеров **11a–11b** составляло 43 : 57. Диастереомер **11a** (*de* 97%) выделен кристаллизацией. Смесь, обогащенная диастереомером **11b** (*de* 62%), выделена хроматографически. Диастереомеры **11a** и **11b** относили к *трео*- или к *эритро*-ряду на основании данных спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и РСА. Согласно данным РСА (рис. 2.2.1) соединение **11a** представляет собой диастереомерный рацемат (*трео*-).

При исследовании взаимодействия бромпроизводного **1** с пиперидином (**13**) установлено, что наряду с целевым продуктом **14** образуется соединение **12**, а также соединения **15** и **16**.

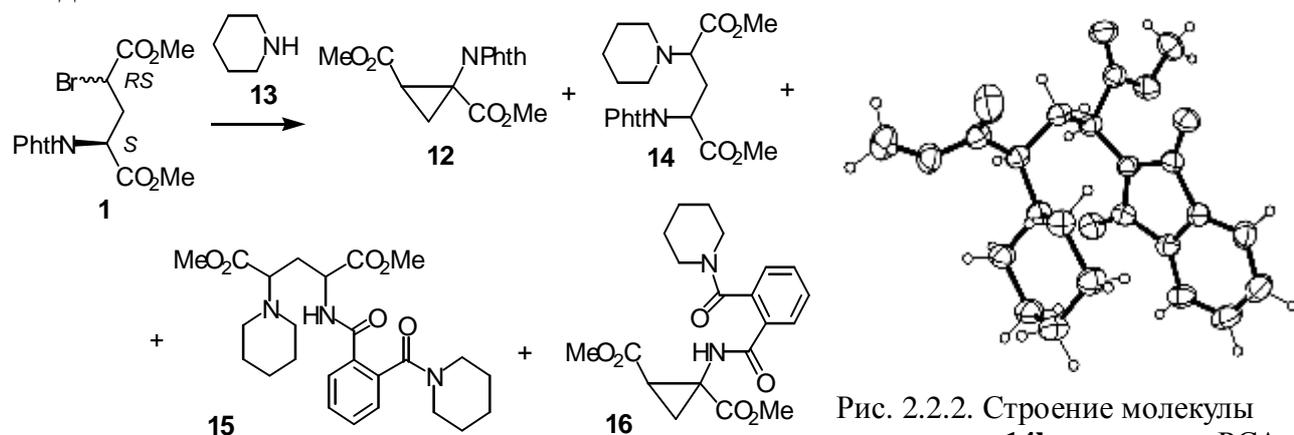


Рис. 2.2.2. Строение молекулы соединения **14b** по данным РСА

С целью оптимизации условий синтеза целевого продукта нуклеофильного замещения **14** исследовано взаимодействие бромпроизводного **1** с пиперидином в бензоле и метаноле при 20 °С, а также в бензоле при кипячении. Установлено (табл. 2.2.1–2.2.3), что при взаимодействии бромпроизводного **1** с вторичными алифатическими аминами **10** и **13** в метаноле продукт  $\gamma$ -элиминирования (соединение **12**) становится преобладающим, в то время как в исследованных апротонных растворителях (полярных и неполярных) преобладают продукты нуклеофильного замещения брома.

Таблица 2.2.3. Результаты взаимодействия бромпроизводного **1** с пиперидином по данным спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$

Условия синтеза				Состав реакционной смеси, мол. %				
Растворитель	T, °C	Время, ч	Соотношение <b>13</b> – <b>1</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>14 (14a–14b)</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
Бензол	20	49	2,75 : 1	–	9	26 (60 : 40)	65	–
		53	2,20 : 1	10	10	41 (65 : 35)	39	–
	80	1,5	2,70 : 1	3	9	78 (60 : 40)	10	–
Метанол	20	48	2,76 : 1	–	72	3 (50 : 50)	13	12

Препаративный синтез соединения **14** проводили в бензоле при кипячении в течение 2 ч, выход 68%. Диастереомеры **14a** (*de* 94%) и **14b** (*de* 99%) выделены кристаллизацией, их отнесение к *трео*- или к *эритро*-ряду проведено на основании

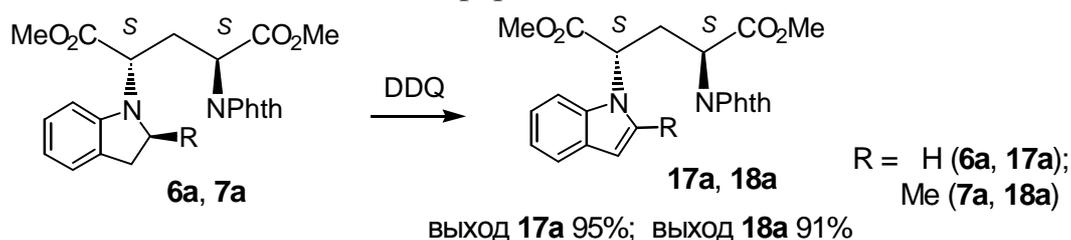
данных спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и РСА. Согласно данным РСА (рис. 2.2.2) соединение **14b** представляет собой диастереомерный рацемат (*эритро*-). Строение соединений **15** и **16** подтверждено встречным синтезом путем взаимодействия пиперидина с индивидуальными соединениями **14** и **12**, соответственно.

Показано, что в растворе соединений **14a** и **14b** в метаноле происходит эпимеризация, что позволяет получать *эритро*-диастереомер **14b** с высоким (85%) выходом из смеси **14a–14b**, 1 : 1 путем кристаллизации при медленном испарении раствора соединения **14** в метаноле.

Таким образом, взаимодействие бромпроизводного **1** со вторичными алифатическими аминами **10** и **13** сопровождается рацемизацией и позволяет получать диастереомерные рацематы диметилowych эфиров 4-аминозамещенных *N*-фталоилглутаминовых кислот.

### 2.3. Синтез стереоизомеров диметилowych эфиров 4-(индол-1-ил)- и 4-(2-метилиндол-1-ил)-*N*-фталоилглутаминовой кислоты

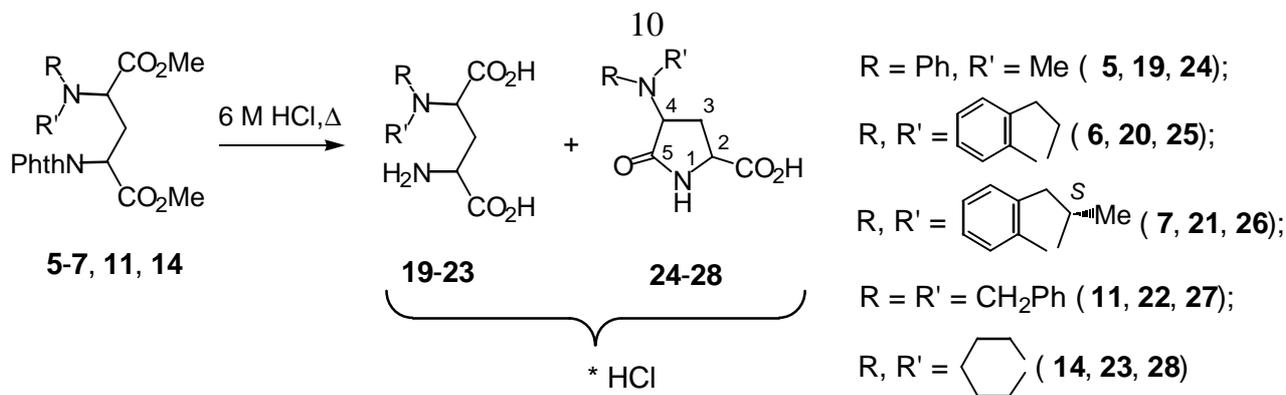
Окисление индолинового фрагмента в соединениях **6a** и **7a** действием 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинона (DDQ) при кипячении в бензоле или толуоле приводит с высокими выходами к диметилowym эфирам **17a** и **18a**.



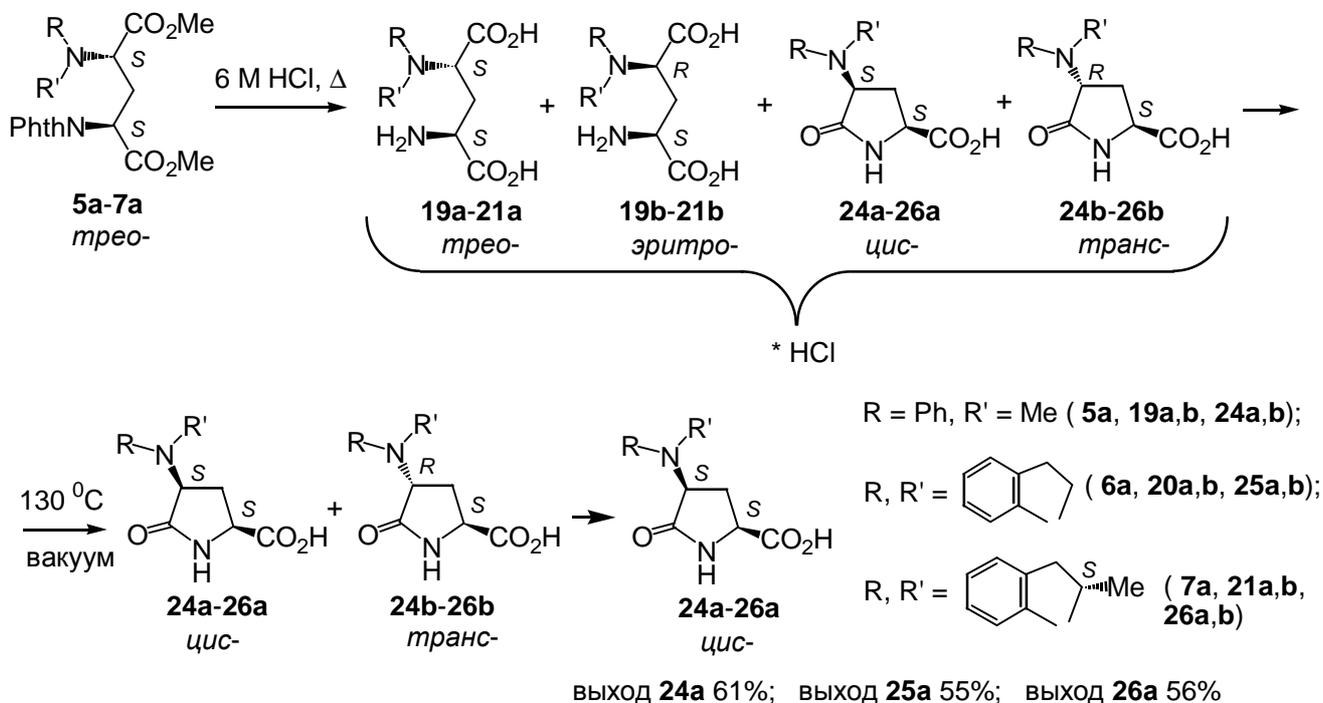
### Глава 3. Синтез стереоизомеров производных 4-амино-5-оксопролина

С целью синтеза стереоизомеров производных 4-амино-5-оксопролина исследованы реакции кислотного гидролиза соединений **5–7**, **9**, **11** и **14** и гидразиолиза соединений **5**, **6** и **17**.

Установлено, что кипячение диметилowych эфиров **5–7**, **11** и **14** в 6 М HCl приводит к смесям гидрохлоридов 4-замещенных глутаминовых кислот **19–23** и гидрохлоридов соответствующих лактамов – 4-замещенных 5-оксопролинов **24–28**. При исследовании кислотного гидролиза индивидуальных диастереомеров диметилowych эфиров 4-аминозамещенных *N*-фталоилглутаминовых кислот **5a–7a**, **14a** и **14b** установлено, что реакция сопровождается частичной эпимеризацией. Так, гидролиз соединения **14b** (*de* 96%) в 6 М HCl в течение 8 ч приводит к смеси **23a–23b–28a–28b**, 7 : 30 : 10 : 53 (ЯМР  $^1\text{H}$ ), то есть кроме соединения **23b** и продукта его дегидратации **28b** (в сумме 83%) образуются соединения **23a** и **28a** (в сумме 17%).



Показано, что степень эпимеризации снижается при уменьшении продолжительности кислотного гидролиза. Кипячение в 6 М НСl в течение 5 ч выбрано в качестве стандартных условий для гидролиза соединений **5–7**, **11** и **14**, так как за это время удаление защитной фталоильной группы происходит практически нацело.



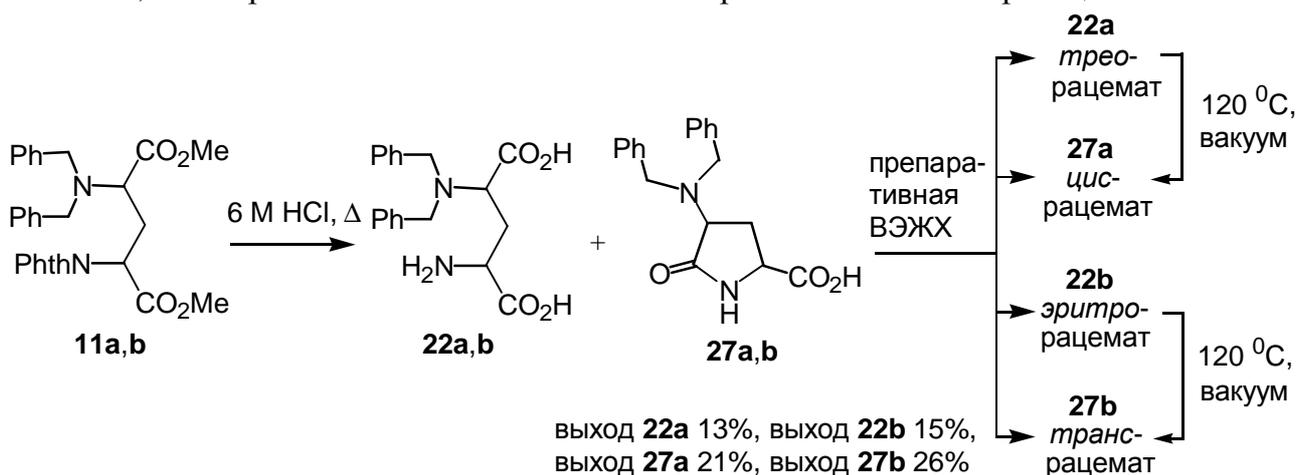
Кислотным гидролизом соединения **5a** (*de* 99%) получена смесь гидрохлоридов соединений **19a–19b–24a–24b**, 32 : 6 : 52 : 10, нагревание которой в вакууме при 130 °С привело к смеси **24a–24b**, 84 : 16, что свидетельствует об отсутствии эпимеризации в ходе замыкания лактамного цикла. Аминокислота **24a** получена из смеси **24a–24b**, 84 : 16 кристаллизацией. *цис*-Конфигурация соединения **24a** подтверждена данными спектроскопии ЯМР 2D  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  NOESY. Аминокислота **24b** выделена из смеси **24a,b** методом препаративной ВЭЖХ. Аминокислоты **25a** и **26a** синтезированы аналогично **24a**. Оптическая чистота (*ee* 99%) аминокислот **24a** и **26a** подтверждена путем их дериватизации (*S*)-1-фенилэтиламино (ВЭЖХ, ЯМР  $^1\text{H}$ ).

Причина выделения оптически чистых 4-ариламино-5-оксoproлинов из смесей стереоизомеров обусловлена, по-видимому, двумя факторами. Первый заключается в обогащении (*2S,4S*)-изомерами при кристаллизации, а второй в том, что рацемизация в

ходе кислотного гидролиза соединений **5a** и **7a** происходит преимущественно по C(4)-хиральному центру. Справедливость последнего утверждения подтверждена экспериментом по дейтерированию аминокислоты **24a** в 6 М DCl в D<sub>2</sub>O в течение 8 ч. Дейтерирование атома C(4), связанного с группой N(Me)Ph, составило около 25%, в то время как атома C(2) не более 5% (ЯМР <sup>1</sup>H).

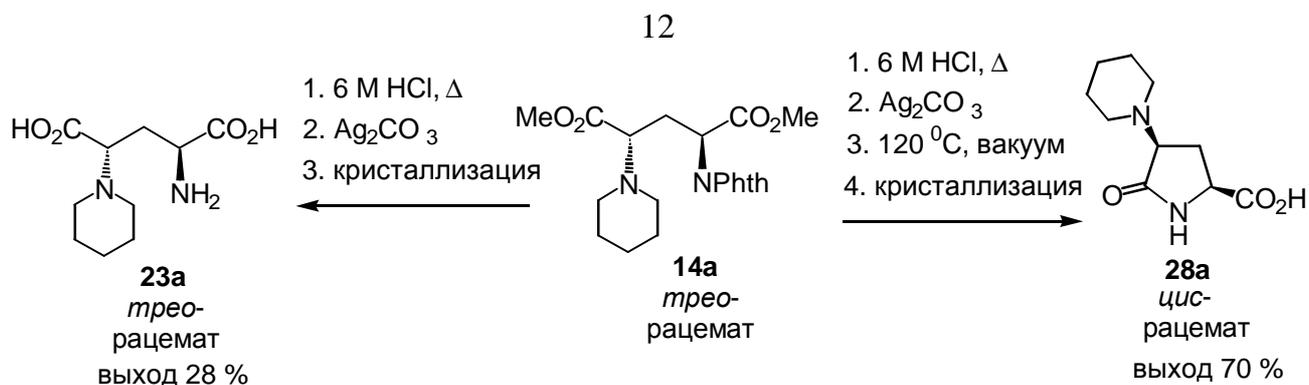
С целью синтеза аминокислот **22a,b** и **27a,b** проведен кислотный гидролиз смеси **11a,b** (**11a–11b**, 43 : 57) без ее предварительного разделения на диастереомеры. В результате получена смесь гидрохлоридов 4-дибензиламиноглутаминовой кислоты **22a,b** и 4-дибензиламино-5-оксопролина **27a,b** в соотношении **22a–22b–27a–27b**, 17 : 20 : 28 : 35.

Выделение индивидуальных соединений **22a**, **22b**, **27a** и **27b** осуществлено методом препаративной ВЭЖХ. *цис*-Конфигурация аминокислоты **27a** подтверждена данными спектроскопии ЯМР 2D <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NOESY. С целью определения конфигурации 4-дибензиламиноглутаминовых кислот **22a** и **22b** осуществлена их дегидратация в соответствующие 5-оксопролины **27a** и **27b** при нагревании (120 °С) в вакууме. Показано, что образование лактамов **27a** и **27b** протекает без эпимеризации.



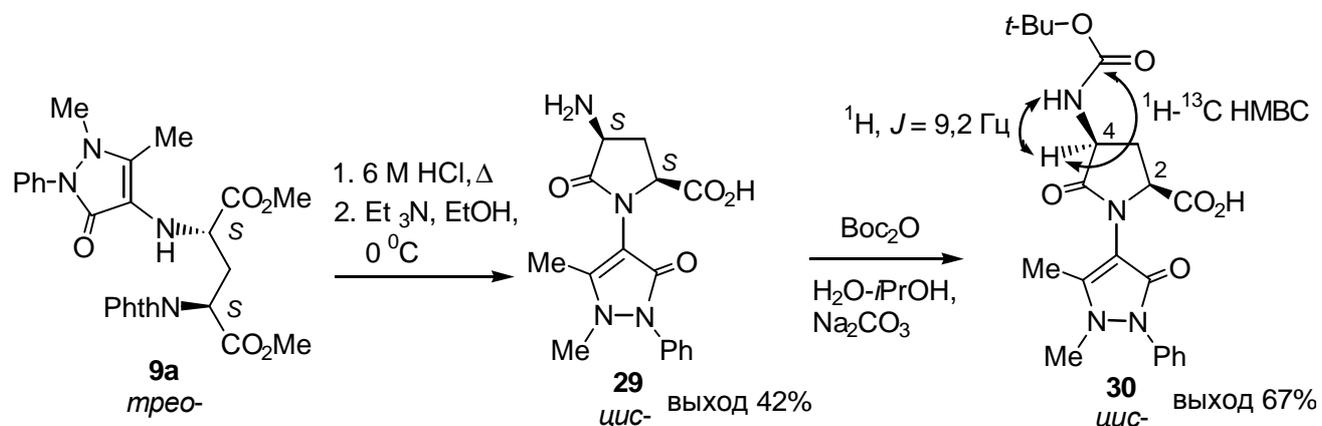
С целью синтеза аминокислот **23a,b** и **28a,b** проведен кислотный гидролиз диметилвых эфиров **14a** и **14b**. При кислотном гидролизе соединения **14a** (*de* 94%) образуется смесь гидрохлоридов аминокислот **23a–23b–28a–28b**, 39 : 6 : 45 : 10 (ЯМР <sup>1</sup>H). Обработка смеси гидрохлоридов карбонатом серебра приводит к смеси свободных оснований аминокислот, причем соотношение между аминокислотами практически не изменяется. Аминокислота **23a** (*de* 96%) получена с невысоким выходом кристаллизацией смеси **23a–23b–28a–28b**, 39 : 6 : 45 : 10. При нагревании смеси аминокислот **23a–23b–28a–28b**, 39 : 6 : 45 : 10 в вакууме (120 °С, 4 ч) образуется смесь **28a–28b**, 84 : 16, кристаллизацией которой получена аминокислота **28a** (*de* 99%).

Аналогично из диастереомера **14b** (*de* 96%) получен *транс*-4-пиперидино-5-оксопролин (**28b**) (выход 75%, *de* 99%) и смесь, обогащенная аминокислотой **23b** (выход 16%, *de* 64%). Относительная конфигурация аминокислоты **28b** подтверждена данными спектроскопии ЯМР 2D <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NOESY.

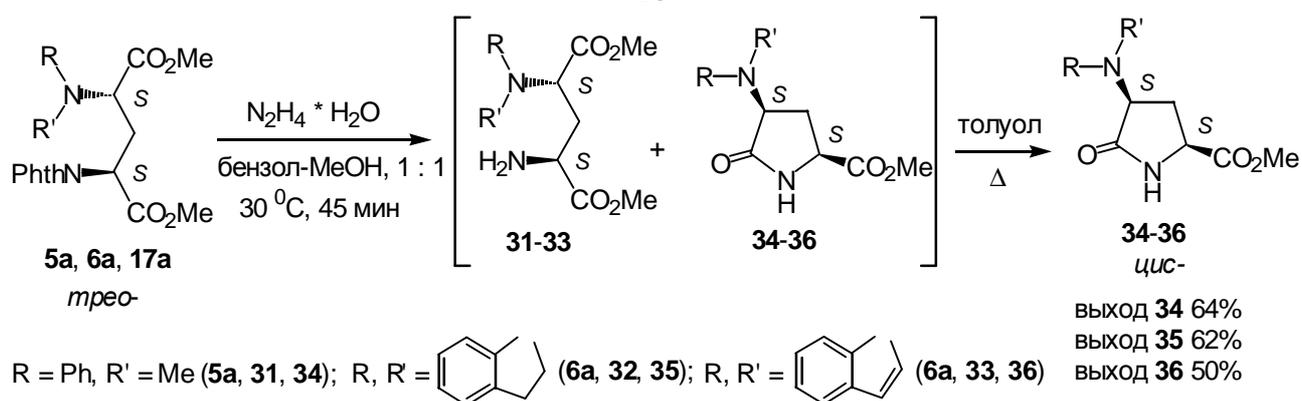


При сравнении спектров ЯМР <sup>1</sup>H диастереомеров 4-аминозамещенных 5-оксопролинов **24**, **27** и **28** наблюдаются следующие закономерности: 1) значения вицинальных констант <sup>3</sup>J протонов Н(2)–Н<sub>A</sub>(3) и Н(2)–Н<sub>B</sub>(3) существенно различаются между собой для *транс*-диастереомеров и оказываются близкими для *цис*-диастереомеров; 2) разность химических сдвигов протонов группы С(3)Н<sub>A</sub>Н<sub>B</sub> 5-оксопролинового цикла в случае соединений, имеющих *цис*-конфигурацию, больше, чем у *транс*-диастереомеров.

Кислотный гидролиз соединения **9a** приводит к образованию 1-замещенного 4-амино-5-оксопролина **29**. Строение соединения **29** подтверждено данными спектроскопии ЯМР 2D <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C НМВС *трет*-бутилоксикарбонильного производного **30**, в спектре 2D <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C НМВС которого наблюдается кросс-пик между сигналом карбонильного атома углерода *трет*-бутилоксикарбонильной группы и сигналом Н(4), который в свою очередь расщепляется на NH в спектре ЯМР <sup>1</sup>H.



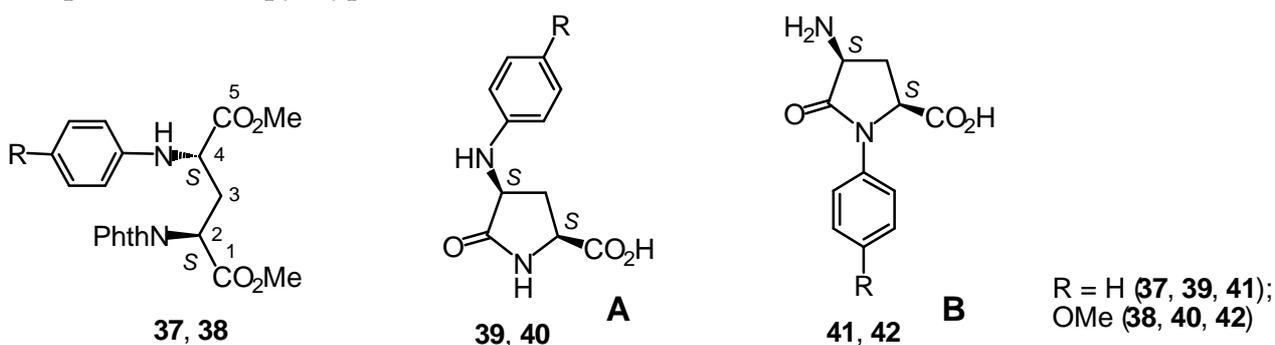
Из соединений **5a**, **6a** и **17a** под действием гидразингидрата (оптимальные условия: 30 °C, 45 мин) образуются смеси диметилвых эфиров **31–33** и соответствующих лактамов **34–36**. Замыкание соединений **31–33** в соответствующие лактамы **34–36** осуществляли путем кипячения в толуоле.



Строение соединений **34–36** подтверждено данными элементного анализа, спектральными данными и встречными синтетами, исходя из аминокислот **24a** и **25a**, этерификация которых метанолом в присутствии хлористого тионила приводила к метиловым эфирам **34** и **35**. Метиловый эфир **36** получали окислением соединения **35** действием DDQ.

#### Глава 4. Строение производных 4-амино-5-оксопролина

Если в случае, когда в положении 4 цепи глутаминовой кислоты присутствует третичная аминогруппа, замыкание лактамного цикла происходит однозначно (с участием C(5)-карбонильной и C(2)-аминогруппы), то в случае гидролиза производных ГК со вторичной аминогруппой в положении 4 теоретически могут образовываться изомерные структуры **A** и **B**. Определение строения продуктов продолжительного кислотного гидролиза известных диметилвых эфиров **37** и **38** представляло собой сложную задачу вследствие значительного сходства спектральных свойств альтернативных структур **A** и **B**.



Установлено, что кипячение соединений **37** и **38** в 6 М HCl в течение 20–60 мин приводит к гидролизу сложноэфирных групп с одновременным замыканием лактамного цикла и образованием (2*S*,4*S*)-1-арил-5-оксо-4-фталимидопролинов **43** и **44**. Строение соединения **43** подтверждено данными PCA (рис. 4.1) и спектроскопии ЯМР 2D  $^1\text{H}-^1\text{H}$  NOESY. Установлено, что обработка *N*-фталоиламинокислот **43** и **44** гидразингидратом приводит к аминокислотам **41** и **42**, соответственно.

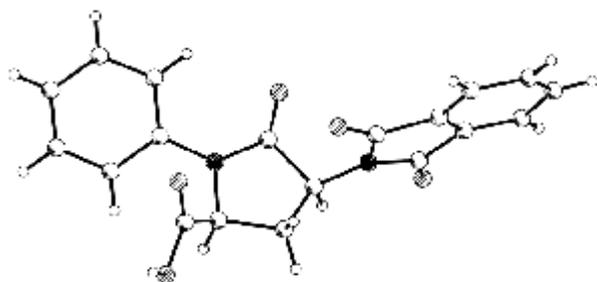
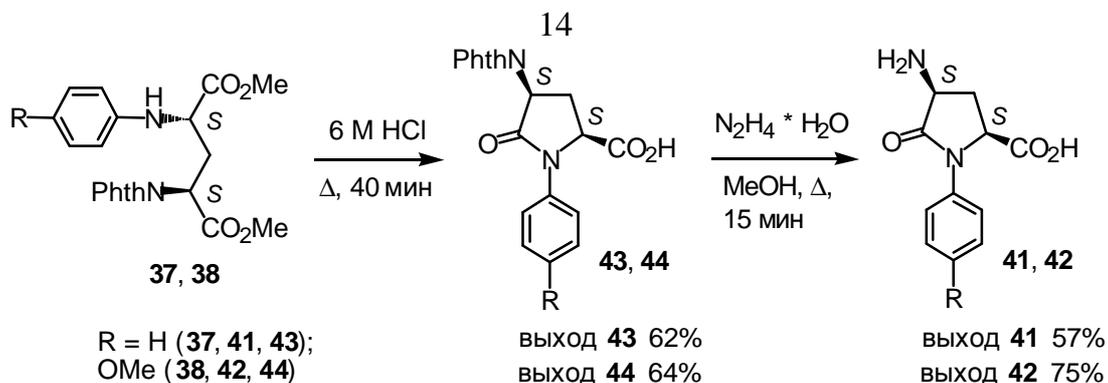


Рис. 4.1. Строение молекулы соединения **43** по данным PCA

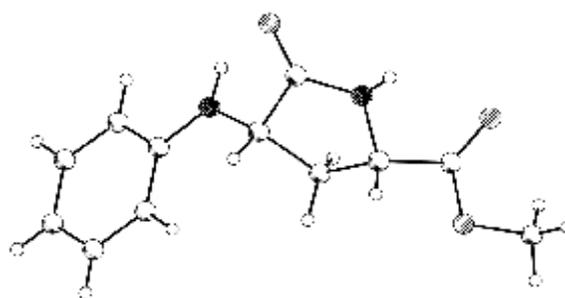
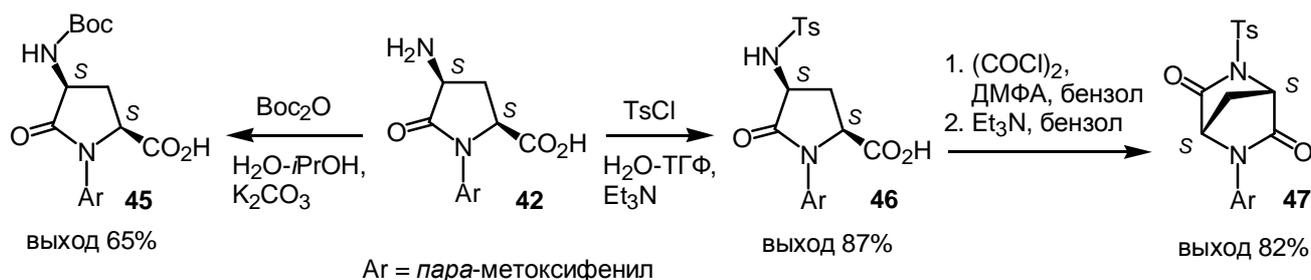


Рис. 4.2. Строение молекулы соединения **48** по данным PCA

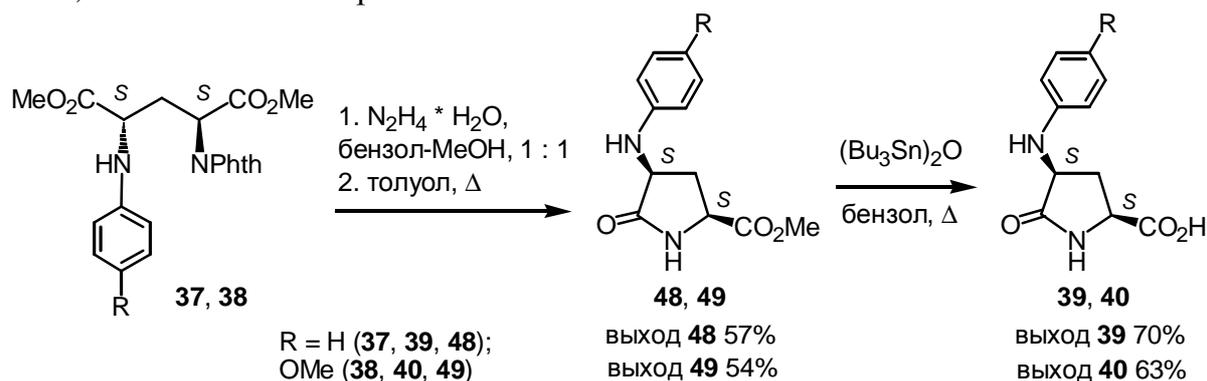
В целях подтверждения строения аминокислоты **42** осуществлен синтез ее *tert*-бутилоксикарбонил- (**45**) и тозилпроизводного (**46**). Соединение **45** имеет те же особенности в 1D и 2D ЯМР спектрах, что и соединение **30**, что подтверждает тип замыкания лактамного цикла. Соединение **46** при последовательной обработке хлористым оксалилом и триэтиламиноом превращается в бициклическое соединение **47**, что возможно только в случае наличия в соединении **46** группы Ts–NH.



Заключительным этапом установления строения продуктов продолжительного кислотного гидролиза диметилвых эфиров **37** и **38** являлся синтез 4-ариламино-5-оксопролинов **39** и **40** строения А. Установлено, что гидразиолиз диметилвых эфиров **37** и **38** в мягких условиях с последующим кипячением в толуоле приводит к метиловым эфирам **48** и **49**, строение которых подтверждено данными спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , включая 2D NOESY и HMBC эксперименты. Строение соединения **48** подтверждено данными PCA (рис. 4.2).

Превращение метиловых эфиров **48** и **49** в соответствующие кислоты **39** и **40** осуществлено действием оксида бис(трибутилолова) в кипящем бензоле. Строение соединений **39** и **40** подтверждено данными масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР

$^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , включая 2D эксперименты.



При сравнении ЯМР  $^1\text{H}$  спектров структурно изомерных аминокислот **39, 40** (А) и **41, 42** (В) выявлены спектральные характеристики, позволяющие судить о типе замыкания лактамного цикла. В спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  аминокислот строения А ароматические протоны сдвинуты в сильное поле на 0,5–0,9 м.д. (подобно анилину) относительно таковых для аминокислот строения В (подобно ацетанилиду). Другой характерной особенностью спектров ЯМР  $^1\text{H}$  аминокислот строения А является присутствие двух сигналов протонов NH-групп в  $\text{DMSO-d}_6$ , тогда как сигналы  $\text{NH}_2$ -группы соединений **41** и **42** в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  не обнаруживаются.

Таким образом, на основании данных спектроскопии ЯМР, РСА и химических превращений установлено, что при кислотном гидролизе диметилвых эфиров 4-ариламино-*N*-фталоилглутаминовой кислоты со вторичной ариламиногруппой образование лактамного цикла происходит с участием С(1)-карбонильной и С(4)-ариламиногруппы. Разработан метод синтеза (2*S*,4*S*)-4-ариламино-5-оксопролинов со вторичной ариламиногруппой и выявлены спектральные характеристики, позволяющие судить о типе замыкания лактамного цикла.

## Глава 5. Устойчивость лактамного цикла производных 4-амино-5-оксопролина в водных растворах

Несмотря на то, что образование лактамных форм из 4-производных глутаминовой кислоты неоднократно регистрировалось в ряде работ, систематических исследований этих процессов проведено не было. Нами исследованы взаимопревращения производных 4-амино-5-оксопролина и 4-аминоглутаминовой кислоты в зависимости от заместителя, рН среды и конфигурации соединений.

Исследовано поведение лактамов **24a, 27a, 27b, 28a, 28b** и **40** в 6 М  $\text{DCl}$  в  $\text{D}_2\text{O}$  при 110 °С методом спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ . Исследован начальный этап реакции (0–30 мин), когда процессы эпимеризации и замещения атомов водорода при С(2) и С(4) на дейтерий протекают в малой степени. Состав реакционных смесей в зависимости от времени представлен на рис. 5.1–5.3. (На схемах для простоты приведены атомы Н).

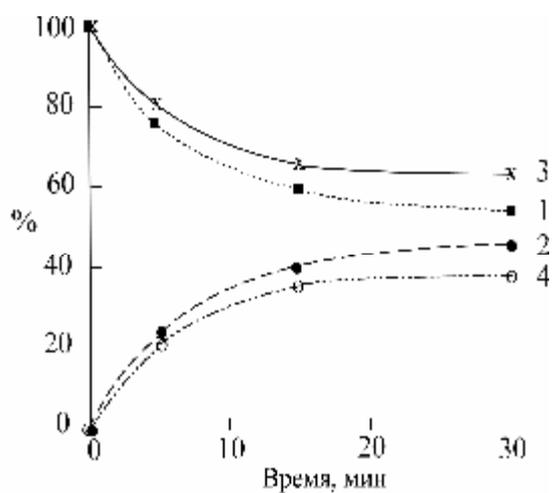
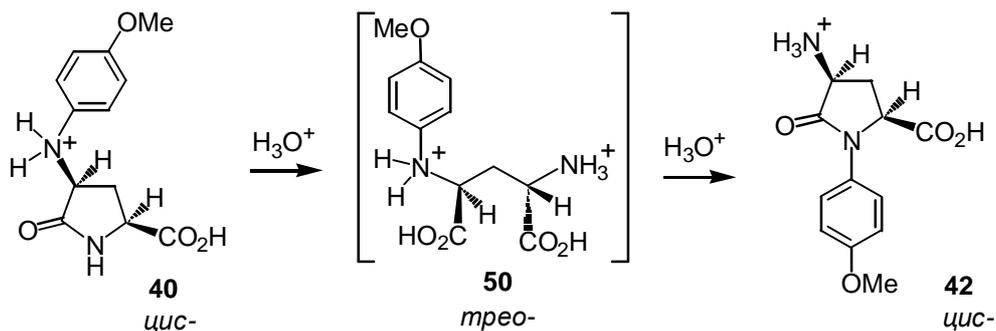
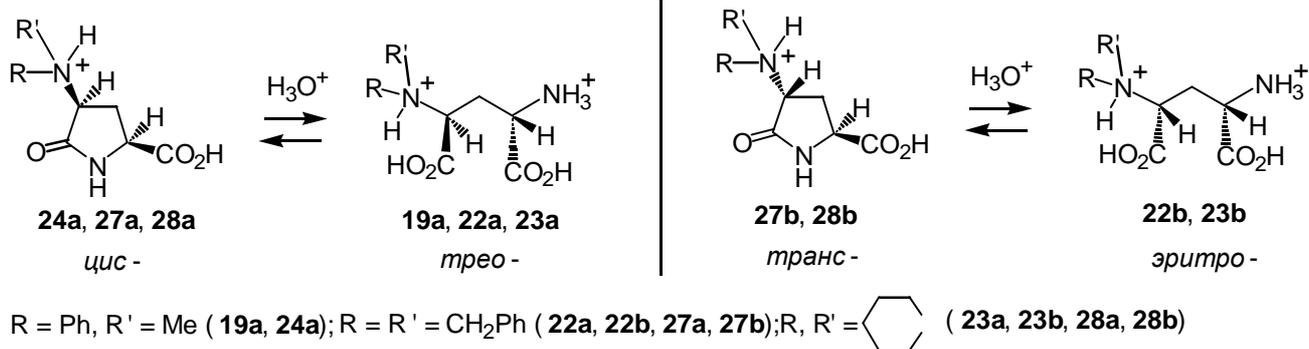


Рис. 5.1. Зависимость состава смеси **28a–23a** (линии 1 и 2) и **28b–23b** (линии 3 и 4) от времени

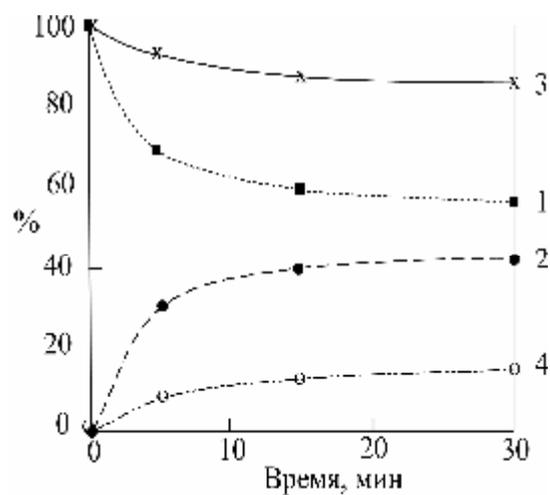


Рис. 5.2. Зависимость состава смеси **27a–22a** (линии 1 и 2) и **27b–22b** (линии 3 и 4) от времени

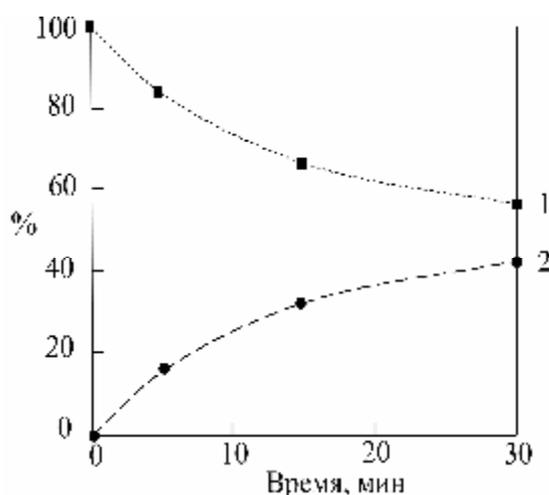


Рис. 5.3. Зависимость состава смеси **24а–19а** (линии 1 и 2) от времени

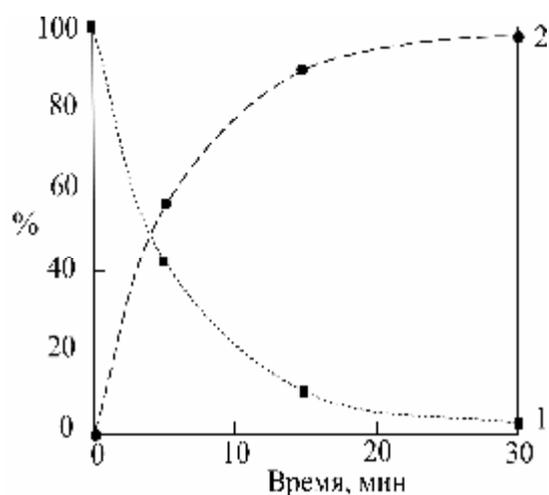


Рис. 5.4. Зависимость состава смеси **40–42** (линии 1 и 2) от времени

Установлено, что при нагревании 4-аминозамещенных 5-оксопролинов с третичной аминогруппой **24а, 27а, 27б, 28а, 28б** в среде 6 М DCl происходит образование смесей 5-оксопролинов с соответствующими глутаминовыми кислотами **19а, 22а, 22б, 23а, 23б**. Причем количество лактамов **24а, 27а,б** и **28а,б** смесях в течение всего времени эксперимента превышает 50%, что находится в соответствии с данными по составу смесей гидрохлоридов аминокислот, полученных в результате кислотного гидролиза диметилowych эфиров **5а, 11, 14а** и **14б**, в которых лактамы также преобладают (55–63%).

При сравнении между собой пар *цис-* – *трео-* и *транс-* – *эритро-* для соединений **27а–22а, 28а–23а, 27б–22б** и **28б–23б** видно, что в парах *транс-* – *эритро-* (**б**, линии 3 и 4 на рис. 5.1 и 5.2) лактамы преобладают в большей степени, чем в парах *цис-* – *трео-* (**а**, линии 1 и 2 на рис. 5.1 и 5.2). Наиболее сильные различия в парах *цис-* – *трео-* и *транс-* – *эритро-* наблюдаются для соединений **22а,б** и **27а,б** (рис. 5.2), имеющих объемную дибензиламиногруппу. То есть, *транс-*лактамы **27б** и **28б** относительно более устойчивы в среде 6 М DCl, чем *цис-*лактамы **27а** и **28а**, соответственно.

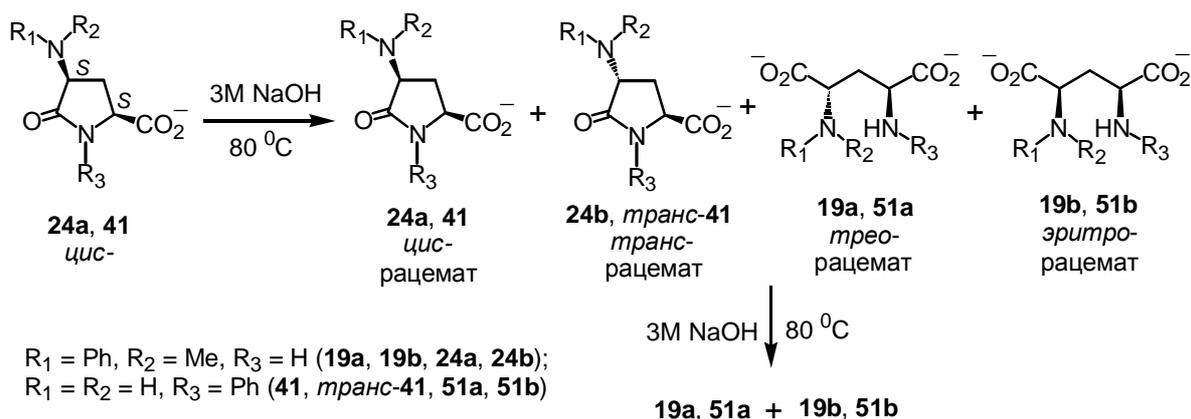
При исследовании поведения аминокислоты **40** в 6 М DCl в D<sub>2</sub>O при 110 °С установлено, что данное соединение нацело превращается в изомерную аминокислоту **42** (рис. 5.4). В реакционных смесях отсутствует в детектируемом количестве открытоцепная форма **50**.

На основании полученных нами данных и анализа литературы, касающейся поведения 4-замещенных глутаминовых кислот и соответствующих 5-оксопролинов в сильноокислой среде, можно сделать вывод, что способность образовывать лактамы в среде 6 М HCl в большей степени присуща производным 4-аминоглутаминовой кислоты, нежели C(4)-производным ГК с другими заместителями (H, Alk, F, OH, SH, SAlk).

При проведении гидролиза *транс*-4-пиперидино-5-оксопролина (**28б**) в воде при 100 °С в течение 24 ч образуется смесь лактамов **28а–28б**, 17 : 83 (ЯМР <sup>1</sup>H), то есть

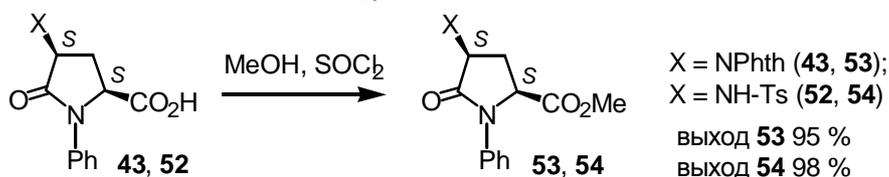
образования соответствующей глутаминовой кислоты **23** не наблюдается и происходит частичная эпимеризация. При нагревании *трео*-4-пиперидиноглутаминовой кислоты (**23a**) (*de* 96%) в данных условиях образуется смесь **23a–23b–28a–28b**, 42 : 8 : 40 : 10, то есть эпимеризация также имеет место, однако замыкание происходит не полностью, возможно, вследствие медленного протекания реакции. Нагревание (2*S*,4*S*)-4-фенил- (**39**) и (2*S*,4*S*)-4-(4-метоксифенил)-5-оксопролинов (**40**) в данных условиях приводит к смесям **39–41** и **40–42** в соотношениях 79 : 21 и 74 : 26, соответственно, продуктов эпимеризации не наблюдается, то есть перезамыкание соединений **39** и **40** в более устойчивые изомерные структуры **41** и **42**, соответственно, протекает и в нейтральной среде, хотя гораздо медленнее, чем в среде 6 М DCl.

Исследовано размыкание лактамного цикла в 5-оксопролинах **24a** и **41** в 3 М NaOH в H<sub>2</sub>O при 80 °С. Установлено (ВЭЖХ), что в течение 3 ч происходит превращение указанных соединений в соли аминокислот **19a,b** и **51a,b**, соответственно. Размыкание лактамного цикла в указанных условиях сопровождается рацемизацией. Образование в ходе реакции диастереомерных лактамов **24b** и *транс*-**41** свидетельствует о том, что уже исходные соединения **24a** и **41** подвергаются рацемизации.



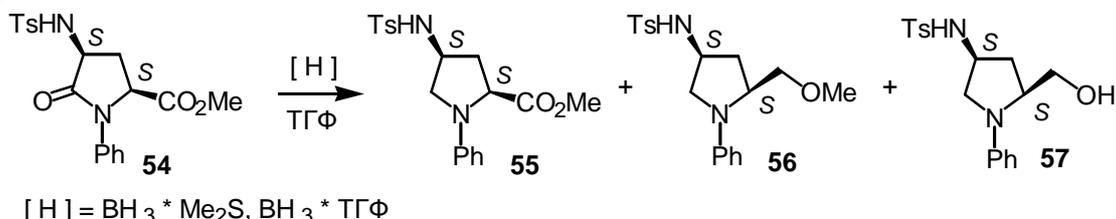
## Глава 6. Восстановление производных 4-амино-5-оксопролина

Оптически активные производные пролина представляют исключительно большой интерес в качестве хиральных строительных блоков, компонентов катализаторов асимметрического синтеза, биологически активных соединений. В связи с этим нами исследована возможность восстановления (2*S*,4*S*)-стереоизомеров метиловых эфиров производных 4-амино-5-оксопролина **53**, **54**, **62** и **63** до соответствующих пролинов. В качестве восстановителей использовали комплексы борана:  $\text{BH}_3 \times (\text{CH}_3)_2\text{S}$  и  $\text{BH}_3 \times \text{ТГФ}$ . Метиловые эфиры 4-аминозамещенных 1-фенил-5-оксопролинов **53** и **54** получали этерификацией соответствующих кислот **43** и **52** метанолом в присутствии хлористого тионила.



Качественный состав смесей продуктов восстановления соединений **53** и **54** определяли методами ТСХ и ВЭЖХ. Количественный состав оценивали на основании препаративных выходов продуктов **55–61**, выделенных хроматографически (табл. 6.1 и 6.2). Строение соединений **55–61** подтверждено спектральными данными, включая 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМВС эксперименты, данными элементного анализа и масс-спектрометрии. Строение соединения **57** подтверждено данными РСА (рис. 6.1).

Установлено, что при восстановлении соединений **53** и **54** помимо карбонильной группы лактама восстановлению подвергается и сложноэфирная группа, а в случае соединения **53** восстанавливается также фталимидогруппа. При восстановлении соединения **54** выделены и охарактеризованы продукты **55–57**, а в случае соединения **53** – продукты **58–61**.



**Таблица 6.1.** Результаты восстановления соединения **54**

Восстановитель	Условия реакции			Выход соединений, %			
	T, °C	время, сутки	соотношение <b>54</b> / восстановитель	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	<b>57</b>
$\text{BH}_3 \cdot (\text{CH}_3)_2\text{S}$	23	7	1 : 4	–	26	–	23
	23	7	1 : 2	–	21	–	45
	23	10	1 : 4	–	15	–	44
	40	7	1 : 4	–	–	3	57
	40	4	1 : 4	–	–	4	72
$\text{BH}_3 \cdot \text{TGF}$	23	5	1 : 1,5	30	21	–	–
	23	8	1 : 4	–	–	12	52
	35	7	1 : 4	–	–	20	55
	5	6	1 : 4	–	34		41

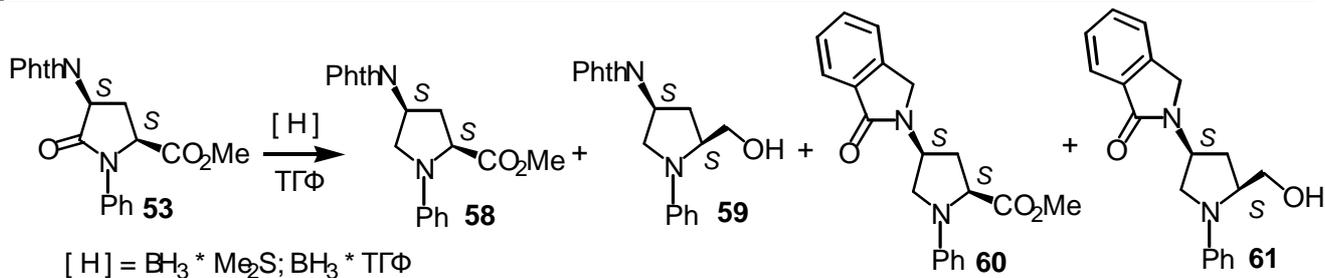
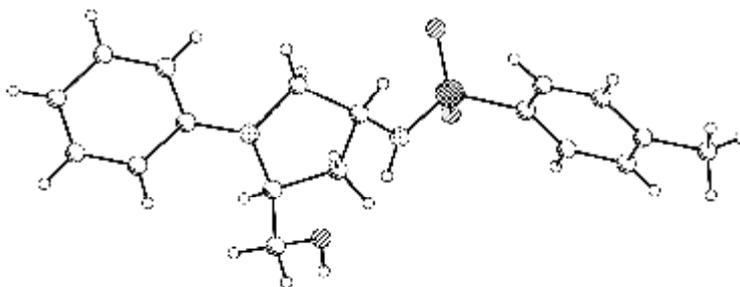


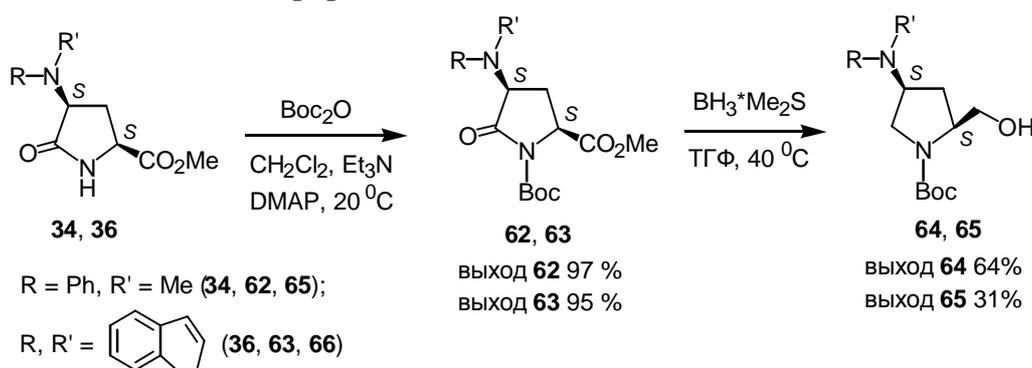
Таблица 6.2. Результаты восстановления соединения **53**

Восстановитель	Условия реакции			Выход соединений, %				
	Т, °С	время, сутки	соотношение <b>53</b> / восстановитель	<b>53</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>61</b>
ВН <sub>3</sub> ×(СН <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	23	6	1 : 4	–	14	10	24	19
	–5	14	1 : 4	90	–	–	–	–
	17	7	1 : 5	–	26	10	28	11
ВН <sub>3</sub> ×ТГФ	23	7	1 : 1,5	–	21	–	20	–

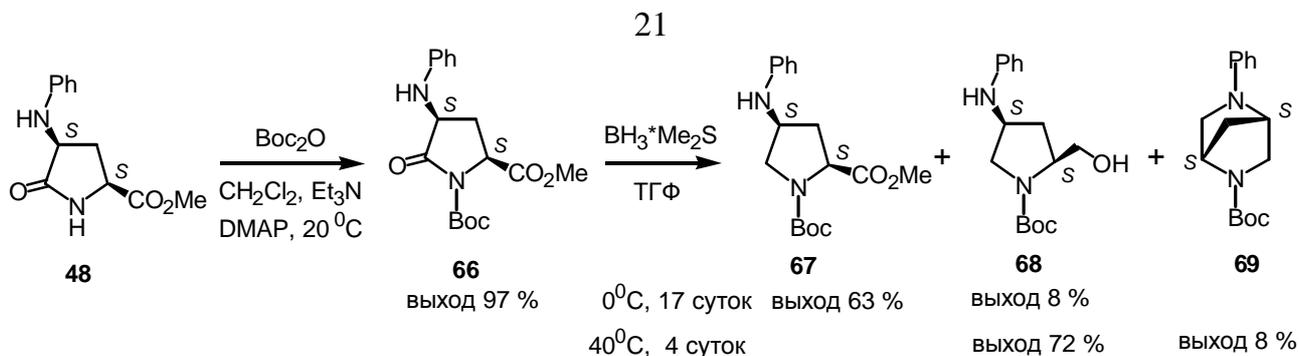
Из данных табл. 6.1 и 6.2 следует, что состав и соотношение продуктов реакции восстановления зависит от типа восстановителя и его количества, природы защитной группы и температуры. При восстановлении фталоильного производного **54** сложноэфирная группа затрагивается в меньшей степени, чем при восстановлении тозилного производного **53**. Рацемизации в ходе восстановления не наблюдается, что позволяет получать оптически чистые производные пролинов и пролинолов.

Рис. 6.1. Строение молекулы соединения **57** по данным РСА

Установлено, что восстановление метиловых эфиров **34** и **48** комплексами ВН<sub>3</sub> приводит к многокомпонентным смесям продуктов. С целью повышения селективности восстановления предпринято введение защитной *трет*-бутилоксикарбонильной группы в положение 1 метиловых эфиров **34**, **36** и **48** действием Вос<sub>2</sub>О. Выходы эфиров **62**, **63** и **66** высокие.



Восстановление метиловых эфиров **62**, **63** и **66** комплексом ВН<sub>3</sub>×(СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S в ТГФ при 40 °С в течение 4 суток приводит к образованию пролинолов **64**, **65** и **68**, соответственно. В случае соединения **66**, имеющего в положении 4 группу PhNH, помимо пролинола **68** образуется в небольшом количестве бициклическое соединение **69**. При восстановлении эфира **66** комплексом ВН<sub>3</sub>×(СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S в ТГФ при 0 °С в течение 17 суток наблюдается преимущественное образование метилового эфира **67**.



Таким образом, при восстановлении карбонильных групп производных 4-амино-5-оксопролина **53**, **54**, **62**, **63** и **66** комплексами борана удается получать с выходами от умеренных до хороших соответствующие производные пролина и пролинола (2-оксиметилпирролидина).

## Глава 7. Биологическая активность синтезированных соединений

Некоторые синтезированные соединения испытаны в качестве ингибиторов ангиогенеза (процесса образования новых кровеносных сосудов) на базе Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН. Ингибирование ангиогенеза – один из подходов к лечению онкологических заболеваний.

Все исследованные соединения не обладали цитотоксическим эффектом, вместе с тем они являлись ингибиторами роста эндотелиальных клеток *in vitro*. Впервые отмечен факт заметной активности 4-производных глутаминовой кислоты, не содержащих фталоильной группы (соединения **23** и **28**).

Показано в опытах *in vivo* (мыши), что одно из 4-производных *N*-фталоилглутаминовой кислоты по эффективности торможения роста VEGF-положительной подкожно трансплантированной меланомы В16 находится на уровне препарата сравнения талидомида.

### ВЫВОДЫ

1. Разработан метод синтеза стереоизомеров новых производных 4-амино-5-оксопролина путем нуклеофильного замещения галогена в 4-галогенпроизводных глутаминовой кислоты с последующим разделением диастереомеров, удалением защитных групп и замыканием лактамного цикла. Показано, что хемо- и стереоселективность взаимодействия диметилового эфира (2*S*,4*RS*)-4-бром-*N*-фталоилглутаминовой кислоты с аминами, а также рацемизация в ходе процесса существенно зависят от строения амина и условий синтеза.

2. Разработаны методы удаления защитных групп диметилвых эфиров 4-аминозамещенных *N*-фталоилглутаминовых кислот посредством кислотного гидролиза и гидразиолиза, приводящие к производным 4-амино-5-оксопролина. Установлено, что удаление защитных групп в условиях кислотного гидролиза сопровождается частичной эпимеризацией, протекающей вследствие рацемизации преимущественно по С(4)-хиральному центру, и существенной циклизацией 4-замещенных глутаминовых кислот в соответствующие 5-оксопролины. Протекание частичной рацемизации не

препятствует получению оптически чистых стереоизомеров, поскольку конфигурация C(2)-хирального центра сохраняется.

3. На основании химических превращений, данных РСА и мультядерной спектроскопии ЯМР однозначно установлено, что продукты кислотного гидролиза диметилловых эфиров 4-аминозамещенных *N*-фталоилглутаминовых кислот со вторичной ариламиногруппой имеют структуру 4-амино-1-арил-5-оксопролинов. Разработан метод синтеза структурно изомерных 4-ариламино-5-оксопролинов, проведено сравнение их спектральных характеристик с 4-амино-1-арил-5-оксопролинами, выявлены характерные особенности, позволяющие судить о типе замыкания лактамного цикла.

4. Исследован процесс размыкания пятичленного лактамного цикла стереоизомеров производных 4-амино-5-оксопролина в зависимости от строения соединений и рН среды. Показано, что в кислой среде (6 М HCl) устанавливается равновесие, которое несколько сдвинуто в сторону производных 4-амино-5-оксопролина и зависит от заместителя в положении 4 и конфигурации соединений (*транс*-лактамы более устойчивы, чем *цис*-). В нейтральной среде 4-аминозамещенные 5-оксопролины устойчивы, в щелочной превращаются в соли соответствующих глутаминовых кислот (при этом происходит рацемизация). Установлено, что 4-ариламинозамещенные 5-оксопролины со вторичной ариламиногруппой в среде 6 М HCl превращаются в изомерные 4-амино-1-арил-5-оксопролины.

5. Исследовано восстановление карбонильных групп производных 4-амино-5-оксопролина комплексами  $\text{ВН}_3$ . Разработан метод получения энантиомерно чистых производных 4-аминопролинола.

6. Среди синтезированных соединений выявлены ингибиторы ангиогенеза, не уступающие по активности известным лекарственным веществам, что делает перспективным дальнейшее исследование противоопухолевой активности в ряду данных соединений.

**Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:**

1. Краснов В.П., Вигоров А.Ю., Низова И.А., Гришаков А.Н., Евстигнеева Н.Г., Кодесс М.И. Синтез стереоизомерных 4-(2-метилиндолин-1-ил)- и 4-(2-метилиндол-1-ил)- производных глутаминовой кислоты // Изв. АН. Сер. хим. 2004, № 6. С. 1274–1277.
2. Krasnov V.P., Vigorov A.Yu., Nizova I.A., Matveeva T.V., Grishakov A.N., Bazhov I.V., Tumashov A.A., Ezhikova M.A., Kodess M.I. Synthesis of 4-amino derivatives of 5-oxoproline // Eur. J. Org. Chem. 2007. No 25. P. 4257–4266.
3. Krasnov V.P., Nizova I.A., Vigorov A.Yu, Matveeva T.V., Levit G.L., Slepukhin P.A., Ezhikova M.A., Kodess M.I. Structure and properties of 4-amino derivatives of 5-oxoproline // Eur. J. Org. Chem. 2008. No 10. P. 1802–1810.
4. Вигоров А.Ю., Низова И.А., Гришаков А.Н., Матвеева Т.В., Бажов И.В., Тумашов А.А., Садретдинова Л.Ш., Ежикова М.А., Кодесс М.И., Краснов В.П. Синтез стереоизомеров 4-аминозамещенных-5-оксопролинов // В кн.: Актуальные

проблемы органического синтеза и анализа. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. С. 43–51.

**Работа апробирована на конференциях:**

1. Вигоров А.Ю., Иванов А.Г., Кумков С.И., Краснов В.П. Исследование кинетики эимеризации диметилвых эфиров N-фталоил-4-галоген глутаминовой кислоты // Тезисы докладов Молодежной научной школы-конференции «Актуальные проблемы органической химии». Новосибирск, 2001. Тезисы докладов. Екатеринбург, 2001. С. 79.
2. Вигоров А.Ю., Гришаков А.Н., Евстигнеева Н.Г., Кодесс М.И., Краснов В.П. Взаимодействие диметилового эфира (2*S*,4*RS*)-N-фталоил-4-бромглутаминовой кислоты с 2-метилиндолином // Тезисы докладов V Молодежной научной школы-конференции по органической химии. Екатеринбург, 2002. С. 116.
3. Вигоров А.Ю., Низова И.А., Краснов В.П., Гришаков А.Н., Евстигнеева Н.Г., Кодесс М.И. Синтез новых C(4)-производных глутаминовой кислоты // Тезисы докладов XVII Менделеевской съезда по общей и прикладной химии. Достижения и перспективы химической науки. Т. 1. Казань, 2003. С. 188.
4. Вигоров А.Ю., Низова И.А., Матвеева Т.В., Кодесс М.И., Садретдинова Л.Ш., Гришаков А.Н., Краснов В.П. Исследование взаимодействия диметилового эфира N-фталоил-4-бромглутаминовой кислоты с пиперидином // Материалы IV Международной конференции молодых ученых «Современные тенденции в органическом синтезе и проблемы химического образования». Санкт-Петербург, 2005. С. 80–81.
5. Бажов И.В., Вигоров А.Ю., Гришаков А.Н., Низова И.А., Краснов В.П. Использование метода ВЭЖХ в синтезе стереоизомеров 4-дибензиламиноглутаминовой кислоты и 4-дибензиламино-5-оксопролина // Тезисы докладов Первого Российского научного форума «Демидовские чтения». «Демидовские чтения на Урале». Екатеринбург, 2006. С. 119–120.
6. Вигоров А.Ю., Низова И.А., Садретдинова Л.Ш., Гришаков А.Н., Ежикова М.А., Кодесс М.И., Краснов В.П. Синтез 4-метилфениламино-5-оксопролина // Материалы Всероссийской конференции «Техническая химия. Достижения и перспективы». Пермь, 2006. Т. 1. С. 52–53.
7. Вигоров А.Ю., Краснов В.П., Низова И.А., Матвеева Т.В., Гришаков А.Н., Кодесс М.И. Синтез 4-пиперидиноглутаминовой кислоты и 4-пиперидино-5-оксопролина // International Symposium on Advanced Science in Organic Chemistry. Abstracts. Sudak, Crimea, 2006. C-029.
8. Вигоров А.Ю., Низова И.А., Краснов В.П. Синтез производных (2*S*,4*S*)-1-арил-4-амино-5-оксопролинов // Тезисы докладов IX Научной школы-конференции по органической химии. Москва, 2006. С. 105.
9. Краснов В.П., Левит Г.Л., Демин А.М., Низова И.А., Вигоров А.Ю., Жданова Е.А., Осинцев А.В., Степанова Е.В., Трещалина Е.М. Исследование антиангиогенной

активности структурных аналогов талидомида // Российский биотерапевтический журнал. 2006. Т. 5, № 1. С. 3–4. Материалы V Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты».

10. Krasnov V.P., Nizova I.A., Vigorov A.Yu., Levit G.L., Sadretdinova L.Sh., Charushin V.N. Kinetic resolution of ( $\pm$ )-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline by proline derivatives // The 15<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry. Abstracts. Dublin, Ireland, 2007. P. 231.
11. Вигоров А.Ю., Низова И.А., Шалунова К.Е., Краснов В.П. Синтез производных 4-амино-5-оксопролина // Тезисы докладов X Молодежной конференции по органической химии. Уфа, 2007. С. 36.
12. Низова И.А., Шалунова К.Е., Вигоров А.Ю., Садретдинова Л.Ш., Гришаков А.Н., Ежикова М.А., Кодесс М.И., Ганебных И.Н., Краснов В.П. Синтез стереоизомеров 4-аминозамещенных пролинов // Материалы Всероссийской молодежной научной школы-конференции «Химия под знаком "Сигма": исследования, инновации, технологии». Омск, 2008. С. 66–68.