

На правах рукописи

Левит Галина Львовна

**АМИНОКИСЛОТЫ
В РЕГИО- И СТЕРЕОНАПРАВЛЕННОМ СИНТЕЗЕ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

02.00.03 - Органическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Екатеринбург – 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН (г. Екатеринбург).

Научный консультант доктор химических наук, профессор

Краснов Виктор Павлович

Официальные оппоненты: член-корреспондент РАН

Кучин Александр Васильевич

(Институт химии Коми научного центра УрО РАН)

доктор химических наук, профессор

Бредихин Александр Александрович

(Институт органической и физической химии

им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН)

доктор химических наук, профессор

Сосновских Вячеслав Яковлевич

(Уральский государственный университет)

Ведущая организация Институт физиологически активных веществ РАН
(г. Черноголовка)

Защита состоится «19» октября 2009 г. в 15 : 00 на заседании диссертационного совета Д 212.285.08 в ГОУ ВПО «Уральский государственный технический университет–УПИ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу: г. Екатеринбург, ул. Мира 28, третий учебный корпус УГТУ-УПИ, аудитория Х-420.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УГТУ-УПИ.

Ваш отзыв в одном экземпляре, заверенный гербовой печатью, просим направлять по адресу: 620002, Екатеринбург, К-2, ул. Мира, 19, УГТУ-УПИ. Ученому секретарю совета Университета, тел. (343) 3754574, факс (343) 3754135, e-mail: orgchem@mail.ustu.ru

Автореферат разослан «17» сентября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Т.А. Поспелова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Аминокислоты являются соединениями, входящими в состав белков и играющими важнейшую роль в биохимических процессах. В то же время аминокислоты широко используются в качестве хиральных строительных блоков в органическом синтезе, компонентов катализаторов асимметрического синтеза, хиральных разделяющих агентов и др.

В последнее время наблюдается новый подъем интереса к химической модификации известных лекарственных препаратов и вновь синтезируемых соединений природными аминокислотами. Присоединение фармакофорных групп к аминокислотам в ряде случаев позволяет получить препараты, обладающие высокой биологической активностью; а использование аминокислот в качестве транспортной функции способствует повышению избирательности действия и снижению токсичности лекарственных препаратов. Вместе с тем, разработке методов синтеза и исследованию свойств производных аминокислот, в которых α -амино- и α -карбоксыльная группы оставались свободными не уделялось достаточно внимания.

Синтез индивидуальных стереоизомеров - стремительно развивающаяся область органической химии. Это обусловлено, в первую очередь, потребностями фармацевтической промышленности, поскольку использование энантимерно чистых лекарственных средств позволяет повысить терапевтический эффект, одновременно уменьшив их побочное действие. Разработка новых подходов к синтезу энантимерно чистых соединений и разделению рацематов способствует развитию новейших методов тонкого органического синтеза и более глубокому познанию особенностей механизмов органических реакций. Среди методов получения энантимерно чистых соединений, используемых в промышленности, около 80% составляют методы разделения и только около 20% методы асимметрического синтеза. В последние годы существенное развитие получил метод оптического кинетического разделения (КР) рацематов. С использованием метода КР удалось получить значительное число энантимеров соединений различных классов, однако возможности метода далеко не исчерпаны. Наиболее сложной проблемой использования этого метода остается невозможность предсказать, насколько эффективным будет применение конкретного расщепляющего агента. Природные аминокислоты являются доступным оптически активным сырьем, они разнообразны по строению, однако до наших исследований они практически не использовались для создания на их основе оригинальных реагентов для КР и исследовании такого рода процессов.

Таким образом, использование аминокислот для создания на их основе оригинальных лекарственных препаратов, так же, как и для решения разнообразных стереохимических задач, является весьма **актуальным**.

Целью работы являлась разработка подходов к использованию природных аминокислот в синтезе физиологически активных соединений, получении их регио- и стереоизомеров.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи: разработать методы синтеза региоизомеров N-алкилнитрозокарбамоил производных аминокислот со свободными α -амино и карбоксыльной группами, изучить их свойства и биологическую активность для создания эффективного

противоопухолевого препарата; синтезировать и исследовать биологическую активность амидов (*S*)-напроксена, ибупрофена и индометацина (нестероидных противовоспалительных препаратов) с аминокислотами; синтезировать и исследовать свойства производных карборан-содержащих аминокислот в качестве потенциальных агентов для бор-нейтронозахватной терапии опухолей; а также изучить процессы кинетического разделения рацемических аминов под действием хиральных ацилирующих реагентов – производных аминокислот.

Научная новизна. Разработаны методы синтеза новых *N*-алкилнитрозокарбамоил производных аминокислот со свободными α -амино и карбоксильной группами. Предложены способы получения индивидуальных изомеров положения нитрогруппы - N^{ϵ} -нитрозо- N^{ϵ} -[(2-хлорэтил)карбамоил]-*L*-лизина и N^{ϵ} -[(2-хлор-этил)-*N*-нитрозокарбамоил]-*L*-лизина, определяющих терапевтический эффект противоопухолевого препарата лизомустин. Выявлена взаимосвязь между структурой синтезированных *N*-алкилнитрозокарбамоил производных и их противоопухолевой активностью.

Впервые получены и охарактеризованы псевдопептиды 2-(3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборан-2-ил)уксусной кислоты и природных аминокислот; показана возможность выделения индивидуальных диастереомеров некоторых соединений.

Впервые установлено, что хлорангидриды оптически активных кислот являются эффективными разделяющими агентами для кинетического разделения рацематов гетероциклических аминов. Наиболее эффективными разделяющими агентами являются хлорангидриды *N*-защищенных аминокислот (*N*-тозил-*S*-пролина и *N*-фталойл-*S*-аланина) и (*S*)-2-(6-метокси-нафтил-2)пропионовой кислоты. Впервые установлены факторы, влияющие на диастереоселективность кинетического разделения рацематов гетероциклических аминов; показано, что она зависит как от структуры разделяющих агентов и исходных аминов, так и от условий ацилирования. Варьируя структуру разделяющего агента можно избирательно получать смеси, обогащенные (*R*)- или (*S*)-изомером амина. Впервые синтезированы энантиомеры 2-метилиндолина.

Впервые получены стереоизомеры производных планарно-хиральных 1-метил-, 1-фенил- и 1-изопропил-3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборанов. Разработаны методы анализа оптической чистоты энантиомеров и диастереомерных амидов 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборанов с помощью ^1H ЯМР спектроскопии и ВЭЖХ. Впервые получены энантиомеры 3-амино-1-метил-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборана. Впервые изучено кинетическое разделение рацемических 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборанов при ацилировании хлорангидридами оптически активных кислот. Впервые обнаружены явления рацемизации и деструкции карборанового ядра 3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборанов в кислых условиях.

Практическая значимость. Разработан способ получения субстанции противоопухолевого препарата ЛИЗОМУСТИН. Составлена нормативно-техническая документация на производство субстанции препарата. В полном объеме проведены клинические испытания препарата лизомустин. Предложены методы контроля качества субстанции лизомустина, которые легли в основу Фармакопейной статьи предприятия. Министерство здравоохранения РФ

разрешило медицинское применение препарата лизомустин в качестве средства для лечения меланомы и рака легкого и его промышленный выпуск (Регистрационное удостоверение Р № 00364/01 от 01.12.03.). Лекарственная форма лизомустина зарегистрирована и внесена в Государственный реестр лекарственных средств (Регистрационное удостоверение № ЛС-002311 от 01.12.2006).

Разработаны эффективные методы синтеза амидов (*S*)-напроксена, ибупрофена и индометацина с производными аминокислот и короткими пептидами, позволяющие получать стерео- и региоизомеры целевых соединений. Среди синтезированных амидов выявлены соединения, не уступающие по анальгетическому и противовоспалительному действию используемым в клинике препаратам. Наиболее перспективным соединением является амид индометацина и метилового эфира L-метионина, который при экспериментальном сравнении с исходным препаратом показал сочетание высокой противовоспалительной и анальгетической активности и в десятки раз меньшей острой и гастротоксичности.

Разработаны эффективные методы оптического кинетического разделения рацематов гетероциклических аминов, позволяющие получать (*R*)- и (*S*)-энантиомеры с высокими выходами и высокой оптической чистотой. Разработан способ получения (*S*)-2,3-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-4*H*-1,4-бензоксазина, ключевого интермедиата в синтезе левофлоксацина, современного антибактериального препарата.

Автор защищает перспективное научное направление в области химии аминокислот, заключающееся в регионаправленном введении фармакофорных групп в молекулы аминокислот с целью получения новых высокоактивных лекарственных средств, а также в создании на основе аминокислот эффективных реагентов для кинетического разделения рацематов и синтеза стереоизомеров физиологически активных соединений.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликован 1 обзор, 1 глава в монографии, 27 статей, 2 авторских свидетельства и 4 патента; сделаны доклады с опубликованием тезисов на 25 международных и российских конференциях.

Диссертация выполнена как часть плановых научно-исследовательских работ, проводимых в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН по темам: «Разработка методов стереоселективного синтеза соединений различных классов с использованием оптически активных аминокислот и их производных» (Гос. рег. № 01.2.00 1 05150) и «Новые подходы к синтезу стереоизомеров 4-замещенных 5-оксопролинов и карборанил-аминокислот» (Гос. рег. № 0120.0 601954); в рамках проектов РФФИ (00-03-32776 «Изучение механизмов и закономерностей процесса кинетического разделения стереоизомеров в ряду гидрированных производных бензоксазина и хинолина», 03-03-33091 «Синтез и исследование энантиомеров 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-клозо-додекаборанов», 06-03-32791 «Синтез левофлоксацина и его аналогов», 06-03-08177_офи «Разработка метода определения энантиомерной чистоты соединений, входящих в состав субстанции препарата лизомустин, и исследование противоопухолевой активности препарата в зависимости от энантиомерного состава», 07-03-00684 «Синтез карборан-содержащих пептидов»); а также в рамках выполнения

Государственных контрактов «Разработка технологий и выпуск опытных партий препаратов – противовирусного «триазавирин» и противоопухолевого «лизомустин», обладающих избирательным действием на генетический аппарат» (02.522.11.2003) и «Разработка технологий синтеза соединений фторхинолонового ряда и выпуск на их основе опытных партий антибактериального препарата левофлоксацина для лечения широкого круга инфекций» (02.522.12.2011); и Программы поддержки ведущих научных школ (грант НШ-3758.2008.3).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав и выводов, изложенных на 276 стр., включает 14 рисунков и 50 таблиц, список литературы (310 наименований).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Создание физиологически активных соединений на основе производных природных аминокислот (краткие литературные сведения)

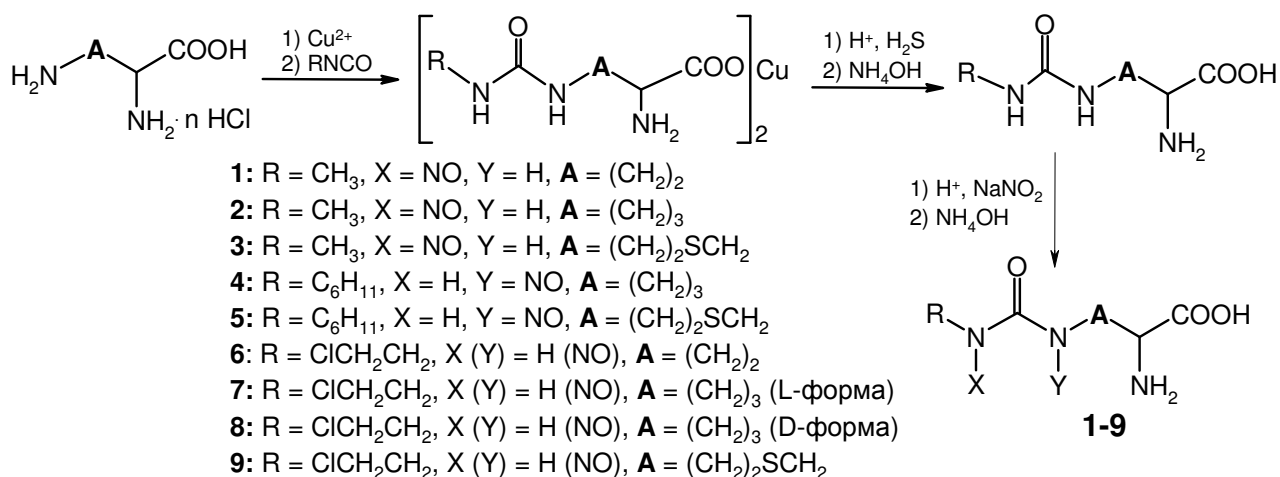
В первой главе приведены краткие литературные сведения по химической модификации некоторых физиологически активных соединений производными природных аминокислот.

Глава 2. Алкилнитрозомочевины на основе α,ω -диаминокарбоновых кислот. Синтез и изучение физико-химических свойств и противоопухолевой активности

Алкилнитрозомочевины (АНМ) - широко используемый в клинической практике класс противоопухолевых препаратов. Они обладают высокой активностью, особенно, в комбинациях с другими противоопухолевыми препаратами, широким спектром противоопухолевого действия и в ряде случаев превосходят препараты иных классов. Характерной реакцией этих соединений, обуславливающей механизм их биологического действия, является гидролитический распад в условиях организма с образованием алкилирующих и карбамоилирующих частиц. Этими же особенностями химического поведения АНМ в организме обусловлены и лимитирующие их использование отсроченная и кумулятивная токсичность, особенно, в отношении системы кроветворения. Основным путем снижения токсичности является подбор структуры АНМ таким образом, чтобы обеспечить избирательный транспорт соединения в опухолевые клетки.

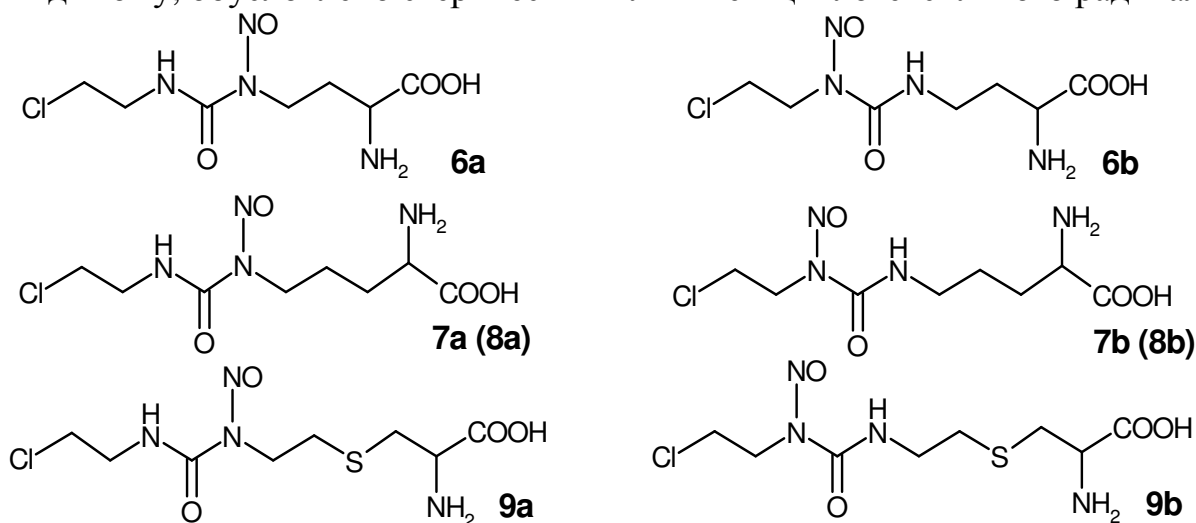
Одним из рациональных подходов к созданию соединений с высокой избирательностью противоопухолевого действия является присоединение цитотоксических фрагментов к молекулам-носителям, которые бы способствовали избирательной доставке препарата в опухолевые клетки. Нами было предложено синтезировать алкилнитрозокарбамоил (АНК) производные аминокислот, в которых цитотоксическая группа находится в боковой цепи аминокислоты, а α -амино- и карбоксильная группы, определяющие основные биохимические свойства аминокислот и являющиеся важными для активного транспорта через клеточные мембраны, сохранены. Наиболее удобными исходными веществами для синтеза такого рода соединений нам представлялись диаминокарбоновые кислоты.

2.1. Синтез N⁰-нитрозокарбамоил производных диаминокарбоновых кислот



Были разработаны методы синтеза метил-, циклогексил- и 2-хлорэтил-нитрозокарбамоил производных аминокислот **1-9***. Соединения **1-9** получали путем карбамоилирования медных комплексов диамино кислот (L-2,4-диаминомасляной кислоты, L-(и D-)орнитина и L-4-тиализина) соответствующим алкилизотиоцианатом с последующим разложением сероводородом и нитрозированием нитритом натрия в кислой среде.

Проведение нитрозирования карбамоилпроизводных при pH 1-2 обеспечивало защиту α-аминогруппы протонированием. Известно, что в этих условиях возможно образование изомеров положения нитрозогруппы. Направление нитрозирования в ряду синтезированных соединений определяется структурой алкильного заместителя и не зависит от структуры аминокислотного фрагмента. Установлено, что нитрозирование N⁰-метилкарбамоил производных протекает региоселективно с образованием соединений **1-3** с нитрозогруппой у атома азота, связанного с CH₃-группой. Нитрозирование N⁰-циклогексилкарбамоил производных протекало региоселективно с образованием соединений **4-5** с нитрозогруппой у N⁰-атома аминокислотного фрагмента, что, по-видимому, обусловлено стерическим влиянием циклогексильного радикала.



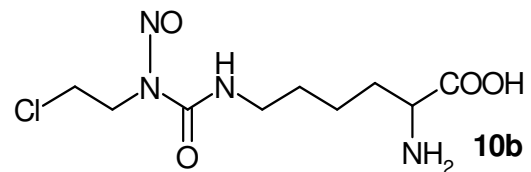
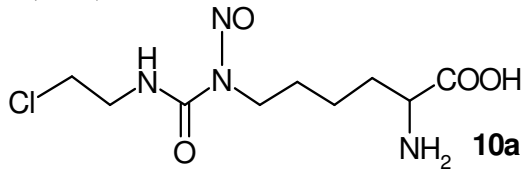
Нитрозирование N⁰-(2-хлорэтил)карбамоил производных приводило к

* Работы были начаты под руководством к.х.н. Лии Борисовны Радиной, которой автор выражает глубокую признательность и благодарность.

образованию смесей изомеров положения нитрозогруппы **6-9 a-b**, причем строение аминокислотного фрагмента не влияло на соотношение образующихся изомеров, которое составляло (по данным ВЭЖХ) 74-80:26-20.

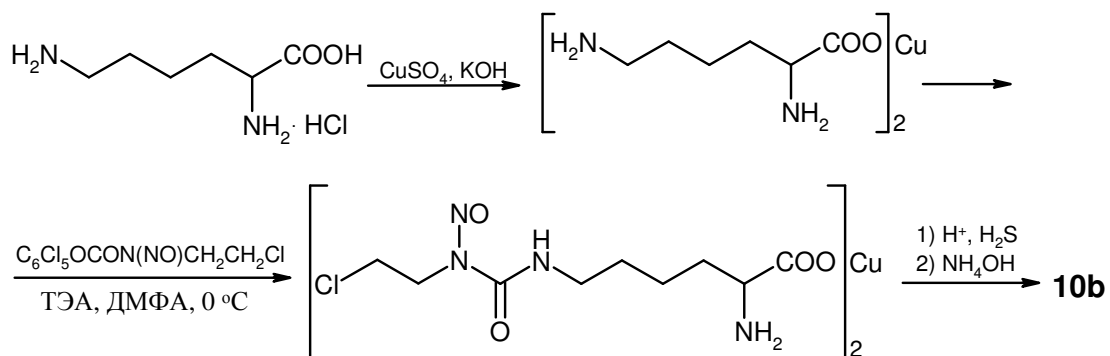
2.2. Синтез и свойства изомеров положения нитрозогруппы в (2-хлорэтил)нитрозомочевине на основе L-лизина

Первоначально на основе L-лизина в нашей исследовательской группе была получена смесь (2-хлорэтил)нитрозомочевин: N^ε-нитрозо-N^ε-[(2-хлорэтил)карбамоил]-L-лизин (**10a**) и N^ε-[(2-хлорэтил)-N-нитрозокарбамоил]-L-лизин (**10b**).



В результате скрининга было установлено, что смесь соединений **10a** и **10b**, получившая название «лизомустин», проявляет наибольшую активность в ряду синтезированных АНК производных аминокислот. С целью выяснения особенностей противоопухолевого действия и вклада каждого из изомеров в противоопухолевую активность смеси был проведен синтез индивидуальных изомеров **10a** и **10b**. Для получения изомера **10a** были использованы различия в гидролитической устойчивости изомеров **10a** и **10b** (см. раздел 2.3.). Изомер **10a**, содержание которого в смеси составляет около 80%, более устойчив в водных растворах, чем изомер **10b**. Экспериментально были найдены условия, при которых происходило практически полное разложение изомера **10b** при частичном разложении изомера **10a**. Выход соединения **10a** составлял 53%, считая на исходное количество изомера **10a** в смеси.

Для синтеза изомера **10b** использован региоселективный путь, основанный на применении «активированных» N-алкилнитрозокарбаматов. Образующийся при карбамоилировании медного комплекса L-лизина пентахлорфениловым эфиром N-(2-хлорэтил)-N-нитрозокарбаминовой кислоты, медный комплекс разлагали сероводородом в разбавленной HCl и выделяли соединение **10b** нейтрализацией водным аммиаком. Очистку соединения **10b** проводили дополнительным переосаждением из разбавленной HCl водным аммиаком. Общий выход соединения **10b** в расчете на гидрохлорид L-лизина составлял около 20%.



Изомеры **10a** и **10b** различаются по своим спектральным (УФ, ИК, ¹H ЯМР) характеристикам, а также временами удерживания (ВЭЖХ).

2.3. Изучение кинетики гидролитического разложения

N^{ω} -нитрозокарбамоил производных диаминокарбоновых кислот

Противоопухоловое действие АНМ обусловлено их способностью к гидролитическому распаду в организме с образованием реакционно-способных цитотоксических продуктов. Причем биологическая активность и спектр противоопухолового действия зависят как от скорости распада, так и от природы образующихся продуктов.

Таблица 2.1. Константы скорости реакции разложения (k) и периоды полураспада ($T_{0,5}$) N^{ω} -нитрозокарбамоил производных диаминокарбоновых кислот (фосфатный буфер, 37 °С)

№ соед.	Формула	pH	$k \times 10^3$, мин ⁻¹	$T_{0,5}$, мин
1	$CH_3N(NO)CONH(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$	7,4	3,44	202
2	$CH_3N(NO)CONH(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$	7,4	1,21	573
4	$C_6H_{11}NHCON(NO)(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$	7,4	3,62	191
6a-b	$ClCH_2CH_2NHCON(NO)(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$ $ClCH_2CH_2N(NO)CONH(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$	7,4	9,45	73,3
7a-b	$ClCH_2CH_2NHCON(NO)(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$ $ClCH_2CH_2N(NO)CONH(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$	7,4	6,17	112
3	$CH_3N(NO)CONH(CH_2)_2SCH_2CH(NH_2)COOH$	7,0	0,515	1350
5	$C_6H_{11}NHCON(NO)(CH_2)_2SCH_2CH(NH_2)COOH$	7,0	1,74	398
9a-b	$ClCH_2CH_2NHCON(NO)(CH_2)_2SCH_2CH(NH_2)COOH$ $ClCH_2CH_2N(NO)CONH(CH_2)_2SCH_2CH(NH_2)COOH$	7,0	3,18	218

С целью изучения зависимости гидролитической устойчивости синтезированных АНК производных от их строения нами проведено изучение кинетики разложения в условиях, близких к физиологическим - при температуре 37 °С в фосфатном буферном растворе (при pH 7,4 или 7,0). Текущую концентрацию указанных соединений определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности, обусловленной наличием N-нитрозогруппы (в максимумах поглощения при 230 или 397 нм). Константы скорости реакции разложения (k) рассчитывали из зависимости текущей концентрации соединения (c) от времени (T) в координатах $\ln(c/c_0) - T$ (c_0 - начальная концентрация) как константу скорости реакции псевдопервого порядка по методу наименьших квадратов (табл. 2.1.).

Поскольку скорости разложения изомеров положения нитрозогруппы в 2-хлор-этильных производных **6-9** различны и их содержание в смеси может меняться в зависимости от различных факторов, константы скорости разложения смесей изомеров, полученные спектрофотометрическим методом, не характеризуют в достаточной мере процесс гидролитического разложения указанных соединений. В связи с этим сравнительное изучение кинетики разложения отдельных изомеров в их смеси проведено с использованием метода ВЭЖХ*, позволяющего количественно определить текущую концентрацию каждого из изомеров.

* Исследования с использованием метода ВЭЖХ проведены совместно с к.х.н. Гришаковым А.Н.

Изучение кинетики разложения смесей изомеров **7a-b**, **9a-b**, **10a-b** проводили в фосфатном буферном растворе при pH 7,4 и температуре 37 °C (детектирование при 230 нм, внутренний стандарт - теофиллин). Константы скорости реакции разложения (k), рассчитанные по методу наименьших квадратов как константы скорости реакции псевдопервого порядка, и периоды полураспада ($T_{0,5}$) представлены в табл. 2.2.

Таблица 2.2. Константы скорости реакции разложения (k) и периоды полураспада ($T_{0,5}$) соединений **7a**, **7b**, **9a**, **9b**, **10a**, **10b** (фосфатный буфер pH 7,4, 37 °C)

№ соед.	Формула	$k \times 10^3$, мин ⁻¹	$T_{0,5}$, мин
7a	<chem>ClCH2CH2NHCON(NO)(CH2)3CH(NH2)COOH</chem>	4,06	171
7b	<chem>ClCH2CH2N(NO)CONH(CH2)3CH(NH2)COOH</chem>	7,31	94,8
9a	<chem>ClCH2CH2NHCON(NO)(CH2)2SCH2CH(NH2)COOH</chem>	6,15	113
9b	<chem>ClCH2CH2N(NO)CONH(CH2)2SCH2CH(NH2)COOH</chem>	10,3	67,3
10a	<chem>ClCH2CH2NHCON(NO)(CH2)4CH(NH2)COOH</chem>	3,36	206
10b	<chem>ClCH2CH2N(NO)CONH(CH2)4CH(NH2)COOH</chem>	6,33	110

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что на устойчивость синтезированных АНК α -аминокислот влияет строение как нитрозомочевинной группы, так и аминокислотного фрагмента. Метильные производные **1-3** обладают наибольшей стабильностью в каждой группе соединений по сравнению с другими АНК производными, по-видимому, из-за того, что электронодонорная CH_3 -группа затрудняет отрыв амидного протона за счет увеличения электронной плотности на атоме азота. В случае 2-хлорэтильных производных **7-9** электронодонорные свойства ClCH_2CH_2 -заместителя ослаблены за счет влияния атома Cl. Отмеченное в литературе специфическое участие 2-хлорэтильной группы в распаде АНМ, по-видимому, также увеличивает скорость разложения этих производных по сравнению с метильными и циклогексильными.

В случае изомеров положения NO-группы, 2-хлорэтильные производные **7b**, **9b** и **10b**, в которых NO-группа находится у атома азота, соединенного с 2-хлор-этильным радикалом, менее устойчивы, чем их изомеры **7a**, **9a** и **10a**.

Уменьшение числа метиленовых групп аминокислотного фрагмента приводит к снижению устойчивости АНК производных аминокислот, возможно, в связи с увеличением электроноакцепторного влияния α -аминогруппы. Введение атома серы в 4-е положение аминокислотного фрагмента также приводит к снижению устойчивости соединений, вероятно, за счет специфического участия серы в реакции разложения.

2.4. Противоопухолевая активность N^o-нитрозокарбамоил производных диаминокарбоновых кислот

Противоопухолевая активность соединений **2**, **3**, **5-9** в опытах *in vivo* изучалась в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН к.б.н. Перетолчиной Н.М. на мышах с перевиваемыми солидными опухолями (аденокарциномой молочной железы Ca-755, карциномой легкого Льюиса LLC) и лейкозами (L1210, La).

В результате сравнения с ближайшими аналогами: метилнитрозомочевинной (МНМ) и N^e- (метил-N-нитрозокарбамоил)-L-лизином установлено,

что N^δ-(метил-N-нитрозокарбамоил)-L-орнитин (**2**) и N^ε-(метил-N-нитрозокарбамоил)-L-4-тиализин (**3**), проявляя высокий противоопухолевый эффект как в отношении солидных опухолей, так и лейкоза L1210 с индуцированной лекарственной устойчивостью к действию известных противоопухолевых средств, превосходят их по величине противоопухолевой активности.

2-Хлорэтильные производные на основе D-орнитина (**8a-b**) проявили меньшую противоопухолевую активность, чем производные L-орнитина (**7a-b**). При сравнении противоопухолевого действия смеси изомеров **7a-b** и лизомустина (**10a-b**) установлено, что уменьшение длины алкильной цепи между аминокислотным и нитрозомочевинным фрагментом молекулы приводит к повышению токсичности без увеличения активности.

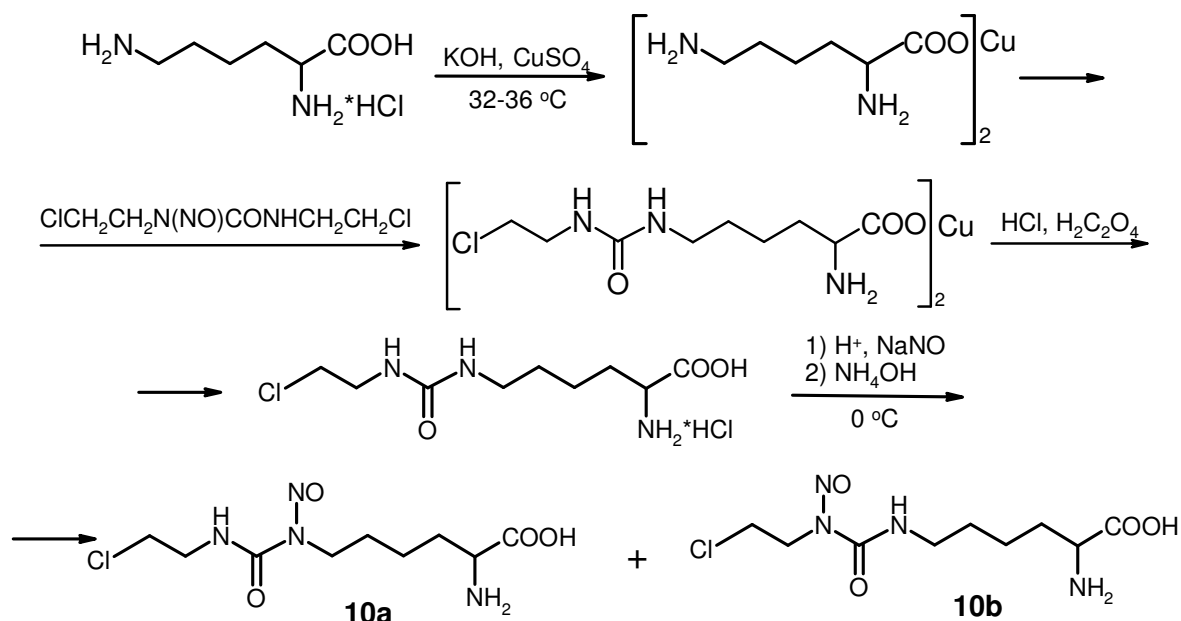
В результате экспериментального изучения противоопухолевой активности АНК производных L-4-тиализина (**3, 6, 9**) был сделан вывод о том, что величина противоопухолевого эффекта и спектр действия АНК производных существенно зависят от структуры алкильного заместителя уреидогруппы, а замена метиленовой группы на атом S в 4-м положении аминокислотного фрагмента приводит к снижению противоопухолевой активности.

Сравнительное изучение противоопухолевой активности синтезированных нами АНК производных показало, что наиболее перспективной для дальнейшего продвижения в клинику является смесь изомеров **10a-b**.

2.5. Разработка методов получения и контроля качества субстанции противоопухолевого препарата лизомустин

2.5.1. Получение субстанции препарата лизомустин

В основу технологии получения субстанции лизомустина была положена разработанная ранее схема синтеза, которая включала карбамоилирование медного комплекса L-лизина 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевинной, обработку образующегося медного комплекса N^ε-(2-хлорэтилкарбамоил)-L-лизина щавелевой кислотой в кислой среде и нитрозирование N^ε-(2-хлорэтилкарбамоил)-L-лизина (без его выделения) нитритом натрия с последующей нейтрализацией кислого раствора водным аммиаком.



Замена 2-хлорэтилизоцианата 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевинной в качестве карбамоилирующего агента позволило избежать использование трудно-доступного и токсичного соединения. Для упрощения процесса получения и увеличения выхода субстанции лизомустина нами было предложено проводить нитрозирование N^ε-(2-хлорэтил)карбамоил-L-лизина без его выделения из кислого раствора. Получающийся в результате нейтрализации «технический» продукт содержит от 96 до 98 % основного вещества, примеси хлоридов аммония и натрия в количестве от 0,5 до 2,0 %, а также органические примеси в количестве до 1,5 %. Соотношение изомеров **10a-b** в составляет примерно 80:20. Нами предложена процедура коррекции изомерного состава с одновременным увеличением содержания основного вещества в субстанции препарата путем переосаждения «технического» продукта из разбавленного раствора соляной кислоты. При получении субстанции препарата согласно разработанному нами методу выход продукта, содержащего не менее 98 % основного вещества и изомеры **10a-b** в соотношении (77÷74):(23÷26), составляет около 40 % в расчете на гидрохлорид L-лизина.

На основании проведенных нами исследований разработаны лабораторный и опытно-промышленный регламенты (ОПР 04739512-2-2008) получения субстанции и Фармакопейная статья предприятия (ФСП 42-0494-4519-03) на субстанцию препарата с указанием показателей качества, которым она должна соответствовать, и методов их контроля. Найденные нами технические решения были успешно реализованы на предприятии ООО «АКАДЕМФАРМ» (г. Екатеринбург) и в ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН во время выпуска субстанции лизомустина.

2.5.2. Методы контроля качества субстанции лизомустина

Основными методами контроля качества субстанции препарата лизомустин являются определение содержания основного вещества и изомерного состава.

Лизомустин представляет собой многофункциональное соединение, содержащее в своем составе амина и карбоксильную группу, легко гидролизуемый атом хлора, хромофорную нитрозо группу. Все это делает возможным использовать для количественного определения различные методы: спектрофотометрический, полярографический, газообъемный, а также титрование амина и карбоксильной групп или ионов хлора. Однако, поскольку вещество является химически нестабильным, особенно, в водных растворах, большое значение имеет время пробоподготовки. В результате сравнения нами установлено, что наиболее простым, быстрым и удобным из перечисленных методов является спектрофотометрический метод, основанный на хромофорных свойствах нитрозо группы. Для определения содержания основного вещества предложено использовать полосу поглощения нитрозо группы с максимумом около 396 нм.

Существенным отличием лизомустина от применяемых в клинике препаратов класса АНМ является то, что он представляет собой смесь изомеров. Разработка методов анализа изомерного состава субстанции лизомустина, обеспечивающих достаточную точность, стала возможна после получения нами индивидуальных изомеров **10a** и **10b**. Для контроля изомерного состава субстанции, являющегося важным показателем, определяющим терапевтический эффект препарата, нами предложено три метода: весовой,

аминокислотного анализа и ВЭЖХ.

Наиболее удобным и точным из них является метод анализа изомерного состава субстанции, основанный на использовании ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте. Относительная ошибка метода не превышает 2%, что позволило его использовать при составлении фармакопейных статей на субстанцию и лекарственную форму препарата.

Разработанные технологические регламенты получения субстанции препарата, основанные на использовании доступного сырья и стандартного оборудования, позволили обеспечить проведение его широких клинических испытаний.

2.6. Биологическая активность лизомустина и его изомеров

В ходе проведенных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН исследований было определено соотношение изомеров **10a** и **10b**, обеспечивающее оптимальный противоопухолевый эффект препарата. Противоопухолевая активность лизомустина оценивалась в сравнении с АНМ, используемыми в клинике (МНМ и кармустином). Показано, что лизомустин проявляет высокий противоопухолевый эффект при лечении большого числа экспериментальных солидных опухолей и лейкозов, по величине и длительности противоопухолевой активности значительно превосходит МНМ, а по ряду показателей - и кармустин: обладает высокой избирательностью противоопухолевого действия; не имеет или имеет лишь частичную перекрестную резистентность с рядом широко используемых в клинике противоопухолевых препаратов; столь же эффективен при лечении развившихся опухолей, как и при лечении в ранние сроки.

В результате предклинического изучения фармакокинетики лизомустина были выбраны оптимальные дозы и режимы применения препарата в клинике. В ходе I фазы клинических испытаний определена терапевтическая доза препарата и выбран оптимальный режим введения: 400-500 мг/м² 1 раз в 4-6 недель или 300 мг/м² в 1-й, 8-й дни, интервалы между курсами – 6 недель.

Клинические испытания препарата показали, что лизомустин хорошо переносится и проявляет высокую эффективность в отношении злокачественных меланомы, лимфосаркомы, а также при лечении больных раком легкого. Важной особенностью препарата лизомустин является низкая токсичность и антиметастатическое действие, особенно, в отношении метастазов рака легкого в печень и головной мозг. Это позволяет считать целесообразным применение лизомустина для лечения тяжелых больных, больных пожилого возраста и в амбулаторных условиях.

Министерство здравоохранения РФ разрешило медицинское применение препарата лизомустин в качестве противоопухолевого средства и его промышленный выпуск (Регистрационное удостоверение Р № 00364/01 от 01.12.03). Лекарственная форма лизомустина – «Лизомустин-лиофилизат для приготовления раствора для инфузий» зарегистрирована и внесена в Государственный реестр лекарственных средств (Регистрационное удостоверение № ЛС-002311 от 01.12.2006).

В настоящее время закончена II фаза клинических испытаний. Показана эффективность использования лизомустина в режиме полихимиотерапии в комбинации с цисплатином и вепезидом. Субстанция препарата лизомустин выпускается ООО «АКАДЕМФАРМ» (Екатеринбург), лекарственная форма -

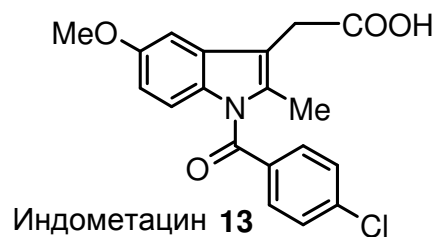
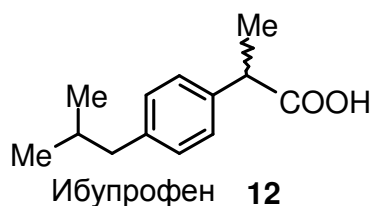
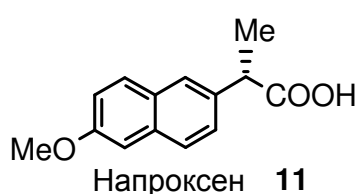
ООО «Фирма ГЛЕС» (Москва). Проводятся НИОКР для организации полномасштабного производства препарата лизомустин на ООО «Завод МЕДСИНТЕЗ» (г. Новоуральск Свердловской области). В настоящее время проводятся исследования эффективности использования препарата для лечения больных с другими формами онкологических заболеваний.

Глава 3. Синтез и изучение физиологической активности амидов

(S)-напроксена, ибупрофена и индометацина с производными аминокислот

Для снижения побочных эффектов нестероидных противовоспалительных препаратов (НСПВП) нами предложено использовать природные аминокислоты в качестве транспортной функции.

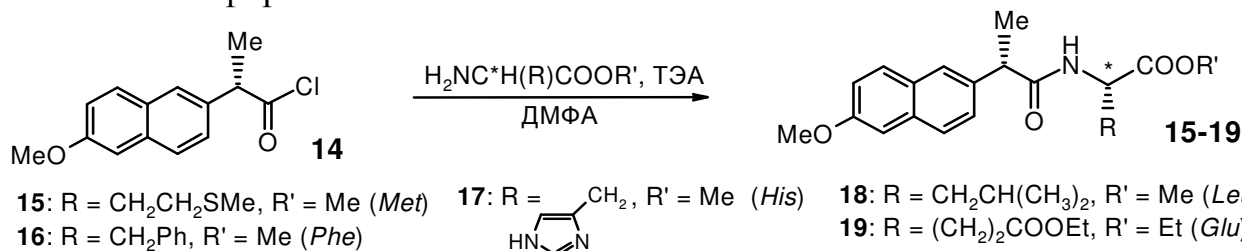
НСПВП представляют собой уникальный класс лекарственных средств и являются наиболее назначаемыми препаратами. Механизм противовоспалительного и анальгетического действия НСПВП связан с их способностью ингибировать фермент циклооксигеназу (ЦОГ). Известно, что обычно назначаемые НСПВП в несколько раз сильнее ингибируют ЦОГ-1, выполняющую нормализующие функции в тканях, по сравнению с ЦОГ-2, которая индуцируется и быстро активируется в ответ на различные факторы воспаления. Такое действие НСПВП обуславливает их побочные эффекты, главным образом, гастротоксичность.



Использование природных аминокислот для транспортировки фармакофорных групп (фрагментов известных НСПВП) представлялось перспективным, поскольку НСПВП будут переноситься в клетки воспаленных тканей, не затрагивая ЦОГ-1, что, по нашему мнению, может привести к снижению побочных эффектов. Нами проведена модификация наиболее часто назначаемых НСПВП: (S)-напроксена **11**, (R,S)-ибупрофена **12** и индометацина **13**, производными аминокислот и дипептидов.

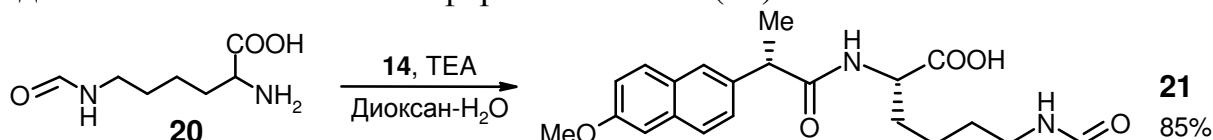
3.1. Синтез амидов (S)-напроксена

Амиды **15-19** (S)-напроксена [(2S)-2-(6-метоксинафт-2-ил)пропионовой кислоты] с алкиловыми эфирами L-метионина, L-фенилаланина, L-гистидина, L-лейцина и L-глутаминовой кислоты были получены с выходами от 50 до 80% путём конденсации хлорангидрида (S)-напроксена (**14**) с соответствующими алкиловыми эфирами аминокислот.

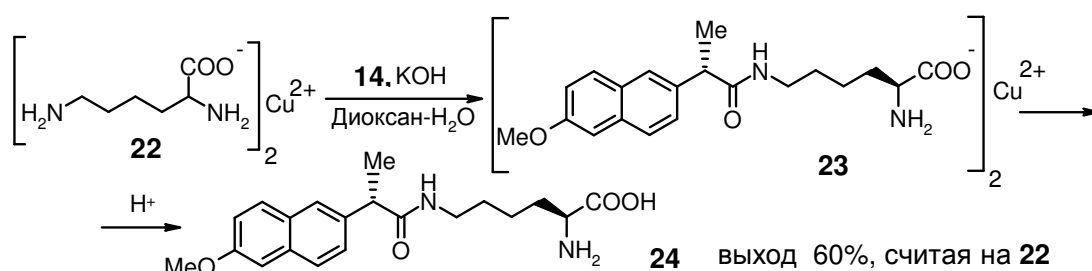


Региоизомерные амиды (S)-напроксена **21** и **24** с диаминокислотой, L-лизином, были получены в результате избирательного ацилирования α- или ε-аминогруппы хлорангидридом **14**. В первом случае в качестве исходного

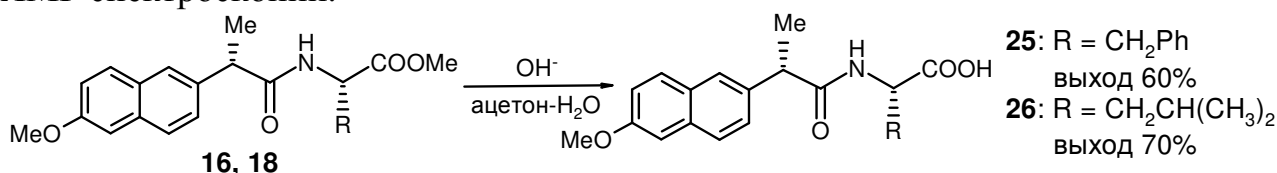
соединения использовали N^ε-формил-L-лизин (**20**).



Для получения амида **24** по ε-аминогруппе в качестве исходного соединения использовали медный комплекс L-лизина (**22**). Затем проводили разложение образующегося медного комплекса **23** разбавленным раствором соляной кислоты.

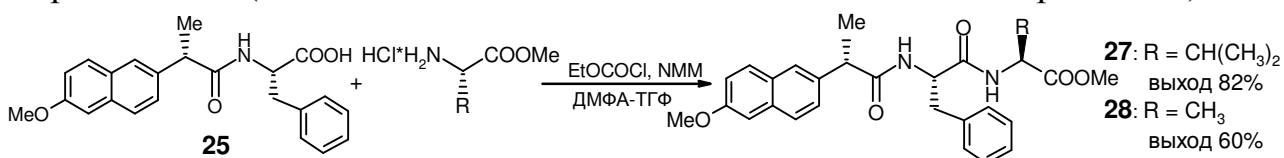


Синтез амидов (*S*)-напроксена и аминокислот со свободной карбоксильной функцией (**25** и **26**) осуществлен путем избирательного гидролиза сложноэфирной группы метиловых эфиров **16** и **18** при 0 °С. Мягкие условия реакции позволяли избежать рацемизации по какому-либо из асимметрических центров молекул амидов **25** и **26**, что доказано данными ¹H ЯМР спектроскопии.

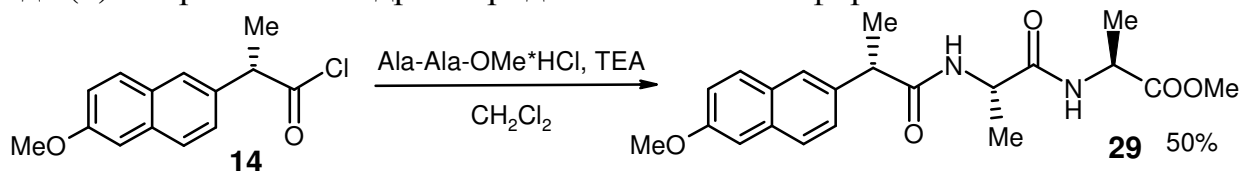


Для получения амидов **27-29** (*S*)-напроксена с дипептидами использовали как последовательное наращивание аминокислотной цепи, так и прямую конденсацию (*S*)-напроксена с метиловым эфиром дипептида.

Синтез (*2S,2S,2S*)-амидов **27** и **28** был осуществлён путём конденсации (*2S,2S*)-амида напроксена и L-фенилаланина **25** с метиловыми эфирами L-валина и L-аланина методом смешанных ангидридов. Реакцию проводили путем активации кислоты этилхлорформиатом (ЭХФ) в присутствии аминокислоты и третичного основания. Данный метод позволяет избежать значительной рацемизации по асимметрическому атому фенилаланина и получить целевой продукт с более высоким выходом и высокой степенью стереочистоты (*de* около 97% по данным ВЭЖХ и ¹H ЯМР спектроскопии).

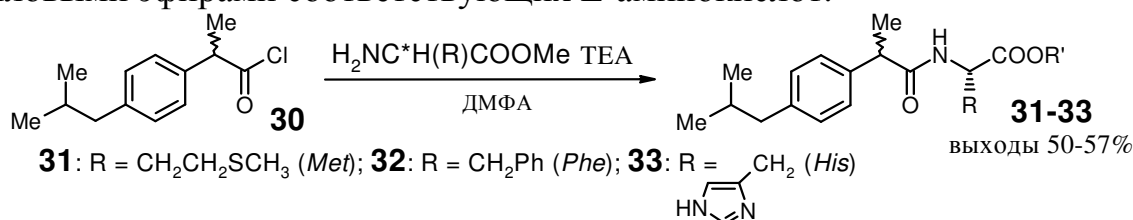


(*2S,2S,2S*)-Амид напроксена **29** получен прямой конденсацией хлорангидрида (*S*)-напроксена с гидрохлоридом метилового эфира L-аланил-L-аланина:



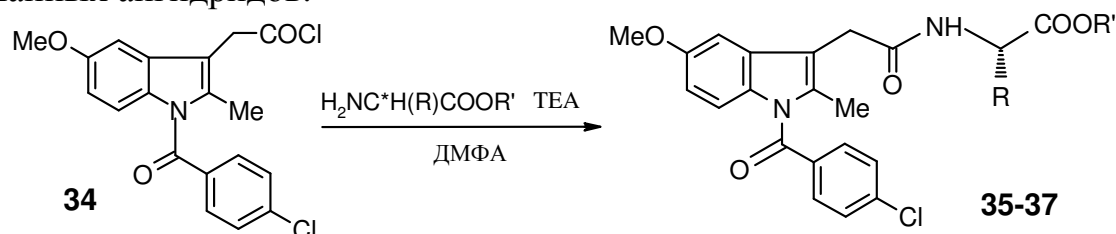
3.2. Синтез амидов ибупрофена

Амиды **31-33** ибупрофена [(*RS*)-2-(4-изобутил)фенилпропионовой кислоты] с алкиловыми эфирами L-метионина, L-фенилаланина и L-гистидина были получены путём конденсации хлорангидрида ибупрофена (**30**) с метиловыми эфирами соответствующих L-аминокислот.



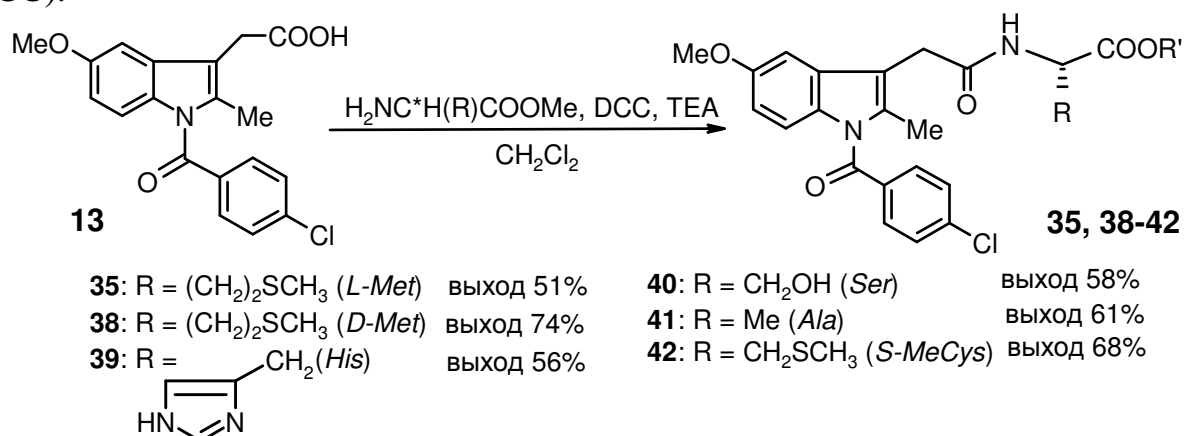
3.3. Синтез амидов индометацина

Синтез амидов индометацина [1-(4-хлорбензоил)-5-метокси-2-метилиндол-3-уксусной кислоты] (**13**) с производными аминокислот осуществляли различными методами: хлорангидридным, карбодиимидным и методом смешанных ангидридов.

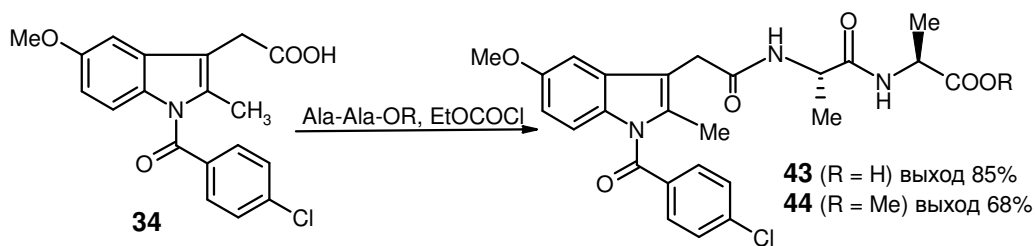


Амиды **35-37** индометацина с алкиловыми эфирами L-метионина, L-фенил-аланина, L-глутаминовой кислоты получены путём конденсации хлорангидрида индометацина **34** с соответствующими производными аминокислот с выходами от 34 до 73%.

Амиды **35, 38-42** индометацина и метиловых эфиров L-серина, L-гистидина, L-аланина, L- и D-метионина, и S-метил-L-цистеина были получены карбодиимидным методом в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC).



Методом смешанных ангидридов в присутствии ЭХФ были получены амиды **43** и **44** индометацина с L-аланил-L-аланином и его метиловым эфиром. Синтез амида **43** со свободной карбоксильной группой аминокислотного фрагмента проводили в смеси H₂O-ТГФ в присутствии КОН и ТЭА, а амид **44** получали в смеси ДМФА-ТГФ в присутствии N-метилморфолина.



В отличие от амидов напроксена амид индометацина **34** со свободной карбоксильной группой аминокислотного фрагмента может быть получен только прямой конденсацией индометацина с аминокислотой или дипептидом. Щелочной гидролиз амида индометацина с алкиловым эфиром аминокислоты в условиях, описанных выше для гидролиза амидов напроксена, приводил к отщеплению хлорбензоильного фрагмента индометацина.

В результате предварительного изучения противовоспалительной активности синтезированных амидов в эксперименте на животных (раздел 3.4) амид индометацина и метилового эфира L-метионина **35** был выбран как наиболее перспективное соединение, обладающее высокой противовоспалительной активностью и низкой токсичностью. С целью оптимизации синтеза указанного соединения проведено сравнительное изучение различных методов конденсации: карбодиимидного, хлорангидридного и метода смешанных ангидридов. Наилучшие выходы (67%) были получены при проведении конденсации индометацина с метиловым эфиром L-метионина в присутствии DCC при 0 °C. Этот метод является наиболее простым и удобным из изученных методов создания амидной связи.

3.4. Физиологическая активность синтезированных амидов

Была исследована противовоспалительная и анальгетическая активность, а также острая токсичность 15 соединений*.

Противовоспалительную активность соединений изучали на беспородных белых крысах на модели каррагенинового отека. Анальгетическую активность изучали на беспородных белых мышях на модели «уксусных корчей». Соединения вводили животным внутрибрюшинно (или перорально) в дозах, соответствующих ED₅₀ исходных НСПВП с коэффициентом пересчета, учитывающим содержание препаратов в амидах. Острую токсичность соединений с вычислением ЛД₅₀ определяли на беспородных белых мышях по экспресс-методике В.Б. Прозоровского. Полученные результаты сравнивали с активностью исходных препаратов.

Результаты проведенных исследований показали, что из семи исследованных производных напроксена только два – амиды напроксена с метиловыми эфирами L-гистидина **17** и L-лейцина **18** проявляют противовоспалительную активность, близкую к активности напроксена. Результаты теста на анальгетическую активность показали более выраженную картину: из семи исследованных соединений четыре показали достоверное анальгетическое действие, не отличающееся от напроксена, причем амид **17**, проявивший противовоспалительную, также проявил и высокую анальгети-

* Исследование биологической активности синтезированных амидов проведено в Институте технической химии УрО РАН под руководством к.б.н. Л.В. Аникиной и в Естественнонаучном институте при Пермском государственном университете под руководством к.фарм.н. В.А. Сафина.

ческую активность. При определении острой токсичности соединений было установлено, что все соединения кроме амида **21** имеют ЛД₅₀ выше 3000 мг/кг.

Амиды ибупрофена с метиловыми эфирами L-фенилаланина (**32**) и L-гистидина (**33**) показали анальгетический и противовоспалительный эффект, достоверно неотличимый от исходного препарата. При пероральном способе применения противовоспалительной активности не наблюдалось. Анальгетической активностью, достоверно не отличающейся от препарата сравнения, обладают все производные ибупрофена. Наибольшую активность проявил амид **33** ибупрофена с метиловым эфиром фенилаланина. При определении острой токсичности установлено, что ЛД₅₀ всех исследованных амидов ибупрофена составляет более 3000 мг/кг.

Результаты проведенных исследований (табл. 3.1) показали, что все пять изученных производных индометацина проявляют противовоспалительную активность на модели каррагенинового отека, из них два соединения, амиды индометацина с метиловыми эфирами L-метионина **35** и L-гистидина **39**, достоверно неотличимы по силе действия от индометацина. Наибольшую анальгетическую активность проявили амиды индометацина с метиловыми эфирами L-метионина **35** и L-фенилаланина **36**, а соединение **40** (амид индометацина с метиловым эфиром серина) не показало анальгетической активности на данной модели.

Таблица 3.1. Острая токсичность, противовоспалительная и анальгетическая активность амидов индометацина **35-37, 39, 40**

Соединение (аминокислота)	ЛД ₅₀ , мг/кг	Противовоспалительная активность		Анальгетическая активность	
		Доза, мг/кг	Торможение отека стопы по отношению к контролю, %	Доза, мг/кг	Торможение количества корчей по отношению к контролю, %
35 (Met-OMe)	>3000	14,1	55,6	15,6	66,2
36 (Phe-OMe)	>3000	14,5	45,6	16,0	60,9
37 (Glu-OEt)	>3000	15,2	42,6	16,7	32,3
39 (His-OMe)	>3000	14,2	58,1	15,6	40,6
40 (Ser-OMe)	>3000	12,8	32,8	14,1	0,0
Индометацин	274	10,0	68,6	11,0	82,7

В ходе ряда специальных экспериментов было также установлено, что в сравнении с индометацином амид **35** обладает гораздо более низкой гастротоксичностью, не оказывает антипролиферативного действия, не обладает гепатотоксичностью и токсическим действием на форменные элементы крови и компоненты иммунной системы. Исследование острой токсичности показало, что ЛД₅₀ всех изученных амидов индометацина более 3000 мг/кг.

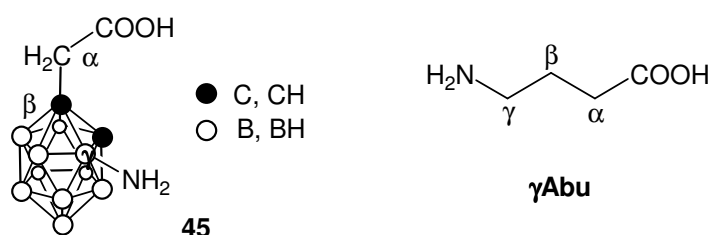
Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что модификация известных НСПВП производными природных аминокислот приводит к существенному снижению побочных эффектов при сохранении высокой противовоспалительной и анальгетической активности.

Глава 4. Синтез производных карборан-содержащих аминокислот – потенциальных агентов для бор-нейтронозахватной терапии опухолей

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) – одно из важнейших современных направлений комбинированной терапии опухолей, в том числе не поддающихся хирургическому лечению. В последнее десятилетие активно

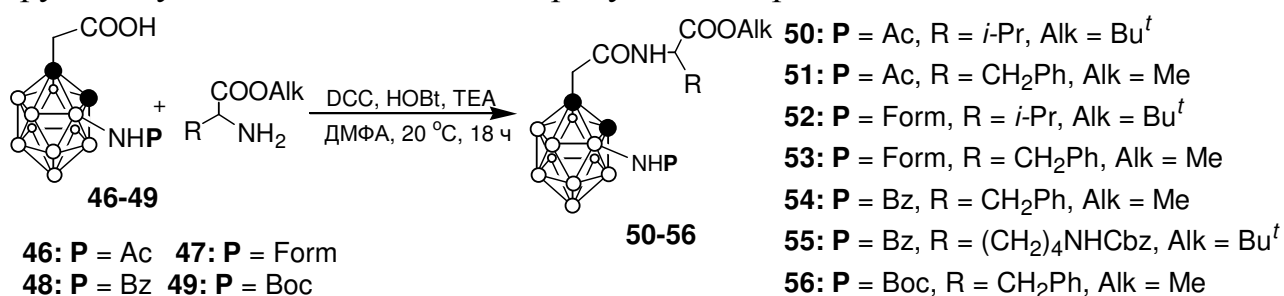
ведутся исследования, направленные на поиск новых агентов для БНЗТ. Весьма перспективными в этом отношении являются молекулы, содержащие в своей структуре остатки *клозо*-карборанов, отличающихся высоким содержанием бора. Актуальной проблемой является селективный транспорт карборанил-содержащих соединений в опухолевые клетки. Одним из возможных путей решения этой проблемы является модификация природных биомолекул остатками карборанов.

Наиболее перспективным направлением, на наш взгляд, является получение конъюгатов карборанов с аминокислотами, способными обеспечить направленную доставку соединений бора в опухолевые клетки. Особый интерес, в этом отношении, представляет карборан-содержащий аналог **45** γ -аминомасляной кислоты (**γ Abu**) - 2-(3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборан-2-ил)уксусная кислота, строение которой позволяет включать ее в состав пептидов.



4.1. Получение псевдо-дипептидов N-защитенной 2-(3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборан-2-ил)уксусной кислоты и алкиловых эфиров природных аминокислот

С целью получения конъюгатов с производными природных аминокислот проведен выбор оптимального метода конденсации N-защитенных карборанил-содержащих аналогов γ Abu с алкиловыми эфирами природных аминокислот. Среди исследованных методов (хлорангидридный, карбодиимидный, смешанных ангидридов) наибольшие выходы целевых продуктов (60-80%) были получены при использовании DCC в диметилформамиде при комнатной температуре в присутствии 1-гидроксibenзотриазола (HOBT). В других случаях выходы целевых продуктов не превышали 30-40%.



В качестве исходных соединений были использованы N-защитенные производные **46-49** (N-ацетил-, N-формил-, N-бензоил- и N-Вос-) 3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборан-2-ил)уксусной кислоты. В качестве аминокислот использовали соли алкиловых эфиров аминокислот: ацетат *трет*-бутилового эфира D-валина, гидрохлорид метилового эфира L-фенилаланина и гидрохлорид *трет*-бутилового эфира N^ε-карбобензоксид-L-лизина.

Все полученные соединения **50-56** представляют собой смеси диастереомеров, что подтверждено данными ¹H ЯМР спектроскопии. Наиболее характерными сигналами, позволяющими различать диастереомеры, являются сигналы протонов эфирной группы. Соотношение диастереомеров в амидах **51**

и **53-56**, содержащих ароматические фрагменты, было также определено методом ВЭЖХ (детектирование при 230 нм).

В ряде случаев индивидуальные диастереомеры удалось выделить методом фракционной кристаллизации [(*R,R*)-**50**] или флеш-хроматографии [(*R,S*)-**56** и (*S,S*)-**56**]. Абсолютная конфигурация фрагмента карборана в соединениях (*R,R*)-**50** и (*S,S*)-**56** определена методом рентгено-структурного анализа относительно известной конфигурации D-валина и L-фенилаланина, соответственно (рис. 4.1).

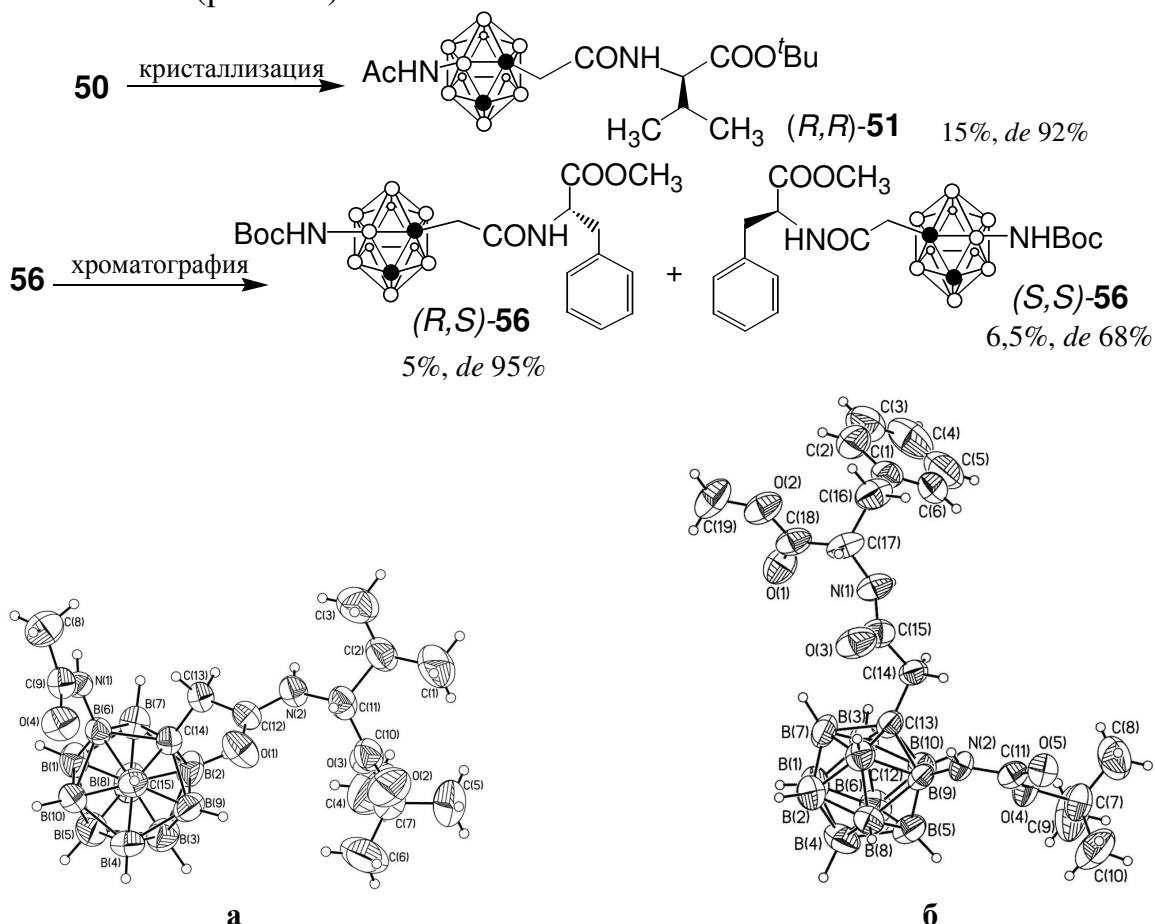
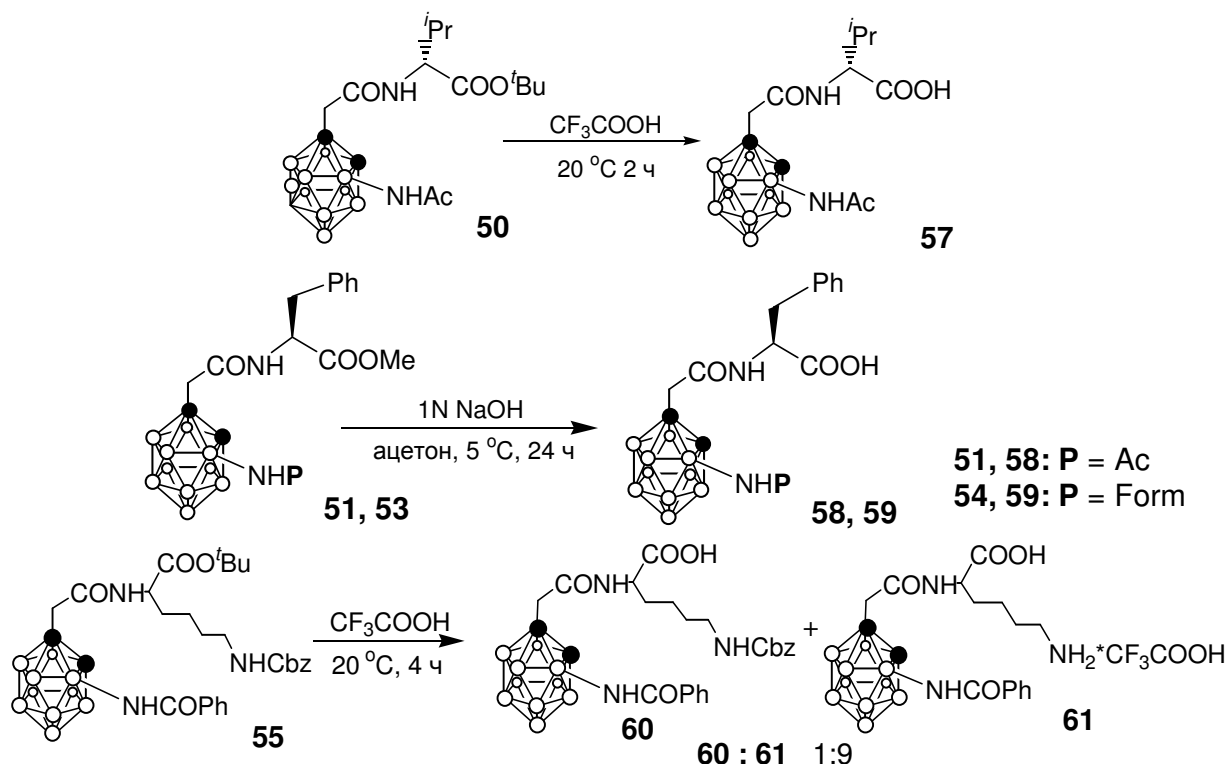


Рисунок 4.1. Структура индивидуальных стереоизомеров (*R,R*)-**50** (а) и (*S,S*)-**56** (б).

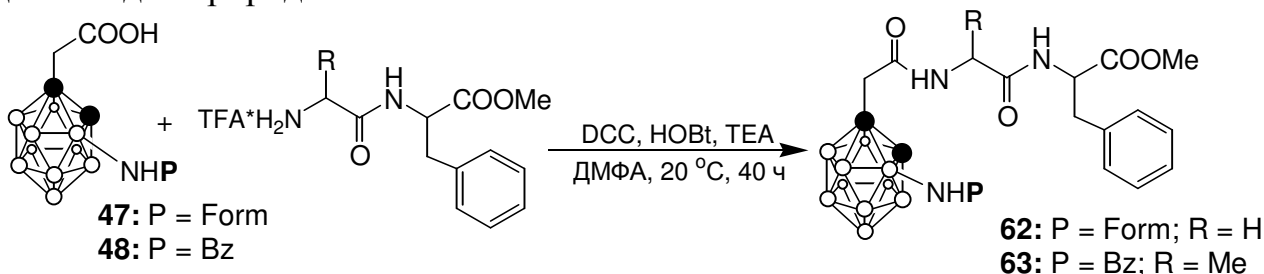
С целью получения псевдо-пептидов со свободной карбоксильной группой и оценки стабильности *клозо*-карборанового ядра в условиях гидролиза проведено удаление С-защитных групп в амидах **50**, **51**, **53** и **55**. Показано, что гидролиз сложных эфиров как в кислых, так и в щелочных условиях происходит с сохранением *клозо*-структуры карборанового фрагмента в продуктах **57-61**, что подтверждено данными спектроскопии ¹H ЯМР и ТСХ (отсутствие *нидо*-производных в продуктах реакции).

Гидролиз *трет*-бутилового эфира производного N^ε-Cbz-L-лизина **55** в трифторуксусной кислоте сопровождался удалением Cbz-защитной группы при ε-аминогруппе. По данным ¹H ЯМР спектроскопии продукт реакции содержал преимущественно соединение **61** с обеими свободными группами фрагмента лизина (COOH и ε-NH₂). Соотношение продуктов **60** и **61** в реакционной массе, по данным спектроскопии ¹H ЯМР, составляло 1:9. Соединение **61** в виде трифторацетата было выделено из смеси продуктов флеш-хроматографией на силикагеле с выходом 32%.

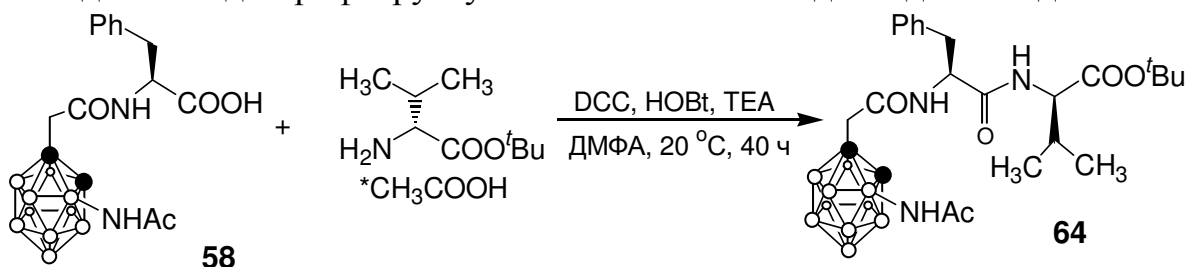


4.2. Получение псевдо-трипептидов 2-(3-амино-1,2-дикарба-клозо-додекаборан-2-ил)уксусной кислоты

Для получения псевдо-трипептидов были использованы два подхода. Первый заключается в конденсации N-защищенных производных 2-(3-амино-1,2-дикарба-клозо-додекаборан-2-ил)уксусной кислоты с метиловыми эфирами дипептидов природных аминокислот.



Однако конденсация N-формил и N-бензоил производных **47** и **48** с метиловыми эфирами глицил-L-фенилаланина и L-аланил-L-фенилаланина при действии DCC в присутствии HOBT в ДМФА при комнатной температуре сопровождалась образованием побочных продуктов и низкими выходами целевых продуктов **62** и **63** (около 20%). Поскольку метиловые эфиры дипептидов были использованы в виде трифторацетатов, среди продуктов реакции преобладали амиды трифторуксусной кислоты и исходных дипептидов.



Более удачным оказался путь последовательного наращивания аминокислотной цепи. Конденсацию N-ацетил дипептида **58**, полученного

щелочным гидролизом метилового эфира **51**, с *трет*-бутиловым эфиром валина проводили карбодиимидным методом в ДМФА. В этом случае выход продукта **64** был около 70%.

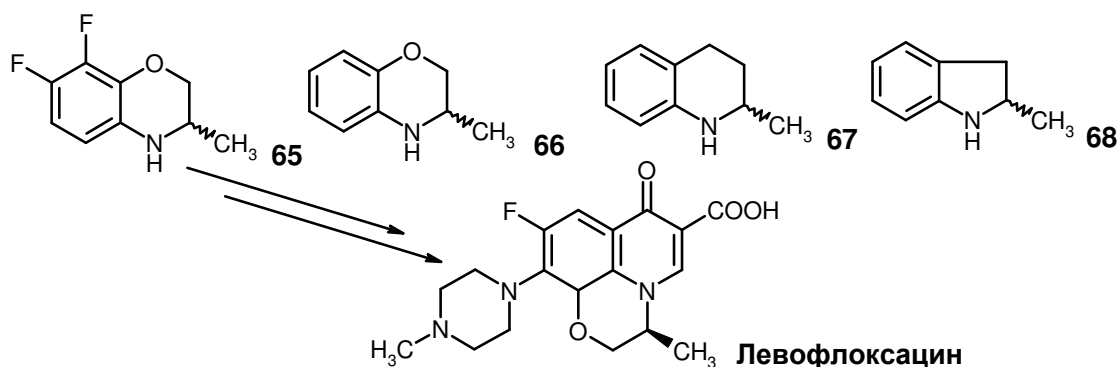
Глава 5. Кинетическое разделение рацемических аминов под действием производных природных аминокислот и других хиральных кислот

Метод кинетического разделения (КР) смесей энантиомеров, основанный на разности скоростей превращения индивидуальных стереоизомеров рацемата в реакциях с асимметрическим реагентом и/или катализатором, занимает особое место среди методов получения индивидуальных стереоизомеров органических соединений. Широкое применение в процессах КР нашли как ацилирующие ферменты (амидазы, протеазы, эстеразы и липазы), так и катализаторы хирального переноса ацила.

Альтернативой методам с применением ферментов и хиральных катализаторов в КР спиртов и аминов являются реакции с энантиоочистыми ацилирующими реагентами. Нами впервые показано, что производные природных аминокислот могут служить эффективными разделяющими агентами в процессах КР. Хотя, ранее считалось, что КР аминов и спиртов производными оптически активных кислот имеет небольшое препаративное значение, в последние годы появились сообщения об использовании именно этих соединений в КР. В известной степени это связано с работами, выполненными в лаборатории асимметрического синтеза ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН.

5.1. Кинетическое разделение гетероциклических аминов с помощью производных жирно-ароматических кислот

Первоначально нами в качестве хирального разделяющего агента для КР рацемических гетероциклических аминов - 2,3-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-4*H*-1,4-бензоксазина (**65**), 2,3-дигидро-3-метил-4*H*-1,4-бензоксазина (**66**), 2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина (**67**) и 2-метилиндолина (**68**), представляющих интерес в качестве фрагментов соединений, обладающих биологической активностью, было предложено использовать хлорангидрид (*S*)-напроксена (**14**).

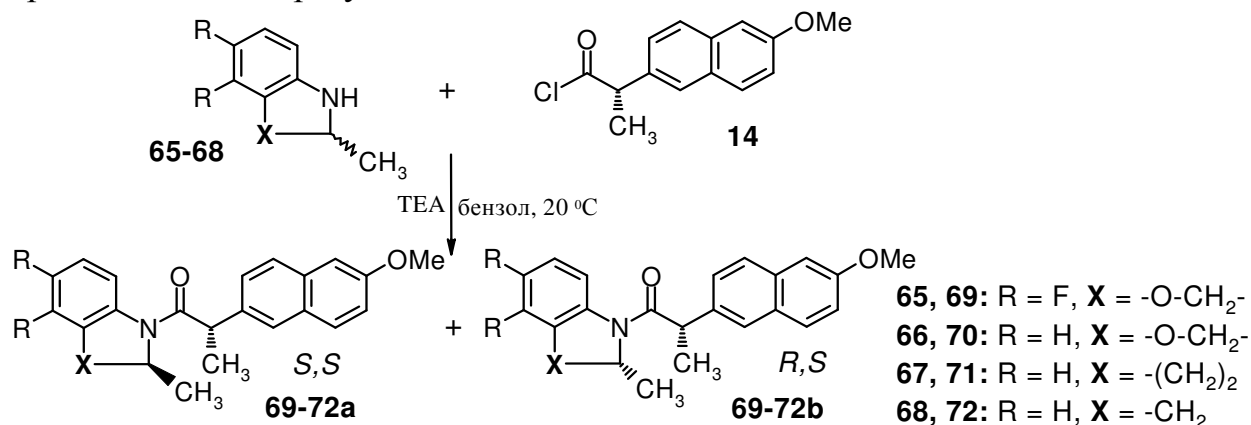


Особый практический интерес представляет получение (*S*)-2,3-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-4*H*-1,4-бензоксазина, (*S*)-**65**, ключевого интермедиата и структурного фрагмента левофлоксацина, высокоактивного антибиотика ряда фторхинолонов.

5.1.1. Кинетическое разделение гетероциклических аминов с помощью хлорангидрида (*S*)-напроксена

В результате ацилирования аминов **65-68** хлорангидридом **14** в стехиометрических количествах в бензоле в присутствии триэтиламина образуются

смеси диастереомерных амидов **69-72a-b** с высокими выходами. Состав и строение диастереомерных смесей установлены на основе данных ВЭЖХ и ^1H ЯМР спектроскопии. Были найдены оптимальные условия анализа диастереомерного состава образующихся амидов методом ВЭЖХ.



Определение абсолютной конфигурации фрагментов гетероциклических аминов в (*S,S*)-амидах **69a**, **70a** и **72a** проведено методом рентгеноструктурного анализа с учетом известной абсолютной конфигурации (*S*)-напроксена (см., например Рис. 5.1).

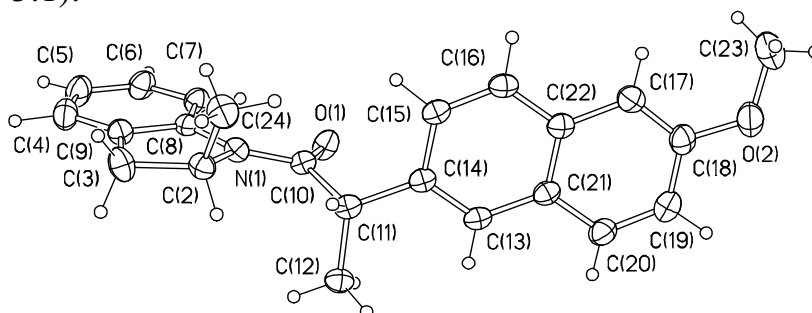


Рисунок 5.1. Строение молекулы (*S,S*)-амида **72a** (а).

Отнесение стереоконфигурации в (*S,S*)-амиде **71a** проведено путем сравнения удельного вращения (*S*)-изомера амина **67**, полученного в результате кислотного гидролиза амида **71a**, с литературными данными. Получение оптически чистого (*S*)-изомера амина **67** в результате гидролиза индивидуального (*S,S*)-амида **71a** свидетельствует об отсутствии рацемизации в процессе ацилирования хлорангидридом **14**.

Наиболее характерными сигналами в спектрах ^1H ЯМР, позволяющими судить о диастереомерном составе смеси амидов, являются сигналы метиновых протонов и протонов метильных групп у асимметрических атомов углерода. Обнаружено, что в спектрах ^1H ЯМР, зарегистрированных при комнатной температуре, сигналы CH₃ и CH групп напроксенового и аминного фрагментов заметно уширены, вероятно, вследствие динамических процессов, скорости которых соответствуют области «промежуточного обмена» в шкале времени ЯМР. При регистрации ^1H ЯМР спектров амидов **96-99** в растворе ДМСО-*d*₆ при 100 °C наблюдается сужение сигналов и удается получить хорошо разрешенные спектры, пригодные для количественного определения диастереомерного состава.

5.1.1.1. Влияние растворителей на процесс кинетического разделения гетероциклических аминов с помощью хлорангидрида (*S*)-напроксена

Методом ВЭЖХ изучено влияние растворителя на диастерео-

селективность процесса КР рацематов аминов **65-67** хлорангидридом **14**. Реакцию ацилирования проводили при мольном соотношении амин - хлорангидрид 2:1 в соответствующем растворителе при 20 °С в течение 24 ч. В этих условиях избыток гетероциклического амина можно рассматривать как катализатор, действующий как по общесловному, так и нуклеофильному механизму ацилирования.

Таблица 5.1. Влияние растворителя на диастереоселективность ацилирования гетероциклических аминов **65-67** хлорангидридом (*S*)-напроксена **14** при комнатной температуре

Растворитель	Диастереомерный избыток (<i>S,S</i>)-амида, <i>de</i> (%)*		
	69a	70a	71a
Бензол	87,0	80,4	78,6
Хлористый метилен	79,0	55,8	62,6
Тetraгидрофуран	79,0	76,0	-
Ацетонитрил	-	46,0	51,0
Диметилформамид	39,0	42,0	-

* По данным ВЭЖХ.

Как видно из приведенных в табл. 5.1 данных, во всех растворителях быстрее ацилируются *S*-энантиомеры аминов **65-67** и в продукте преобладает (*S,S*)-диастереомеры амидов **69-71a**. Наибольшая диастереоселективность наблюдалась при проведении реакции в бензоле. Уменьшение диастереоселективности происходит при переходе к более полярным растворителям – дихлорметану, тетрагидрофурану, ацетонитрилу и, особенно, к диметилформамиду.

5.1.1.2. Влияние оснований на процесс кинетического разделения гетероциклических аминов с помощью хлорангидрида (*S*)-напроксена

С целью изучения влияния вспомогательного третичного основания на процесс КР рацемических гетероциклических аминов **66** и **67** под действием хлорангидрида (*S*)-напроксена реакцию ацилирования проводили в присутствии различных по строению и нуклеофильности третичных аминов: триэтиламина (ТЕА), *N*-метилморфолина (NMM), *N*-диизопропил-*N*-этиламина (DPEA), пиридина (Py) и 4-(диметиламино)пиридина (DMAP) при мольном соотношении рацемический амин - хлорангидрид - основание 2:1:1 в различных растворителях при 20 °С в течение 24 ч.

При проведении реакций в бензоле наибольшую диастереоселективность ацилирования наблюдали в присутствии алифатических аминов - NMM в случае ацилирования амина **66** и ТЕА для амина **67**. Диастереоселективность уменьшалась при переходе к гетероциклическим аминам - пиридину и, особенно, DMAP (табл. 5.2).

В полярных растворителях (хлористом метиле и ацетонитриле) диастереоселективность ацилирования зависела как от структуры гетероциклического амина, так и от свойств среды (катализатора и растворителя).

Общее действие вспомогательных оснований, по-видимому, определяется их способностью образовывать ацил-аммониевые соли (ААС) с хлорангидридом **14**, что, в свою очередь, зависит как от полярности растворителя, так и от основности-нуклеофильности амина-катализатора. Так, в

неполярных апротонных растворителях (например, бензоле) роль третичных аминов (TEA, NMM, DPEA и пиридина) незначительна, они вступают в реакцию не на лимитирующей стадии, а в конце процесса, на стадии отрыва протона от промежуточного продукта. В случае DMAP в этих же условиях образуется крайне устойчивая ААС, взаимодействие которой с гетероциклическим амином является, по-видимому, лимитирующей стадией и происходит менее стереоселективно.

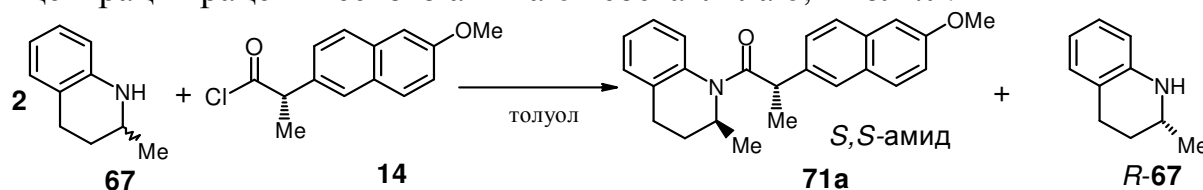
Таблица 5.2. Влияние основания на диастереоселективность ацилирования гетероциклических аминов **66** и **67** хлорангидридом (*S*)-напроксена **14** при комнатной температуре в различных растворителях

Растворитель	Основание	Соотношение амидов в смеси, (<i>R,S,S,S</i>) и диастереомерный избыток (<i>S,S</i>)-амида*			
		70b-70a	70a (de, %)	71b-71a	71a (de, %)
Бензол	–	9,8 – 90,2	80,4	10,7 – 89,3	78,6
	TEA	8,2 – 91,8	83,6	8,9 – 91,1	82,3
	NMM	7,1 – 92,9	85,8	9,6 – 90,4	80,8
	DPEA	9,9 – 90,1	80,2	12,1 – 87,9	75,8
	Py	12,3 – 87,7	75,4	12,0 – 88,0	76,0
	DMAP	40,0 – 60,0	20,0	42,5 – 57,5	15,0
Хлористый метилен	–	22,1 – 77,9	55,8	18,7 – 81,3	62,6
	TEA	13,1 – 86,9	73,8	19,7 – 80,3	60,6
	NMM	18,2 – 81,8	63,6	19,4 – 80,6	61,2
	Py	22,6 – 77,4	54,8	19,7 – 80,3	60,6
	DMAP	11,2 – 88,8	77,6	32,7 – 67,3	34,6
Ацетонитрил	–	27,0 – 73,0	46,0	24,5 – 75,5	51,0
	TEA	-	-	27,0 – 73,0	46,0
	NMM	24,9 – 75,1	50,2	26,4 – 73,6	47,2
	Py	25,0 – 75,0	50,0	33,2 – 66,8	33,6
	DMAP	14,9 – 85,1	70,2	25,4 – 74,6	49,2

* По данным ВЭЖХ.

5.1.1.3. Влияние температуры на процесс кинетического разделения 2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина с помощью хлорангидрида (*S*)-напроксена

На примере ацилирования рацемического 2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина (**67**) хлорангидридом (*S*)-напроксена изучено влияние температуры на диастереоселективность в процессе КР. Реакцию проводили при мольном соотношении амин - хлорангидрид 2:1 в толуоле при соответствующей температуре в отсутствие вспомогательного основания. Начальная концентрация рацемического амина **67** составляла 0,1 моль/л.



В толуоле, как и во всех других изученных растворителях с хлорангидридом (*S*)-напроксена быстрее реагирует (*S*)-энантиомер амина **67**, и в образующемся амиде преобладает (*S,S*)-диастереомер **71a**, а непрореагировавший амин

обогащен (*R*)-энантиомером.

Диастереомерный избыток (*de*, %) образующегося (*S,S*)-амида **71a** определяли методом ВЭЖХ на силикагеле (Lichrosorb Si-60). После соответствующей обработки и выделения, методом ВЭЖХ на хиральной фазе (Chiralcel-OD-H), определяли энантиомерный избыток (*ee*, %) непрореагировавшего амина (*R*)-**67**. Это позволило рассчитать значения конверсии (*C*, %):

$$C = \frac{ee_{(R)\text{-амин}}}{ee_{(R)\text{-амин}} + de_{(S,S)\text{-амид}}} \times 100\%, \text{ и фактора стереоселективности } (s):$$

$$s = \frac{k_S}{k_R} = \frac{\ln[(1 - C)(1 - ee_{(R)\text{-амин}})]}{\ln[(1 - C)(1 + ee_{(R)\text{-амин}})]}, \text{ характеризующих эффективность процесса КР}$$

(табл. 5.3).

Таблица 5.3. Влияние температуры на диастереоселективность ацилирования рацемического амина **67** хлорангидридом **14**

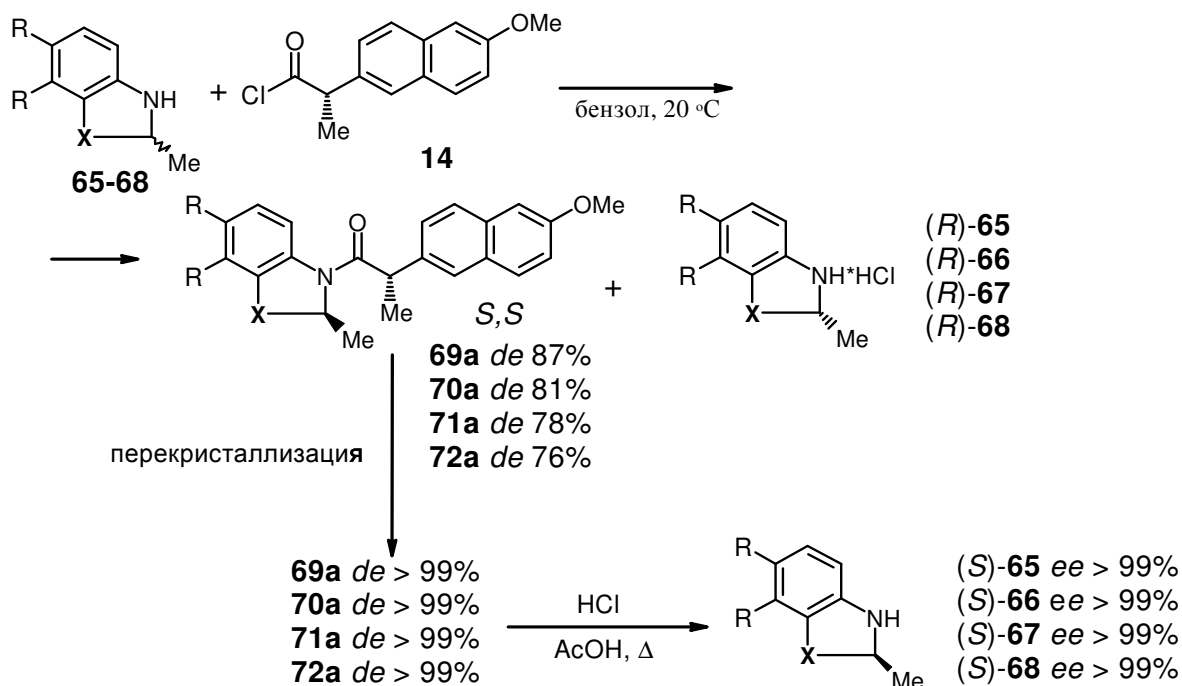
Условия ацилирования			Диастереоселективность		Конверсия, <i>C</i> , %	Фактор селективности, <i>s</i>
Растворитель	<i>T</i> , °C	Время реакции, ч	(<i>S,S</i>)- 71a , <i>de</i> , %	(<i>R</i>)- 67 , <i>ee</i> , %		
бензол	+20	24	85,6	79,9	48	31
толуол	+20	24	86,8	79,6	48	35
толуол	0	6	90,4	73,5	45	45
толуол	-20	24	91,4	70,9	44	47
толуол	-40	24	93,7	69,5	43	64

Как видно из приведенных в табл. 5.3 данных, диастереоселективность ацилирования рацемического амина **67** хлорангидридом **14** несколько повышается при проведении реакции в толуоле по сравнению с бензолом при +20 °C (фактор селективности *s* = 35 и 31, соответственно) при сохранении высокой степени превращения исходного рацемического амина (*C* 48%). При проведении ацилирования при низких температурах в толуоле диастереоселективность увеличивается значительно: *de*_{(*S,S*)-**71a**} до 93,7% при -40 °C (фактор селективности *s* = 64), однако при этом происходит уменьшение энантиомерного избытка непрореагировавшего амина [(*R*)-**94**, *ee* 69,5%] и снижение конверсии исходного амина (до 43%). Это, очевидно, связано со снижением скоростей реакции обоих энантиомеров рацемического амина.

5.1.1.4. Препаративное кинетическое разделение рацемических гетероциклических аминов под действием хлорангидрида (*S*)-напроксена

Нами показано, что наиболее удобными в препаративном отношении условиями процесса КР являются – проведение реакции ацилирования в бензоле (толуоле) в отсутствие третичного основания при мольном соотношении амин : хлорангидрид 2:1 при комнатной температуре. В этом случае гетероциклический амин, находящийся в избытке по отношению к хлорангидриду, может катализировать процесс ацилирования. В результате с высокими выходами были получены смеси диастереомеров **69-72a-b**, значительно обогащенные (*S,S*)-диастереомерами **69-72a**. Не вступившие в реакцию (*R*)-энантиомеры аминов **65-68** могут быть выделены после обработки реакционной массы с соответствующим энантиомерным избытком. Индивидуальные (*S,S*)-диастереомеры **69-72a** высокой диастереомерной

чистоты ($de > 99\%$) были получены в результате перекристаллизации из гексана (гексана-этилацетата) с высокими выходами (около 75%).



Синтез (*S*)-энантиомеров гетероциклических аминов **65-68** высокой оптической чистоты ($ee > 99\%$) и с высокими выходами (85-90%) проводили путем кислотного гидролиза (кипячение в смеси конц. HCl и лед. AcOH (1:1) в течение 10-15 ч) индивидуальных диастереомеров соответствующих (*S,S*)-амидов. Таким способом был впервые получен (*S*)-энантиомер 2-метил-индолина (**68**).

Для повышения эффективности разработанного метода нами предложен способ утилизации фракций, содержащих (*R*)-энантиомер амина **65**, заключающийся в рацемизации под действием серной кислоты в атмосфере аргона. Таким способом выход (*S*)-дифторбензоксазина **65** (ee около 99,5%), ключевого интермедиата в синтезе левофлоксацина, удалось довести до 60 %.

5.1.1.5. Теоретическое исследование взаимодействия (\pm)-2,3-дигидро-3-метил-4*H*-1,4-бензоксазина с хлорангидридом (*S*)-напроксена

С целью изучения стереоэлектронных взаимодействий энантиомеров хиральных гетероциклических аминов с оптически активным расщепляющим агентом проведено теоретическое исследование этих процессов с использованием комплекса квантово-химических методов*.

Поскольку взаимодействие обоих стереоизомеров амина **66** с третичным основанием и растворителем протекает по одной схеме, диастереоселективность ацилирования, зависящая как от вспомогательного основания, так и от растворителя, может определяться на стадии образования комплекса «реагент–субстрат» либо зависеть от различий в энергиях диастереомерных продуктов реакции.

Моделирование геометрии комплексов «реагент–субстрат» выполнено *ab initio* методами DFT B3LYP/6-31G* в рамках программы Gaussian-98. Квантовые расчеты показали, что ароматические системы амина **66** и

* Эта часть работы выполнена совместно с кафедрой органической и неорганической химии Челябинского государственного университета под руководством к.х.н. В.А. Потемкина.

хлорангидрида **14** находятся в параллельных плоскостях в комплексе, ведущем к (*S,S*)-амиду **70a**. Такое конформационное состояние не может реализоваться для молекулы (*R,S*)-диастереомера **70b** вследствие стерических затруднений, вызываемых метильной группой в 3-положении бензоксазинового фрагмента. По данным расчетов полная энергия диастереомеров **70a** и **70b** различается на 0,3 кДж/моль. Очевидно, что столь малое различие в энергиях не может объяснить преимущественное образование (*S,S*)-амида и зависимость диастереоселективности от используемого растворителя и катализатора.

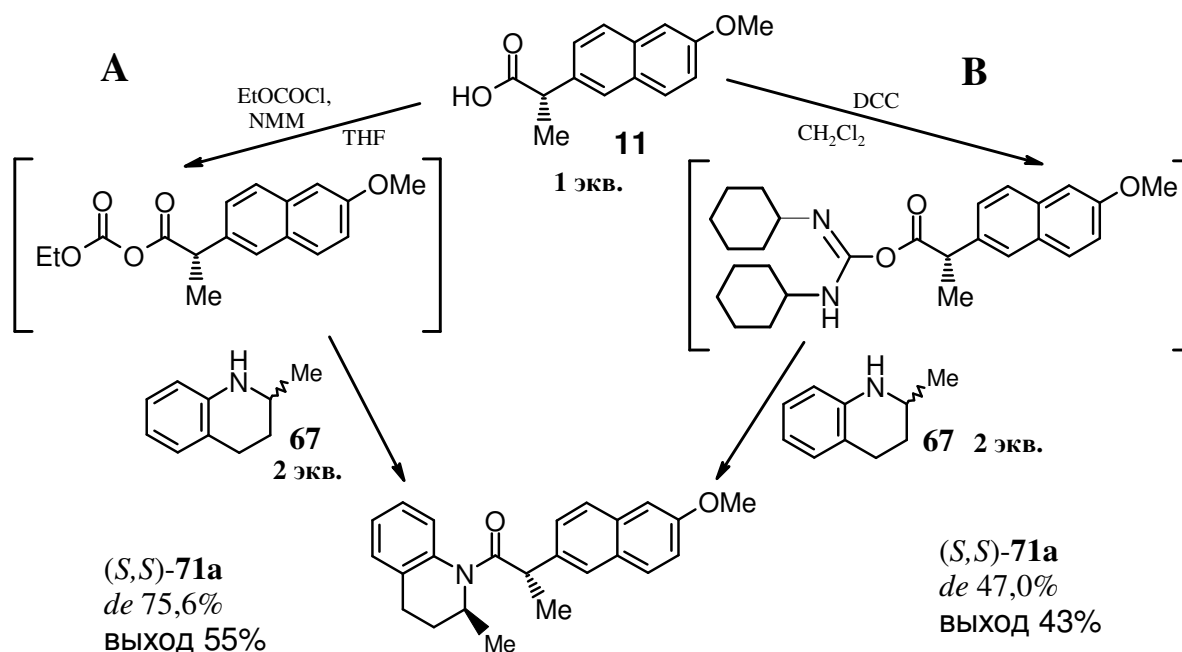
Моделирование геометрии комплексов «субстрат - реагент», выполненное в рамках генетического алгоритма Mesh для поиска ассоциатов в силовом поле ММ3 с вероятностным учетом влияния среды в рамках модели MERA, показало, что структуры комплексов хлорангидрида (*S*)-напроксена с (*R*)- и (*S*)-изомерами амина **66** не эквивалентны. Для геометрии комплекса (*S*)-стереоизомера с хлорангидридом **14** характерно близкое расположение атома водорода NH-группы бензоксазина и карбонильного кислорода хлорангидрида с образованием водородной связи, межъядерное расстояние между этими атомами составляет 2,35 Å. Кроме того, ароматические системы обеих молекул находятся в параллельных плоскостях, что способствует их π - π взаимодействию.

Очевидно, что комплекс (*R*)-изомера, образованный при π - π -электронном взаимодействии ароматических систем и $\text{Cl}\cdots\text{H}$ взаимодействии, менее стабилен, чем комплекс (*S*)-изомера, который включает $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ водородную связь. Действительно, *ab initio* DFT B3LYP/6-31G* расчеты показали, что суммарный заряд молекулы (*R*)-изомера в комплексе с хлорангидридом (*S*)-напроксена составляет -0,0052, в то время, как для молекулы (*S*)-изомера он существенно ниже (-0,0138). Полная энергия комплекса хлорангидрида (*S*)-напроксена с (*S*)-изомером на 6,1 кДж/моль меньше энергии комплекса с (*R*)-изомером. Эта разность демонстрирует большую вероятность реакции с (*S*)-формой субстрата и согласуется с данными о преимущественном выходе (*S,S*)-продукта **70a**.

5.1.2. Сравнительное изучение различных методов конденсации гетероциклических аминов и (*S*)-напроксена в условиях кинетического разделения

На примере взаимодействия (\pm)-2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина (**67**) с (*S*)-напроксом проведено сравнительное изучение результатов КР при использовании различных методов конденсации: хлорангидридного, смешанных ангидридов (**A**) и карбодиимидного (**B**). Мы полагали, что структура ацилирующего агента может повлиять на диастереоселективность процесса КР.

Методом ВЭЖХ определен диастереомерный состав образующихся амидов. Показано, что при конденсации амина **67** с (*S*)-напроксом всеми изученными методами происходит преимущественное образование (*S,S*)-амида **71a**. Наибольший выход и диастереоселективность процесса кинетического разделения наблюдается при конденсации амина **67** с (*S*)-напроксом хлорангидридным методом (*de* 78,6%; выход 82%). Высокая стереоселективность наблюдалась также при конденсации амина **67** со смешанным ангидридом (*S*)-напроксена, однако смесь диастереомеров **71a-b** была получена с более низким выходом (55 %).

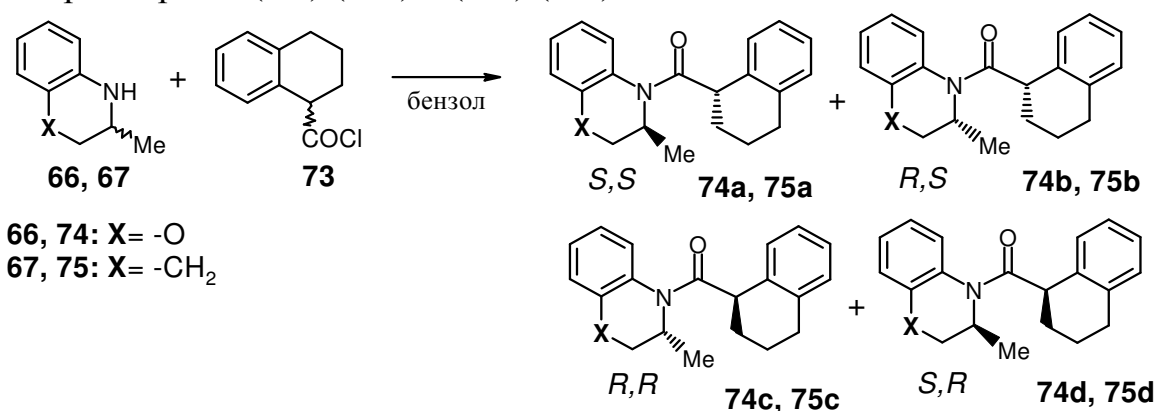


Таким образом, КР рацемического амина **67** с использованием других методов конденсации уступает хлорангидриду как по выходам, так и по стереоселективности.

5.1.3. Кинетическое разделение гетероциклических аминов под действием хлорангидрида (*S*)-1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтойной кислоты

Изучена возможность использования в качестве расщепляющего агента хлорангидрида (*S*)-1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтойной кислоты (**73**), конформационно жесткого аналога хлорангидрида **14**. Представляло интерес, каким образом дополнительные пространственные препятствия, обусловленные конформационной жесткостью молекулы соединения **73**, повлияют на стереоселективность процесса.

Ввиду малой доступности энантиомерно чистой (*S*)-1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтойной кислоты изучение диастереоселективности процесса кинетического разделения проведено с использованием хлорангидрида рацемической 1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтойной кислоты, дающего в реакциях с аминами две пары диастереомеров – (*S,S*)/(*R,R*) и (*S,R*)/(*R,S*).



В результате ацилирования аминов **66** (**67**) хлорангидридом **73** в стехиометрических количествах в присутствии пиридина образуются смеси диастереомеров **74a-b** (**74c-d**) и **75a-b** (**75c-d**), состав и строение которых были определены методами ВЭЖХ и ^1H ЯМР спектроскопии. Для отнесения

стереоконфигурации амидов 1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтойной кислоты был осуществлен встречный синтез (*S,S*)-амидов **74a** (**75a**) из индивидуальных (*S*)-энантиомеров аминов **66** (**67**) и хлорангидрида (*S*)-кислоты, что позволило идентифицировать диастереомеры методом ВЭЖХ.

При ацилировании рацемических аминов **66**, **67** хлорангидридом **73** в бензоле при мольном соотношении реагентов 2:1 в присутствии третичных оснований или без них получали смеси диастереомеров **74 a,c** - **74 b,d** (**75 a,c** – **75 b,d**) (табл. 5.4).

Таблица 5.4. Соотношения диастереомеров и выходы амидов 1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтойной кислоты

Основание	Гетероциклические амины			
	2,3-Дигидро-3-метил-4 <i>H</i> -1,4-бензоксазин (66)		2-Метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолин (67)	
	Соотношение амидов 74b(d)-74a(c) в смеси, <i>R,S</i> (<i>S,R</i>) - <i>S,S</i> (<i>R,R</i>)	Выход смеси 74a-d , %	Соотношение амидов 75b(d)-75a(c) в смеси, <i>R,S</i> (<i>S,R</i>) - <i>S,S</i> (<i>R,R</i>)	Выход смеси 75a-d , %
–	32 – 68	72	31 - 69	69
TEA	32 – 68	69	32 - 68	59
DPEA	31 - 69	69	35 - 65	62
DMAP	70 – 30	35	57 - 43	40

При проведении реакции в отсутствие вспомогательного основания или при использовании в качестве катализаторов алифатических аминов: TEA и DPEA, смесь диастереомеров была обогащена (*S,S*)/(*R,R*)-амидами (**74a,c**; **75a,c**), причем диастереоселективность ацилирования практически не зависела от использованного основания. Интересно отметить, что использование DMAP приводило к обращению диастереоселективности и получению смеси диастереомеров, обогащенной (*R,S*)/(*S,R*)-амидами (**74b,d**; **75b,d**). По-видимому, в случае использования алифатических аминов - TEA и DPEA с низкой нуклеофильностью реакция ацилирования протекает по общесловному механизму. А в случае использования DMAP, образующего устойчивую ААС, механизм ацилирования меняется.

Диастереоселективность в случае хлорангидрида **73** оказалась существенно ниже, чем при использовании хлорангидрида (*S*)-напроксена. По-видимому, дополнительная жесткость молекулы разделяющего агента уменьшает разницу в энергиях активации при образовании стереоизомерных амидов, что ведет к выравниванию скоростей реакции хлорангидрида **73** с *R*- и *S*-энантиомерами аминов.

Таким образом, хлорангидрид (*S*)-1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтойной кислоты (**73**) является менее удобным в препаративном отношении разделяющим агентом по сравнению с хлорангидридом (*S*)-напроксена.

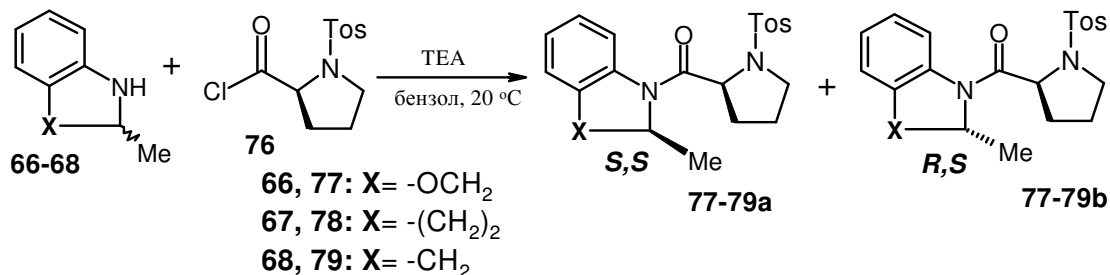
5.2. Кинетическое разделение гетероциклических рацемических аминов с помощью хлорангидридов *N*-защищенных аминокислот

Нами была изучена возможность использования хлорангидридов *N*-защищенных аминокислот: *N*-тозил-(*S*)-пролина, *N*-тозил-(*S*)-5-оксопролина, (2*S*,4*S*)-*N*-фенил-4-тозиламино-5-оксопролина и *N*-фталоил-(*S*)-аланина в качестве хиральных агентов для разделения рацемических гетероциклических

аминов **67-69**. Ранее в процессах КР указанные хлорангидриды не использовались.

5.2.1. Кинетическое разделение гетероциклических рацемических аминов под действием хлорангидрида N-тозил-(S)-пролина

Ацилирование аминов **67-69** хлорангидридом N-тозил-(S)-пролина (**76**) в стехиометрических количествах в бензоле в присутствии триэтиламина приводит к образованию смесей диастереомеров **77-79 a-b**, состав и строение которых были подтверждены данными ^1H ЯМР спектроскопии.



Для изучения процессов кинетического разделения гетероциклических аминов под действием хлорангидрида **76** были разработаны методы анализа диастереомерных смесей амидов **77-79 a-b** с помощью ВЭЖХ и ^1H ЯМР спектроскопии, проведено отнесение стереоконфигурации асимметрического центра во фрагменте амина. В результате экспериментального изучения выбраны наиболее удобные и эффективные условия проведения ВЭЖХ анализа диастереомерного состава образующихся амидов.

5.2.1.1. Влияние растворителей и вспомогательных оснований на процесс кинетического разделения гетероциклических аминов хлорангидридом N-тозил-(S)-пролина

Методом ВЭЖХ изучено влияние растворителя на диастереоселективность КР аминов **66** и **67** под действием хлорангидрида N-тозил-(S)-пролина. Реакцию проводили при мольном соотношении амин - хлорангидрид 2:1 в различных растворителях (бензоле, дихлорметане или ацетонитриле) при 20 °С в течение 24 ч в отсутствие основания.

Исследования показали, что во всех растворителях быстрее реагирует (*R*)-энантиомеры аминов, и в продуктах преобладают (*R,S*)-диастереомеры (табл. 5.5). Наибольшая диастереоселективность наблюдалась при проведении реакции в бензоле, при переходе к более полярным растворителям – дихлорметану и ацетонитрилу, происходило снижение диастереоселективности, что наиболее выражено в случае амидов **78a-b**. В отличие от КР под действием хлорангидрида (*S*)-напроксена в данном случае диастереоселективность процесса в большей степени зависела от структуры исходного рацемического амина.

При изучении влияния третичных оснований: TEA, NMM, DPEA, пиридина и DMAP, на процесс КР аминов **66** и **67** под действием хлорангидрида **76** (реакцию проводили при мольном соотношении гетероциклический амин - хлорангидрид – третичное основание 2:1:1 при 20 °С в течение 24 ч) показано, что диастереоселективность процесса КР зависит также и от третичного вспомогательного амина (табл. 5.5).

Диастереоселективность процесса КР амина **66** была существенно выше, чем при ацилировании амина **67**. Это свидетельствует о том, что механизм ацилирования хиральных гетероциклических аминов хлорангидридами

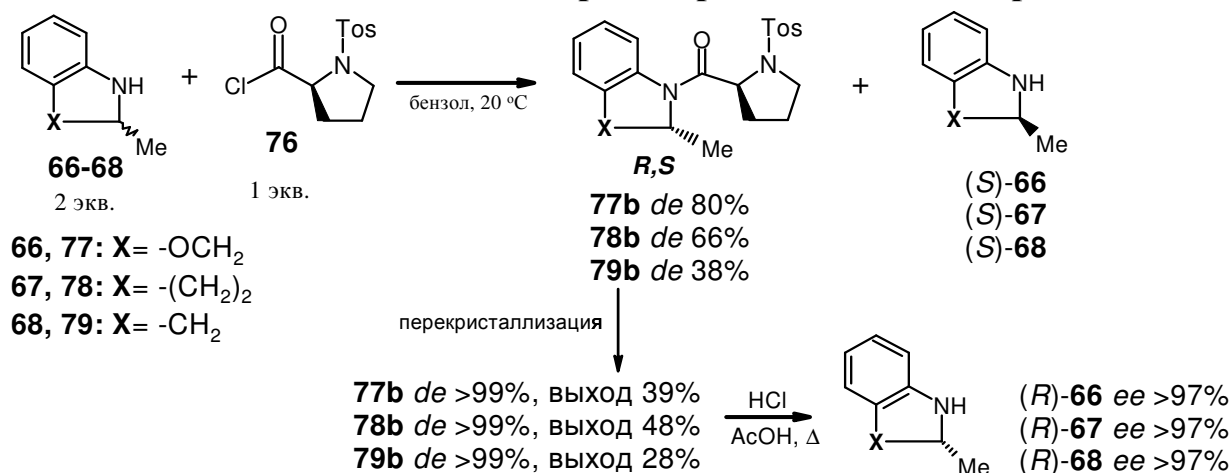
оптически активных кислот является достаточно сложным.

Таблица 5.5. Влияние растворителя и оснований на диастереоселективность ацилирования гетероциклических аминов **66** и **67** хлорангидридом N-тозил-(S)-пролина (**76**) при комнатной температуре

Растворитель	Основание	Гетероциклические амины			
		2,3-Дигидро-3-метил-4Н-1,4-бензоксазин (66)		2-Метил-1,2,3,4-тетрагидрохиолин (67)	
		Соотношение амидов 77a-77b , (<i>S,S-R,S</i>)	77 b , <i>de</i> , %	Соотношение амидов 78a-78b , (<i>S,S-R,S</i>)	78 b , <i>de</i> , %
Бензол	–	9,9 – 90,1	80,2	17,1 – 82,9	65,8
	TEA	8,7 – 91,3	82,6	10,0 – 90,0	80,0
	NMM	13,4 – 86,6	73,2	13,5 – 86,5	73,0
	Py	13,2 – 86,8	73,5	33,4 – 66,6	33,2
	DMAP	42,9 – 57,1	14,2	53,7 – 46,3	(<i>S,S</i>)- 78a 7,3
Хлористый метилен	–	21,8 – 78,2	56,4	46,1 – 53,9	7,8
	TEA	15,5 – 84,5	69,0	-	-
	NMM	19,0 – 81,0	62,0	36,2 – 63,8	27,6
	Py	25,6 – 74,4	48,8	49,3 – 50,7	1,4
	DMAP	44,2 – 55,8	11,6	53,1 – 46,9	(<i>S,S</i>)- 78a 6,2
Ацетонитрил	–	28,5 – 71,5	43,0	47,8 – 52,2	4,3
	TEA	27,3 – 72,7	45,4	-	-
	NMM	38,1 – 61,9	23,8	45,7 – 54,3	8,6
	Py	39,2 – 60,8	21,6	65,3 – 34,7	(<i>S,S</i>)- 78a 30,7
	DMAP	Большое количество побочных продуктов		51,4 – 48,6	(<i>S,S</i>)- 78a 2,8

В целом, результаты изучения различных факторов, влияющих на диастерео-селективность КР гетероциклических аминов хлорангидридом N-тозил-(S)-пролина, свидетельствуют, что наиболее удобными в препаративном отношении условиями процесса являются – проведение ацилирования в растворе бензола без третичного основания. В этом случае гетероциклический амин, находящийся в избытке по отношению к хлорангидриду, выступает катализатором ацилирования.

5.2.1.2. Препаративное кинетическое разделение гетероциклических аминов под действием хлорангидрида N-тозил-(S)-пролина



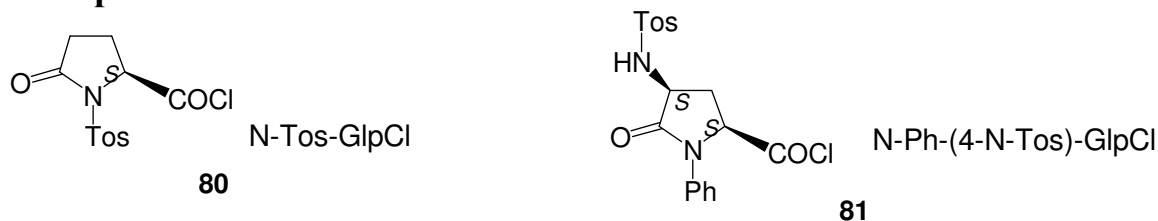
На основании найденных закономерностей был разработан метод получения энантиомеров гетероциклических аминов (*R*)-ряда. Ацилирование рацемических аминов **66-68** хлорангидридом **76** при мольном соотношении реагентов 2:1 в бензоле в отсутствие третичного амина приводило к преимущественному образованию (*R,S*)-амидов **77-79 b**.

Этим методом были получены смеси диастереомеров **77-79 a-b**, значительно обогащенные (*R,S*)-диастереомером **77b** (**78b**, **79b**), и непрореагировавший (*S*)-энантиомер аминов **66-68**, который может быть выделен после обработки реакционной массы с соответствующим энантиомерным избытком. Перекристаллизация амидов, обогащенных (*R,S*)-диастереомером, из смеси гексан-этилацетат давала индивидуальные (*R,S*)-диастереомеры **77-79b** высокой степени оптической чистоты (*de* >99 %) с выходами 28-48 %.

Синтез (*R*)-энантиомеров гетероциклических аминов **66-68**, обладающих высокой оптической чистотой, проводили путем гидролиза индивидуальных (*R,S*)-диастереомеров соответствующих амидов *N*-тозил-(*S*)-пролина. При проведении щелочного гидролиза амидов *N*-тозил-(*S*)-пролина целевые (*R*)-изомеры были получены с невысоким выходом. Кислотный гидролиз (*R,S*)-амидов **77b-79b** проводили в условиях, аналогичных гидролизу (*S,S*)-амидов напроксена, в отличие от которых кислотный гидролиз (*R,S*)-амидов **77b-79b** требует более длительного времени. Так, для достижения полного гидролиза амида **78b** требуется кипячение в течение 40 ч. Такое длительное кипячение диастереомерно чистых (*R,S*)-амидов **77b-79b** в кислых условиях приводит к некоторой рацемизации и частичной потере оптической чистоты (*R*)-изомеров аминов **66-68**. Оптическая чистота полученных (*R*)-изомеров аминов **66-68** была определена методом ВЭЖХ с предварительной дериватизацией хлорангидридом (*S*)-напроксена.

Несмотря на некоторую потерю оптической активности, гидролиз индивидуальных (*R,S*)-амидов *N*-тозил-(*S*)-пролина позволяет получать индивидуальные (*R*)-энантиомеры аминов с достаточно высокой степенью оптической чистоты.

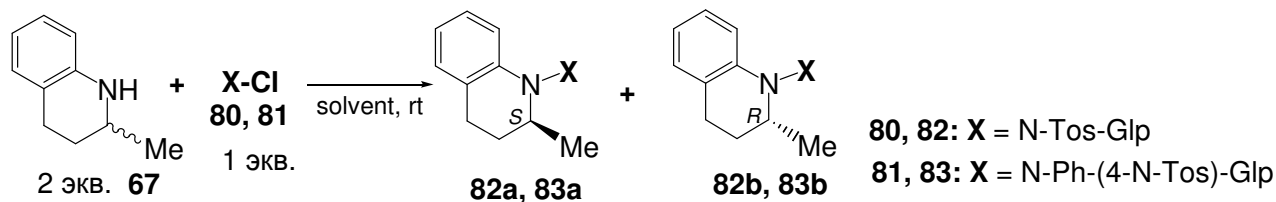
5.2.2. Кинетическое разделение рацемических гетероциклических аминов под действием хлорангидридов производных *N*-тозил-(*S*)-пролина



Изучена возможность использования хлорангидридов *N*-тозил-(*S*)-5-оксопролина (**80**) и (2*S*,4*S*)-*N*-фенил-4-тозиламино-5-оксопролина (**81**), структурных аналогов хлорангидрида **76**, в качестве расщепляющих хиральных агентов при КР рацемического 2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина (**67**). Хлорангидрид **81** получен из (*S*)-глутаминовой кислоты и, в отличие от хлорангидридов **76** и **80**, имеет второй хиральный центр. Мы полагали, что наличие оксогруппы в 5-ом положении пролинового цикла в случае хлорангидрида **80** может оказать существенное влияние на стереоселективность процесса, а пространственные затруднения, накладываемые дополнительными

объемными группами в *цис*-положении относительно СОСІ группы, в случае хлорангидрида **81** позволят повысить эффективность кинетического разделения.

Ацилирование рацемического амина **67** хлорангидридами **80** и **81** проводили при мольном соотношении реагентов 2:1 в соответствующем растворителе при 20 °С.

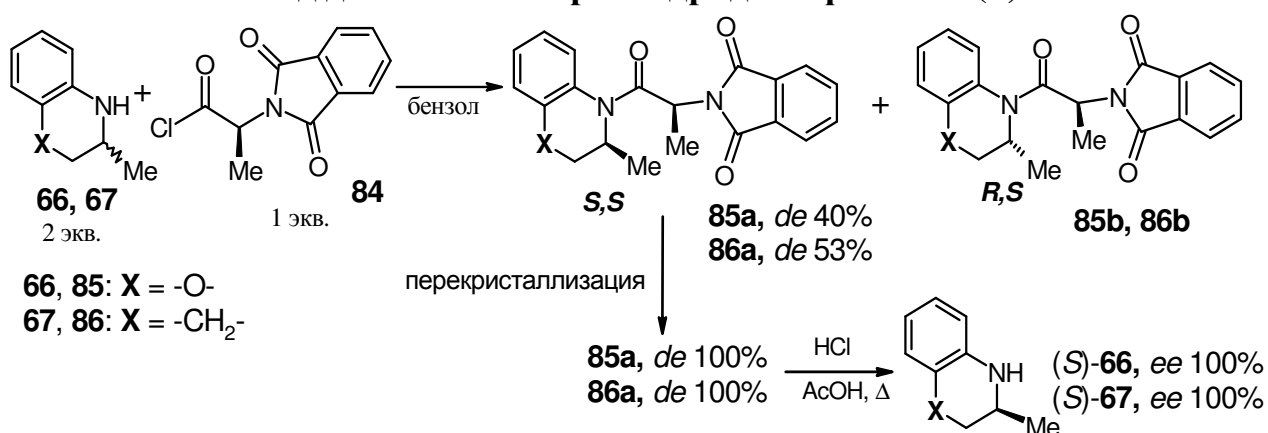


Диастереомерный состав образующихся амидов в реакционной смеси определяли методом ВЭЖХ и ¹Н ЯМР спектроскопии. Отнесение конфигурации в диастереомерных амидах **82-83a-b** сделано при сравнении с амидами, полученными из (*S*)-энантиомера амина **67**.

В результате ацилирования рацемата **67** хлорангидридами **80** и **81** в бензоле были получены смеси диастереомеров **82 a-b** и **83 a-b**, обогащенные (*R,S*)-диастереомерами **82b** и **83b**, и непрореагировавший (*S*)-энантиомер амина **67**. При ацилировании рацемического амина **67** хлорангидридами **80** и **81** диастерео-селективность процесса была существенно ниже (*de* 29% и 31%, соответственно), чем при использовании хлорангидрида **76**. Перекристаллизация смеси диастереомеров **82 a-b** не привела к получению индивидуальных изомеров.

Таким образом, КР рацемического амина под действием производных пролина существенно зависит как от структуры разделяющего агента, так и от условий реакции; а КР рацемического амина **67** под действием производных 5-оксопролина (хлорангидриды **80** и **81**) протекает менее селективно по сравнению с хлорангидридом *N*-тозил-(*S*)-пролина (**76**).

5.2.3. Кинетическое разделение рацемических гетероциклических аминов под действием хлорангидрида *N*-фталоил-(*S*)-аланина



Изучена возможность использования хлорангидрида *N*-фталоил-(*S*)-аланина (**84**) в качестве разделяющего агента для рацемических аминов **66** и **67**. Ацилирование проводили при соотношении реагентов 2:1 в бензоле при комнатной температуре. Образующаяся смесь диастереомерных амидов была обогащена (*S,S*)-диастереомером **85 a** (*de* 40%), **86 a** (*de* 53%). Следует подчеркнуть, что, несмотря на меньшую диастереоселективность по сравнению с кинетическим разделением с помощью хлорангидрида (*S*)-напроксена (*de*

около 80 %), даже однократная перекристаллизация амидов из смеси гексан-этилацетат позволила получить индивидуальные (*S,S*)-диастереомеры **85 а** и **86 а** очень высокой диастереомерной чистоты (*de* около 100 %). Отнесение (*S,S*)-конфигурации амидов **85 а** и **86 а** было проведено следующим образом: из индивидуальных (*S,S*)-амидов **85 а** и **86 а** в результате кислотного гидролиза были получены (*S*)-изомеры аминов **66** и **67**, затем была проведена их дериватизация хлорангидридом (*S*)-напроксена с последующим ВЭЖХ анализом полученных амидов.

Кислотный гидролиз (*S,S*)-амидов *N*-фталоил-(*S*)-аланина (**85а**, **86а**) в условиях, аналогичных гидролизу амидов (*S*)-напроксена, приводит к получению (*S*)-энантиомеров аминов **66** и **67** с выходом 95 %. Установлено, что кислотный гидролиз (*S,S*)-амидов *N*-фталоил-(*S*)-аланина также протекает без рацемизации и позволяет получать индивидуальные (*S*)-энантиомеры гетероциклических аминов высокой оптической чистоты и с высокими выходами.

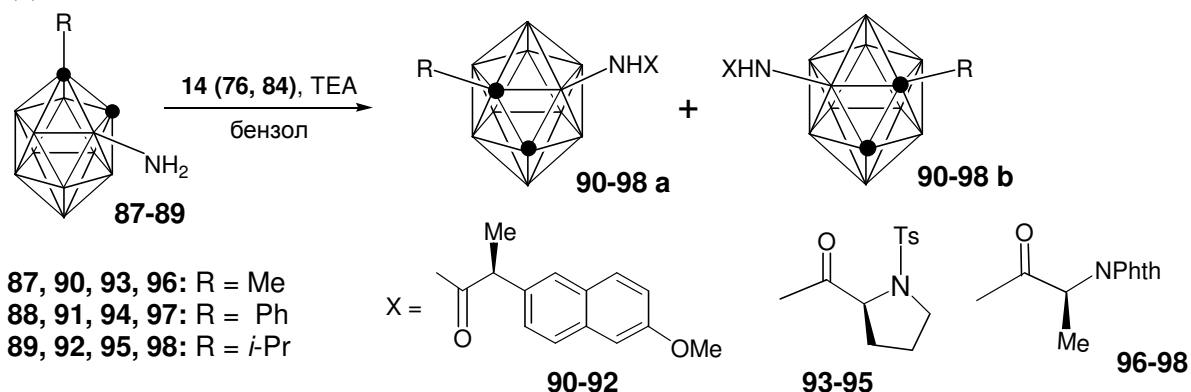
5.3. Кинетическое разделение 1-замещенных 1,2-дикарба-клозо-додекаборанов

Введение заместителя в 3-е положение молекулы 1-замещенных 1,2-дикарба-клозо-додекаборанов приводит к тому, что они становятся хиральными. Так, 3-амино-1-*R*-1,2-дикарба-клозо-додекабораны могут существовать в виде двух энантиомеров.

Разработанный нами метод кинетического разделения аминов под действием хиральных ацилирующих агентов был применен к синтезу энантиомеров 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-клозо-додекаборанов (**114-116**).

5.3.1. Оптическое разделение 1-замещенных 1,2-дикарба-клозо-додекаборанов через диастереомерные амиды

Ацилирование 3-аминокарборанов **87-89** хлорангидридами хиральных кислот **14**, **76**, **84** при стехиометрическом соотношении реагентов в бензоле в присутствии триэтиламина приводит к образованию смеси диастереомерных амидов **90-108a-b**.



В результате экспериментального изучения выбраны оптимальные условия анализа диастереомерного состава образующихся амидов методом ВЭЖХ. Диастереомеры амидов **90-108 а** и **б** можно различать в спектрах ¹H ЯМР по характерным сигналам как кислотного, так и аминокарборанового фрагмента.

Смеси диастереомерных амидов **90a-b**, **91a-b**, **93-97a-b** были разделены колоночной или флеш-хроматографией, в результате получены индивидуальные диастереомеры достаточно высокой стерео чистоты (*de* от 85 до

100%). Фракционная кристаллизация смеси амидов **98 a-b** дала индивидуальный диастереомер **98 b** (*de* 100%). Амиды **92 a-b** не удалось разделить ни колоночной хроматографией, ни фракционной кристаллизацией.

Отнесение конфигурации во фрагменте 3-аминокарборана в амидах **90a**, **93b**, **94a**, **94b**, **97b** и **98b** было сделано на основании данных РСА, исходя из известной конфигурации ацильного фрагмента (см., например, рис. 5.4).

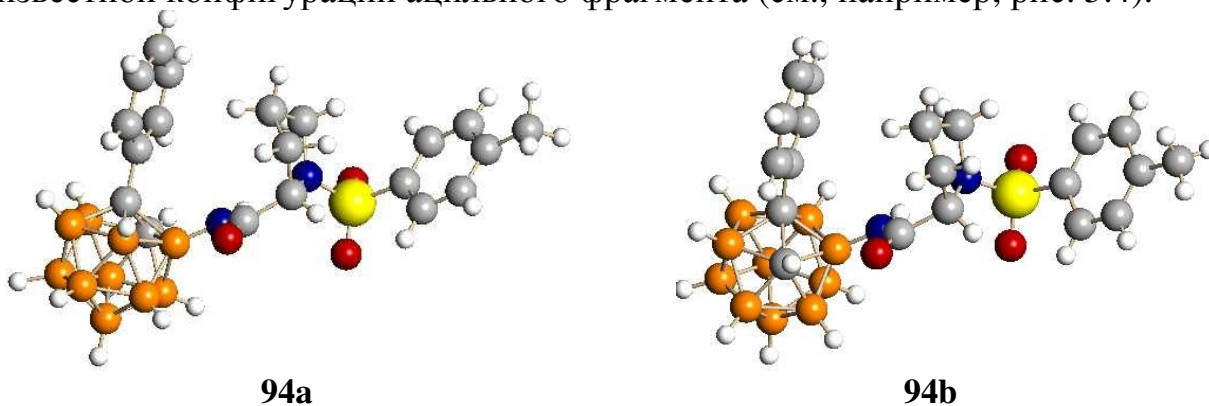
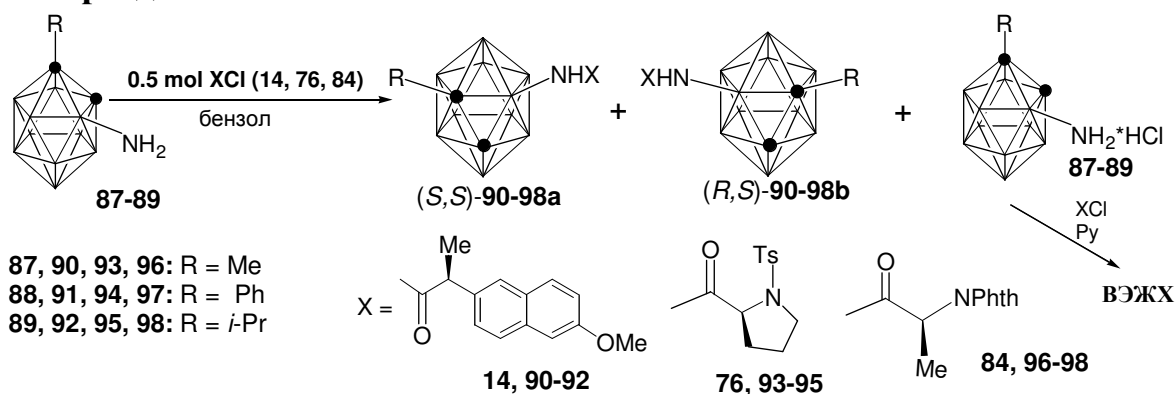


Рисунок 5.4. Структура соединений (*S,S*)-**94a** и (*R,S*)-**94b** по данным РСА.

5.3.2. Ацилирование 1-замещенных 1,2-дикарба-кклозо-додекаборанов хлорангидридами хиральных кислот в условиях кинетического разделения



Реакцию ацилирования проводили при соотношении реагентов 2:1 при комнатной температуре. Диастереоселективность процесса оценивали методом ВЭЖХ и ^1H ЯМР спектроскопии (табл. 5.6).

Таблица 5.6. Диастереоселективность ацилирования 3-аминокарборанов **87-89** хлорангидридами **14**, **76** и **84** в бензоле при комнатной температуре

3-Аминокарборан	Соотношение (<i>S,S</i>)- и (<i>R,S</i>)-диастереомеров в амидах 90-98 a-b		
	Хлорангидрид 14	Хлорангидрид 76	Хлорангидрид 84
87 (R = Me)	90a-90b 56:44	93a-93b 64:36	96a-96b 35:65
88 (R = Ph)	91a-91b 58:42	94a-94b 68:32	97a-97b 31:69
89 (R = <i>i</i> -Pr)	92a-92b 45:55	95a-95b 39:61	98a-98b 32:68

Наибольшую стереоселективность наблюдали при ацилировании 3-аминокарборанов **87-89** хлорангидридами N-защищенных аминокислот **76** и **84**. Ацилирование 1-метил- и 1-фенил-3-аминокарборанов **87** и **88** хлорангидридом N-тозил-(*S*)-пролина (**76**) приводило к образованию диастереомерных смесей, обогащенных (*S,S*)-амидом **93a** и **94a** (при этом непрореагировавший аминокарборан обогащен (*R*)-энантиомером). При использовании хлорангид-

рида N-фталоил-(*S*)-аланина (**84**) происходило преимущественное образование (*R,S*)-амидов **96b** и **97b** (непрореагировавший аминокарборан обогащен (*S*)-энантиомером). Ацилирование 1-изопропил-3-аминокарборана **89** всеми изученными хлорангидридами в условиях КР приводило к обогащению реакционной массы (*R,S*)-диастереомером **92b** (**95b**, **98b**).

В случае амида **92a-b**, для которого не удалось получить диастереомеры в оптически чистом виде, и диастереомеров амидов **91**, **95** и **96**, из которых не удалось вырастить монокристаллы для проведения РСА, отнесение конфигурации фрагментов 3-аминокарборанов в амидах было сделано на основании данных ВЭЖХ. Для этого, не прореагировавшие в процессе КР, изомеры 3-аминокарборанов **87-89** выделяли после обработки реакционной массы, затем ацилировали хлорангидридами N-тозил-(*S*)-пролина (**76**) или N-фталоил-(*S*)-аланина (**84**) при стехиометрическом соотношении реагентов в присутствии пиридина. Полученную смесь диастереомерных амидов анализировали методом ВЭЖХ на силикагеле. Нами также предложен метод определения энантиомерной чистоты 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-клозо-додекаборанов **87-89** методом ВЭЖХ на хиральных неподвижных фазах Chiralcel OD-H и Chiralpac AD, включающим предварительное фталоилирование 3-аминокарборанов.

С целью разработки аналитического метода определения энантиомерной чистоты получаемых 3-аминокарборанов **87** и **88** нами впервые систематически исследовано влияние хирального шифт-реагента (CSR) на химические сдвиги ^1H , ^{13}C рацемических 3-амино-1,2-дикарба-клозо-додекаборанов в спектрах ЯМР*. Показана эффективность применения (+)-Eu(hfc)₃ (европий (III) трис[3-(гептафторпропил-гидрокси-метил)-(+)-камфорат]), коммерчески доступного и широко используемого CSR, для определения энантиомерной чистоты и найдены оптимальные условия с точки зрения максимальной дифференциации сигналов и минимального уширения линии ЯМР.

5.3.3. Изучение влияния растворителей и вспомогательных оснований на процесс кинетического разделения 3-амино-1-метил-1,2-дикарба-клозо-додекаборана

Таблица 5.7. Влияние растворителя на диастереоселективность ацилирования 3-аминокарборана **87**

Хлорангидрид	Соотношение диастереомеров (<i>S,S</i> – <i>R,S</i>)		
	бензол	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ CN
(<i>S</i>)-напроксена 14	90a-90b 55,2-44,8	90a-90b 56,5-43,5	90a-90b 50,5-49,5
N-тозил-(<i>S</i>)-пролина 76	93a-93b 64,0-36,0	93a-93b 56,3-43,7	93a-93b 56,8-43,2
N-фталоил-(<i>S</i>)-аланина 84	96a-96b 33,8-66,2	96a-96b 33,4-66,6	96a-96b 46,7-53,3

Методом ВЭЖХ изучено влияние растворителя на диастереоселективность КР рацемического 3-амино-1-метил-1,2-дикарба-клозо-додекаборана (**87**) под действием хлорангидридов оптически активных кислот: (*S*)-напроксена (**14**), N-тозил-(*S*)-пролина (**76**) и N-фталоил-(*S*)-аланина (**84**). Реакцию проводили при мольном соотношении амин - хлорангидрид 2:1 в различных растворителях (бензоле, дихлорметане или ацетонитриле) при 20 °С в течение 24 ч.

* Исследование проведено совместно с с.н.с., к.х.н. Кодессом М.И.

В отличие от процесса КР гетероциклических аминов **65-68** с помощью хлорангидридов **14**, **76**, **84**, когда наибольшая диастереоселективность наблюдалась при проведении ацилирования в бензоле, а уменьшение селективности происходило при переходе к более полярным растворителям (дихлорметану и ацетонитрилу), в случае КР 3-аминокарборана **87** диастереоселективность ацилирования в большей степени зависела от структуры разделяющего агента, чем от природы растворителя (табл. 5.7).

С целью изучения влияния вспомогательного основания на диастереоселективность КР ацилирование амина **114** хлорангидридами **40**, **103**, **111** проводили в присутствии различных по строению и нуклеофильности третичных аминов при мольном соотношении реагентов, равном 2:1:1, в бензоле при 20 °С в течение 24 ч (табл. 5.8).

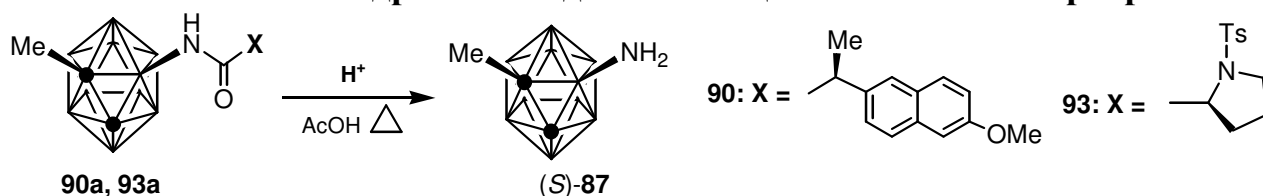
В целом, в присутствии третичного амина процесс КР 3-аминокарборана **87** существенно усложняется. Можно сделать вывод, что в этих процессах в той или иной мере принимают участие молекулы как вспомогательного основания, так и энантимеров амина **87**. Сильная зависимость диастереоселективности ацилирования от условий обусловлена, вероятно, возможностью реализации нескольких механизмов ацилирования (как при прямом замещении, так и при взаимодействии с ААС), каждый из которых отличается собственной стереоселективностью.

Таблица 5.8. Влияние вспомогательного основания на диастереоселективность ацилирования 3-аминокарборана **87** в бензоле

Хлорангидрид	Соотношение диастереомеров (<i>S,S</i> – <i>R,S</i>)				
	без основания	TEA	NMM	Py	DMAP
(<i>S</i>)-напроксена 14	55,2 – 44,8	58,6 – 41,4	60,0 – 40,0	39,7 – 60,3	36,3 – 63,7
<i>N</i> -тозил-(<i>S</i>)-пролина 76	64,0 – 36,0	58,4 – 41,6	39,2 – 60,8	37,8 – 62,2	39,3 – 60,7
<i>N</i> -фталоил-(<i>S</i>)-аланина 84	33,8 – 66,2	56,7 – 43,3	53,7 – 46,3	58,8 – 41,2	56,6 – 43,4

Проведенные исследования позволяют считать, что эффективность КР соединения **87** может быть несколько повышена по сравнению с таковой в ранее найденных условиях за счет использования NMM, Py или DMAP в случае ацилирования хлорангидридом (*S*)-напроксена **14** в бензоле. Оптимальные условия КР рацемического амина **87** хлорангидридами *N*-тозил-(*S*)-пролина **76** и *N*-фталоил-(*S*)-аланина **84** - проведение процесса в бензоле без вспомогательного третичного амина.

5.3.4. Кислотный гидролиз амидов 1-замещённых-3-аминокарборанов



С целью получения энантимеров 3-аминокарборанов проведен кислотный гидролиз их амидов в смеси ледяной уксусной и концентрированной соляной кислот при кипячении в течение 10-14 ч. Несмотря на то, что энантимеры 3-амино-1-метилкарборана **87**, полученные в результате кислотного гидролиза амидов **90a**, **90b** и **93a** с выходами от 63 до 77%, частично рацемизовались (табл. 5.9), это первый случай получения

энантиомеров планарно-хиральных 3-аминокарборанов. Оптическую чистоту карборана **87** определяли методами ВЭЖХ и ^1H ЯМР спектроскопии с предварительной дериватизацией хлорангидридом (*S*)-напроксена или *N*-тозил-(*S*)-пролина.

Таблица 5.9. Оптическая чистота энантиомеров 1-метил-3-аминокарборана **87**, полученных в результате кислотного гидролиза амидов

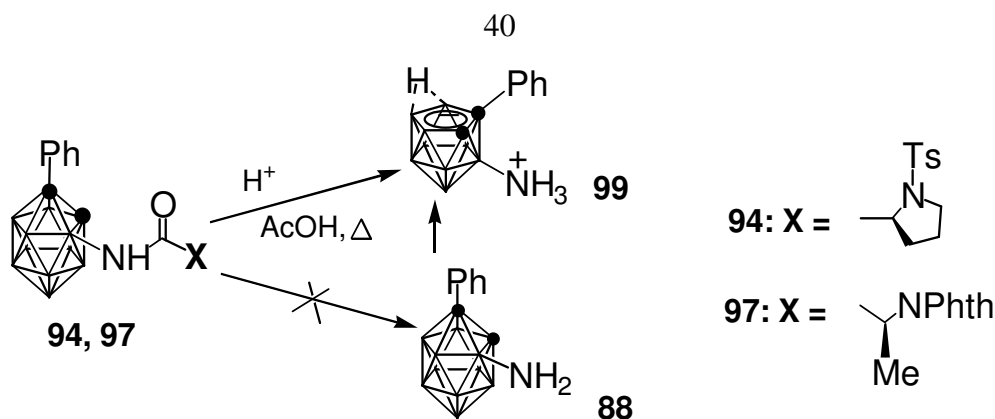
Исходный амид (<i>de</i> , %)	Амин	Оптическая чистота амина (<i>ee</i>), %
90a (98,0)	(<i>S</i>)- 87	83,0
90b (93,7)	(<i>R</i>)- 87	77,5
93a (92,0)	(<i>S</i>)- 87	46,0

Следует отметить, что степень рацемизации карборана **87**, образующегося в результате гидролиза амида *N*-тозил-(*S*)-пролина **93a**, была существенно выше, чем в случае гидролиза в тех же условиях обоих амидов (*S*)-напроксена **90a** и **90b**. В то же время, кислотный гидролиз индивидуальных диастереомеров такого же рода *N*-ацильных производных гетероциклических аминов проходил без рацемизации.

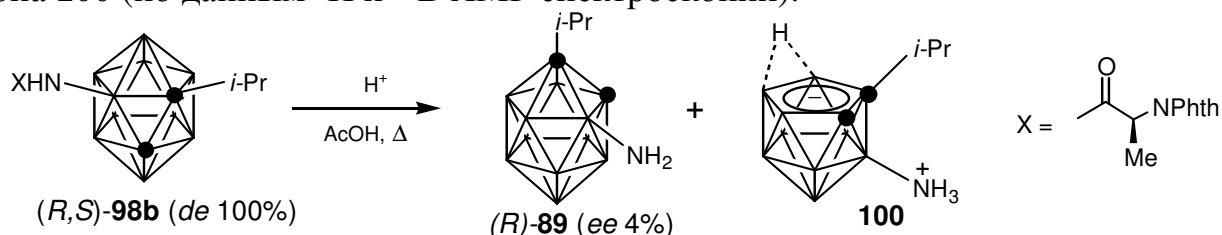
До наших исследований явление рацемизации в ряду 3-аминокарборанов не было описано в литературе. Поскольку механизмы рацемизации 3-аминокарборана **87** в кислой среде не являются очевидными, мы провели специальные исследования этого процесса. Было показано, что индивидуальные энантиомеры 3-амино-1-метилкарборана **87** при нагревании в смеси уксусной и соляной кислот не рацемизируются, и в процессе кислотного гидролиза оптическая чистота исходного амида не меняется. Поэтому можно предположить, что рацемизация целевого амина происходит одновременно с разрывом амидной связи. На данном этапе исследований можно сделать вывод, что на процесс рацемизации влияет, в первую очередь, природа ацильного заместителя у атома азота 3-аминокарборана (фрагмент напроксена или тозилпролина). Однако механизм рацемизации в таких планарно-хиральных структурах требует дальнейшего изучения.

В аналогичных условиях был проведен гидролиз амидов 3-амино-1-фенил-1,2-дикарба-клого-додекаборана. При кипячении амидов **94a-b**, **97a** в смеси кислот одновременно с разрывом амидной связи происходила деструкция карборанового ядра, заключающаяся в удалении атома бора из 6-го положения и образовании цвиттер-иона **99** (3-аммоний-7-фенил-7,8-дикарба-нидоундекабората) с выходом 74%. Строение соединения **99** установлено на основании данных ^1H и ^{11}B ЯМР спектроскопии, включая 2D ^{11}B - ^{11}B COSY, ^1H - ^{11}B COSY и ^1H - ^{11}B HMQC эксперименты. При проведении модельных экспериментов* методом ^1H и ^{11}B ЯМР спектроскопии было установлено, что при кипячении аминокорборана **88** в смеси CD_3COOD и DCI в течение 20-25 ч происходит деборирование с образованием соединения **99**. Для 3-амино-1-метилкарборана **87** деструкция такого рода не наблюдалась ни в случае кислотного гидролиза его амидов, ни при нагревании рацемического карборана, что позволяет говорить о специфическом влиянии фенильного заместителя в 1-ом положении карборанового ядра на процесс деборирования.

* Исследование проведено совместно с н.с. Ежиковой М.А.



При проведении кислотного гидролиза амидов 3-амино-1-изопропил-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборана (например, (*R,S*)-амида **98b** (*de* 100%)) в аналогичных условиях наблюдалась не только практически полная рацемизация целевого 3-аминокарборана **89**, но и деборирование с образованием цвиттер-иона **100** (по данным ^1H и ^{11}B ЯМР спектроскопии).



Если в случае амидов 3-амино-1-фенилкарборана кислотный гидролиз приводил к образованию цвиттер-иона **99** с выходом 74%, то в случае кислотного гидролиза амида **98b** образование цвиттер-иона **100** происходило с выходом от 7 до 30% в зависимости от продолжительности и температуры гидролиза

Следует отметить, что при нагревании рацемического 3-аминокарборана **89** в смеси уксусной и соляной кислот мы не наблюдали деструкции карборанового ядра. По-видимому, деборирование и рацемизация целевого 3-аминокарборана **89** во время гидролиза его амида происходит одновременно с разрывом амидной связи.

Таким образом, степень деструкции и рацемизации амидов 1-замещенных 3-аминокарборанов существенным образом зависит как от структуры ацильного фрагмента, так и от строения заместителя в 1-ом положении карборанового ядра.

Однако, несмотря на трудности, возникшие при выделении энантиомеров 1-замещенных 3-аминокарборанов из диастереомерных амидов хиральных кислот, нам впервые удалось получить индивидуальные энантиомеры 3-амино-1-метил-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборана.

В целом, разработанный нами подход позволяет получать энантиомеры аминов различных классов в результате КР рацематов под действием производных природных аминокислот и других хиральных кислот.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что присоединение N-(2-хлорэтил)- или N-метил-нитрозокарбамоильного фрагмента в N^{O} -положение природных диаминокарборановых кислот приводит к получению соединений, обладающих высокой противоопухолевой активностью и меньшей токсичностью по сравнению с известными препаратами класса алкилнитрозомочевин.
2. Разработан способ синтеза смеси изомеров положения нитрозогруппы -

N^{ϵ} -нитрозо- N^{ϵ} -[(2-хлорэтил)карбамоил]-L-лизина и N^{ϵ} -[(2-хлорэтил)-N-нитрозокарбамоил]-L-лизина, на основе которого составлены технологические регламенты получения субстанции противоопухолевого препарата ЛИЗОМУСТИН. Предложены методы контроля качества субстанции лизомустина, которые легли в основу Фармакопейной статьи на субстанцию препарата. На основании проведенных клинических испытаний лизомустин разрешен в качестве средства для лечения меланомы и рака легкого. Лекарственная форма лизомустина зарегистрирована и внесена в Государственный реестр лекарственных средств.

3. Показано, что модификация известных нестероидных противовоспалительных препаратов (напроксена, ибупрофена и индометацина) природными аминокислотами является эффективным способом снижения их токсичности с сохранением противовоспалительной и анальгетической активности. Наиболее перспективным соединением является амид индометацина и метилового эфира (*S*)-метионина, который показал сочетание высокой противовоспалительной и анальгетической активности при низкой острой токсичности и гастротоксичности.
4. Впервые получены псевдопептиды 2-(3-амино-1,2-дикарба-κлозо-додекаборан-2-ил)уксусной кислоты и природных аминокислот в качестве потенциальных агентов для бор-нейтронозахватной терапии опухолей; показана возможность выделения индивидуальных диастереомеров.
5. Впервые показано, что хлорангидриды оптически активных кислот являются эффективными разделяющими агентами для кинетического разделения рацематов гетероциклических аминов. Наибольшую эффективность в кинетическом разделении проявили хлорангидриды N-тозил-(*S*)-пролина и N-фталоил-(*S*)-аланина; и (*S*)-2-(6-метоксинафтил-2)-пропионовой кислоты.
6. Впервые исследованы факторы, влияющие на диастереоселективность кинетического разделения рацематов гетероциклических аминов, и показано, что она зависит как от структуры разделяющих агентов и исходных аминов, так и от условий ацилирования. Варьируя структуру разделяющего агента можно избирательно получать смеси, обогащенные (*R*)- или (*S*)-изомером исходного амина. Впервые синтезированы энантиомеры 2-метилиндолина.
7. Разработан эффективный способ получения (*S*)-2,3-дигидро-7,8-дифтор-3-метил-4*H*-1,4-бензоксазина - ключевого интермедиата в синтезе левофлоксацина, современного антибактериального препарата.
8. Впервые получены стереоизомеры производных 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-κлозо-додекаборанов. Разработаны методы анализа оптической чистоты их энантиомеров и диастереомеров с помощью 1H ЯМР спектроскопии и ВЭЖХ.
9. Впервые изучено кинетическое разделение рацемических 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-κлозо-додекаборанов при ацилировании хлорангидридами оптически активных кислот. Наибольшая стереоселективность наблюдается при использовании хлорангидридов N-защищенных аминокислот; а диастереоселективность процесса существенным образом зависит как от структуры разделяющего агента и 3-аминокарборана, так и от природы растворителя и вспомогательного третичного основания.

10. Впервые обнаружены явления рацемизации и деструкции карборанового ядра 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-клозо-додекаборанов в сильно-кислой среде.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

Статьи

1. Левит Г.Л., Радина Л.Б., Краснов В.П. N-Алкилнитрозокарбамоил производные аминокислот. Синтез, свойства и противоопухолевая активность (Обзор) // Хим.-фарм. Ж. - 1995. - Т. 29, № 8. - С. 5-18.
2. Левит Г.Л., Радина Л.Б., Краснов В.П., Гопко В.Ф., Перетолчина Н.М. N^ω-Алкилнитрозокарбамоил- α,ω -диаминокарбоновые кислоты. I. Синтез и противоопухолевая активность N^ω-метилнитрозокарбамоил- и N^ω-нитрозо-N^ω-циклогексилкарбамоил- α,ω -диаминокарбоновых кислот // Хим.-фарм. Ж. - 1996. - Т. 30, № 2. - С. 7-10.
3. Левит Г.Л., Радина Л.Б., Краснов В.П., Гопко В.Ф., Перетолчина Н.М. N^ω-Алкилнитрозокарбамоил- α,ω -диаминокарбоновые кислоты. II. Синтез и противоопухолевая активность нитрозопроизводных N^ω-(2-хлорэтил)карбамоил- α,ω -диаминокарбоновых кислот // Хим.-фарм. Ж. - 1996. - Т. 30, № 4. - С. 15-17.
4. Левит Г.Л., Радина Л.Б., Краснов В.П., Гопко В.Ф., Никифорова Н.В., Перетолчина Н.М. N^ω-Алкилнитрозокарбамоил- α,ω -диаминокарбоновые кислоты. III. Синтез и противоопухолевая активность N^ε-нитрозо-N^ε-[N^γ-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-лизина и N^ε-[N^γ-(2-хлорэтил)-N^γ-нитрозокарбамоил]-L-лизина // Хим.-фарм. Ж. - 1996. - Т. 30, № 5. - С. 23-25.
5. Левит Г.Л., Гришаков А.Н., Краснов В.П., Ключкова Т.И. N^ω-Алкилнитрозокарбамоил- α,ω -диаминокарбоновые кислоты. IV. Изучение гидролитической устойчивости изомеров положения нитрозогруппы N^ω-(2-хлорэтил)карбамоил- α,ω -диаминокарбоновых кислот // Хим.-фарм. Ж. - 1996. - Т. 30, № 11. - С. 19-20.
6. Левит Г.Л., Королева М.А., Краснов В.П. Синтез амидов 2-арилпропионовых кислот // Ж. Орган. Хим. - 1998. - Т. 34. - С. 378-382.
7. Charushin V.N., Krasnov V.P., Levit G.L., Korolyova M.A., Kodess M.I., Chupakhin O.N., Kim M.H., Lee H.S., Park Y.J., Kim K.-Ch. Kinetic resolution of (\pm)-2,3-dihydro-3-methyl-4H-1,4-benzoxazines with (S)-naproxen // Tetrahedron Asymmetry. - 1999. - V. 10 (14). - P. 2691-2702.
8. Гришаков А.Н., Ключкова Т.И., Левит Г.Л., Краснов В.П., Радина Л.Б., Чупахин О.Н. Количественное определение содержания изомеров в субстанции и лекарственной форме препарата лизомустин методом ВЭЖХ // Аналитика и контроль. - 2001. - Т. 5, №2. - С. 143-145.
9. Краснов В.П., Авдюкова Н.В., Радина Л.Б., Левит Г.Л., Ключкова Т.И., Чупахин О.Н. Спектрофотометрическое определение содержания основного вещества в субстанции противоопухолевого препарата лизомустин // Аналитика и контроль. - 2001. - Т. 5, №2. - С. 168-170.
10. Nizova I.A., Krasnov V.P., Levit G.L., Kodess M.I. Synthesis of (2S,4S)-4-phenylamino-5-oxoproline derivatives // Amino Acids. - 2002. - V. 22, № 2. - P.179-186.
11. Левит Г.Л., Аникина Л.В., Вихарев Ю.Б., Дёмин А.М., Сафин В.А., Матвеева Т.В., Краснов В.П. Синтез, противовоспалительная и анальгетическая активность амидов напроксена с производными аминокислот // Хим.-фарм. Ж. - 2002. - Т. 36, № 5. - С. 12-15.
12. Аникина Л.В., Левит Г.Л., Дёмин А.М., Вихарев Ю.Б., Сафин В.А., Матвеева Т.В.,

- Краснов В.П. Синтез, противовоспалительная и анальгетическая активность аминокислот, ацилированных ибупрофеном // Хим.-фарм. Ж. - 2002.- Т. 36, № 5. - С. 16-17.
13. Krasnov V.P., Levit G.L., Andreeva I.N., Grishakov A.I., Charushin V.N., Chupakhin O.N. Kinetic resolution of (\pm)-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline and (\pm)-2-methylindoline // *Mendeleev Commun.* – 2002. – V. 12 (1). – P. 27-28.
14. Krasnov V.P., Levit G.L., Charushin V.N., Grishakov A.N., Kodess M.I., Kalinin V.N., Ol'shevskaya V.A., Chupakhin O.N. Enantiomers of 3-amino-1-methyl-1,2-dicarba-*closo*-dodecaboranes // *Tetrahedron: Asymmetry.* - 2002. - V. 13 (16). - P. 1833-1835.
15. Krasnov V.P., Levit G.L., Bukrina I.M., Demin A.M., Chupakhin O.N., Ji Uk Yoo Efficient large (ca. 40 g) laboratory scale preparation of (*S*)- and (*R*)-valine *tert*-butyl esters // *Tetrahedron: Asymmetry.* - 2002. - V. 13 (17). - P. 1911-1914.
16. Krasnov V.P., Levit G.L., Bukrina I.M., Andreeva I.N., Sadretdinova L.Sh., Korolyova M.A., Kodess M.I., Charushin V.N., Chupakhin O.N. Kinetic resolution of (\pm)-2,3-dihydro-3-methyl-4*H*-1,4-benzoxazine, (\pm)-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline and (\pm)-2-methylindoline using *N*-tosyl-(*S*)-prolyl chloride // *Tetrahedron: Asymmetry.* - 2003. - V. 14 (14). - P. 1985-1988.
17. Krasnov V.P., Levit G.L., Kodess M.I., Charushin V.N., Chupakhin O.N. *N*-Phthaloyl-(*S*)-alanyl chloride as a chiral resolving agent for the kinetic resolution of heterocyclic amines // *Tetrahedron: Asymmetry.* - 2004. - V. 15 (5). - P. 859-862.
18. Potemkin V.A., Krasnov V.P., Levit G.L., Bartashevich E.V., Andreeva I.N., Kuzminsky M.B., Anikin N.A., Charushin V.N., Chupakhin O.N. Kinetic resolution of (\pm)-2,3-dihydro-3-methyl-4*H*-1,4-benzoxazine in the reaction with (*S*)-naproxen chloride: a theoretical study // *Mendeleev Commun.* – 2004. – V. 14 (2). – P.69-71.
19. Ключкова Т.И., Игнатъева Е.В., Ярцева И.В., Кикоть Б.С., Романенко В.И., Куненкова Н.Ф., Краснов В.П., Матвеева Т.В., Левит Г.Л., Чупахин О.Н. Определение посторонних примесей в препарата лизомустин // Хим.-фарм. Ж. - 2004. - Т. 38, № 5. - С. 45-47.
20. Краснов В.П., Левит Г.Л., Королёва М.А., Букина И.М., Садретдинова Л.Ш., Андреева И.Н., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. Кинетическое разделение гетероциклических аминов реакцией с хлорангидами оптически активных кислот. Влияние условий реакции на диастереоселективность ацилирования (\pm)-2,3-дигидро-3-метил-4*H*-1,4-бензоксазина // Изв. АН, сер. хим. – 2004. – № 6. – С. 1203-1206.
21. Краснов В.П., Жданова Е.А., Солиева Н.З., Садретдинова Л.Ш., Букина И.М., Дёмин А.М., Левит Г.Л., Ежикова М.А., Кодесс М.И. Изучение влияния природы боковой цепи эфиров α -аминокислот на диастереоселективность конденсации с 5(4*H*)-оксазолоном в синтезе дипептидов с *N*-концевым *N*-ацетилфенилаланином // Изв. АН, сер. хим. – 2004. – № 6. – С. 1278-1281.
22. Levit G.L., Krasnov V.P., Demin A.M., Kodess M.I., Sadretdinova L.Sh., Matveeva T.V., Ol'shevskaya V.A., Kalinin V.N., Chupakhin O.N., Charushin V.N. Kinetic resolution of 1-methyl- and 1-phenyl-3-amino-1,2-dicarba-*closo*-dodecaboranes *via* acylation with chiral acyl chlorides // *Mendeleev Commun.* – 2004. - V. 14 (6). – P. 293-295.
23. Levit G.L., Demin A.M., Kodess M.I., Ezhikova M.A., Sadretdinova L.Sh., Ol'shevskaya V.A., Kalinin V.N., Krasnov V.P., Charushin V.N. Acidic hydrolysis of *N*-acyl-1-substituted 3-amino-1,2-dicarba-*closo*-dodecaboranes // *J. Organometal. Chem.* –

2005. – V. 690 (11). – P. 2783-2786.

24. Kodess M.I., Ezhikova M.A., Levit G.L., Krasnov V.P., Charushin V.N. NMR determination of enantiomeric composition of 1-substituted 3-amino-1,2-dicarba-*closo*-dodecaboranes using $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ // J. Organometal. Chem. – 2005. – V. 690 (11). – P. 2766-2768.
25. Ol'shevskaya V.A., Ayuob R., Brechko Zh.G., Petrovskii P.V., Kononova E.G., Levit G.L., Krasnov V.P., Charushin V.N., Chupakhin O.N., Kalinin V.N. Synthesis of carborane analogues of γ -aminobutanoic acid // J. Organometal. Chem. – 2005. – V. 690 (11). – P. 2761-2765.
26. Levit G.L., Krasnov V.P., Gruzdev D.A., Demin A.M., Bazhov I.V., Sadretdinova L.Sh., Ol'shevskaya V.A., Kalinin V.N., Cheong Ch.S., Chupakhin O.N., Charushin V.N. Synthesis of N-[(3-amino-1,2-dicarba-*closo*-dodecaboran-1-yl)acetyl] derivatives of α -amino acids // Collection of Czechoslovak Chemical Communications. – 2007. – V. 72 (12). – P. 1697-1706.
27. 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.
28. Краснов В.П., Дёмин А.М., Левит Г.Л., Гришаков А.Н., Садретдинова Л.Ш., Ольшевская В.А., Глухов И.В., Калинин В.Н., Чарушин В.Н. Определение энантиомерной чистоты 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборанов методом ВЭЖХ на хиральных неподвижных фазах // Изв. АН, сер. хим. – 2008. – № 12. – С. 2484-2488.

Глава в монографии

29. Краснов В.П., Чупахин О.Н., Левит Г.Л., Радина Л.Б., Барышников А.Ю. Глава 5. Химические аспекты создания оригинального противоопухолевого препарата лизомустин // В кн. Экспериментальная онкология на рубеже веков. П/ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. – М., издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – 552 с. (с. 135-146)

Авторские свидетельства и патенты

30. Авторское свидетельство СССР № 1519177. N^{O} -Метил- N^{O} -нитрозопроизводные L-цитруллина и L-гомоцитруллина, проявляющие противоопухолевую активность / Радина Л.Б., Гопко В.Ф., Левит Г.Л., Софьина З.П., Перетолчина Н.М., Горелова Л.А., Аношина Г.М. – заявл. 23.04.84.
31. Авторское свидетельство СССР № 1785342. Способ определения содержания изомеров 9-(2-хлорэтил)-7-нитрозо-L-гомоцитруллина и 9-(2-хлорэтил)-9-нитрозо-L-гомоцитруллина в нитруллине / Радина Л.Б., Левит Г.Л. – заявл. 03.10.89.
32. Патент РФ № 1834006. МПК7 А 61 К 9/08, 31/17. Противоопухолевое средство / Перетолчина Н.М., Радина Л.Б., Горбачева Л.Б., Шишкина М.Я., Мкртчян Т.В., Соколова И.А., Краснова М.А., Софьина З.П., Белоусова А.К., Некрасова Е.Б., Сыркин А.Б., Шулепова Т.С., Сингин А.С., Беляев А.А., Краснов В.П., Левит Г.Л., Тарасов А.И., Ключанская Н.В., Переводчикова Н.И., Петухова И.Н., Зимакова Н.И. - № 4497231/14; заявл. 24.10.88; опубл. 27.10.96, Бюл. № 30. – 14 с.
33. Патент РФ № 1744946. МПК7 С 07 С 275/68, 273/18. Способ получения смеси изомеров 9-(2-хлорэтил)-7-нитрозо-L-гомоцитруллина и 9-(2-хлорэтил)-9-нитрозо-L-гомоцитруллина / Радина Л.Б., Беляев А.А., Краснов В.П., Левит Г.Л., Тарасов А.И. - № 4744599/04; заявл. 03.10.89; опубл. 10.11.98. – 8 с.
34. Патент Японии JP 2000 178,265. МПК7 С 07 D 265/36. Preparation of (S)-

benzoxazines and racemization of (*R*)-benzoxazines / Chupakhin O.N., Krasnov V.P., Levit G.L., Charushin V.N., Korolyova M.A., Tzoi E.V., Lee H.S., Park Y.J., Kim M.N., Kim K.-Ch. - № JP19980357910; заявл. 16.12.1998; опубл. 27.06.2000.

35. Патент Южной Кореи KR 2000 047396. МПК7 C 07 D 265/14. Method for preparing (*S*)-benzoxazine derivative and a racemization method of (*R*)-benzoxazine derivative / Chupakhin O.N., Krasnov V.P., Levit G.L., Charushin V.N., Korolyova M.A., Tzoi E.V., Lee H.S., Park Y.J., Kim M.N., Kim K.-Ch. - № KR19990016338; заявл. 07.05.1999; опубл. 25.07.2000.

Тезисы докладов

36. Краснов В.П., Левит Г.Л., Радина Л.Б., Гопко В.Ф., Перетолчина Н.М. Синтез и противоопухолевая активность *N*-(2-хлорэтил)нитрозомочевин на основе α,ω -диаминокислот // Тезисы докладов II Российского национального конгресса "Человек и лекарство". – Москва, 1995. - С.16.
37. Краснов В.П., Левит Г.Л., Гришаков А.Н., Клочкова Т.И. Изучение гидролитической устойчивости *N*-(2-хлорэтил)нитрозомочевин на основе α,ω -диаминокислот // Тезисы докладов III Российского национального конгресса "Человек и лекарство". – Москва, 1996.- С.29.
38. Levit G.L., Korolyova M.A., Krasnov V.P. Synthesis of amides of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with potentially low gastrototoxicity // Int. Memorial I. Postovsky Conference on Organic Chemistry. – Ekaterinburg, 1998. - P. 91.
39. Краснов В.П., Левит Г.Л., Чупахин О.Н. Синтез противоопухолевых соединений - нитрозоалкилмочевинных производных аминокислот // Тезисы докладов V Российского национального конгресса "Человек и лекарство". – Москва, 1998. - С. 579.
40. Левит Г.Л., Краснов В.П., Сафин В.А., Марданова Л.Г., Махмудов Р.Р. Синтез амидов нестероидных противоопухолевых препаратов с потенциально низкой ульцеротоксичностью // Тезисы докладов V Российского национального конгресса "Человек и лекарство". – Москва, 1998. - С. 579.
41. Krasnov V.P., Klochkova T.I., Levit G.L., Grishakov A.N. Aqueous decomposition of *N*-(2-chloroethyl)nitrosocarbomoyl diamino acids // Proceedings of 8th International Conference on Technology. - Paris, 1998. - P.1247.
42. Krasnov V.P., Levit G.L., Andreyeva I. N., Sadretdinova L.Sh., Charushin V. N., Chupakhin O. N. Kinetic resolution of (\pm)-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline with (*S*)-naproxen // Proceeding of the First Eurasian Meeting on Heterocyclic Chemistry. – Suzdal, 2000. - P. 39.
43. Марков В.М., Белик А.В., Потемкин В.А., Краснов В.П., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. Влияние диссимметрии сольватного окружения на диастереоселективность реакции // Тезисы докладов 1-й Всероссийской конференции по химии гетероциклов. – Суздаль, 2000. - С. 66.
44. Краснов В.П., Левит Г.Л., Садретдинова Л.Ш., Букрина И.М., Андреева И.Н., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. Влияние оснований на диастереоселективность ацилирования 1,4-бензоксазинов // Тезисы докладов научной конференции "Современные проблемы органической химии". – Новосибирск, 2001. - С. 127.
45. Левит Г.Л., Краснов В.П., Садретдинова Л.Ш., Букрина И.М., Андреева И.Н., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. Влияние растворителя на диастереоселективность ацилирования рацемических гетероциклических аминов // Тезисы докладов научной конференции "Современные проблемы органической химии". –

Новосибирск, 2001. - С. 128.

46. Кодесс М.И., Левит Г.Л., Краснов В.П. Определение оптической чистоты и абсолютной конфигурации хиральных гетероциклических аминов методом ЯМР спектроскопии // Тезисы докладов XV Уральской конференции по спектроскопии. – Заречный, 2001. - С. 200.
47. Klochkova T., Grishakov A., Levit G., Krasnov V., Romanenko V., Kunenkova N. High pressure liquid chromatography in Lysomustine pharmaceutical analysis and manufacture // Abstract Book “3-rd International Symposium on Pharmaceutical Chemistry”. – Paris, 2001. – P.199-200.
48. Краснов В.П., Левит Г.Л., Радина Л.Б., Перетолчина Н.М., Чупахин О.Н. Синтез и противоопухолевая активность структурных аналогов лизомустина // Российский Биотерапевт. Ж. – 2002. – Т.1, № 2. – С.128. (Материалы Всероссийской научно-практической конференции “Отечественные противоопухолевые препараты”)
49. Kodess M.I., Ezhikova M.A., Levit G.L., Krasnov V.P., Olshevskaya V.A., Kalinin V.N., Charushin V.N., Chupakhin O.N. Complete ^{11}B spectral assignment of chiral 1,2-dicarbo-*closo*-dodecaborane // IX International Conference on Boron Chemistry IMEBORON-2002. Programme and Abstracts. – Moscow, 2002. - P.113.
50. Krasnov V.P., Levit G.L., Charushin V.N., Grishakov A.N., Ol'shevskaya V.A., Kalinin V.N., Chupakhin O.N. Enantiomers of 3-amino-1-methyl-1,2-dicarbo-*closo*-dodecaborane // IX International Conference on Boron Chemistry IMEBORON-2002. Programme and Abstracts. – Moscow, 2002. - P.119.
51. Potemkin V.A., Bartashevich E.V., Krasnov V.P., Levit G.L., Andreeva I.N., Charushin V.N., Chupakhin O.N. (\pm)-2,3-Dihydro-3-methyl-4H-1,4-benzoxazine interactions with (*S*)-naproxen and N-tosyl-(*S*)-prolyl chlorides. Theoretical investigations // Proceedings of the 2nd Eurasian Meeting on Heterocyclic Chemistry. - Novgorod the Great, Russia, 2002. - P.40.
52. Charushin V.N., Krasnov V.P., Levit G.L., Andreeva I.N., Bukrina I.M., Sadretdinova L.Sh., Chupakhin O.N. Kinetic resolution of heterocyclic amines using N-tosyl-(*S*)-prolyl chloride // Proceedings of the XXth European Colloquium on Heterocyclic Chemistry. - Stockholm, Sweden, 2002. - P.32.
53. Chupakhin O.N., Krasnov V.P., Demin A.M., Levit G.L., Kodess M.I. ^1H NMR Evidence for 5(4*H*)-oxazolone formation and racemization // Proceedings of the XXth European Colloquium on Heterocyclic Chemistry. - Stockholm, Sweden, 2002. - P.112.
54. Chupakhin O.N., Krasnov V.P., Solieva N.Z., Zhdanova E.A., Bukrina I.M., Sadretdinova L.Sh., Levit G.L., Kodess M.I. Dynamic kinetic resolution via 5(4*H*)-oxazolone formation // Proceedings of the XXth European Colloquium on Heterocyclic Chemistry. -Stockholm, Sweden, 2002. - P.113.
55. Дёмин А.М., Матвеева Т.В., Левит Г.Л., Краснов В.П., Сафин В.А., Аникина Л.В., Вихарев Ю.Б. Новые амиды (*S*)-напроксена. Синтез и биологическая активность // Тезисы докладов IV Всероссийского научного семинара и Молодёжной научной школы «Химия и медицина». – Уфа, 2003. – С. 46.
56. Краснов В.П., Левит Г.Л., Кодесс М.И., Ежикова М.А., Орлова О.Л., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю., Чупахин О.Н. Изучение гидролитической устойчивости субстанции препарат лизомустин методом ПМР спектроскопии // Российский Биотерапевт. Ж. – 2004. – Т.3, № 2. – С.23. (Материалы Всероссийской научно-практической конференции “Отечественные противоопухолевые препараты”).
57. Kodess M.I., Ezhikova M.A., Levit G.L., Krasnov V.P., Charushin V.N. Use of

- lanthanide shift reagent in the elucidation of NMR signals from enantiomeric mixtures of 1-substituted 3-amino-1,2-dicarba-*closo*-dodecaboranes // The 3rd European Meeting on Boron Chemistry EUROBORON 3. Programme and Abstracts. - Pruhonice-by-Prague, Czech Republic, 2004. - P33.
58. Krasnov V.P., Levit G.L., Demin A.M., Kodess M.I., Ol'shevskaya V.A., Kalinin V.N., Charushin V.N., Chupakhin O.N. Kinetic resolution of 1-substituted 3-amino-1,2-dicarba-*closo*-dodecaboranes // The 3rd European Meeting on Boron Chemistry EUROBORON 3. Programme and Abstracts. - Pruhonice-by-Prague, Czech Republic, 2004. - P38.
59. Levit G.L., Demin A.M., Kodess M.I., Ezhikova M.A., Sadretdinova L.Sh., Ol'shevskaya V.A., Kalinin V.N., Krasnov V.P., Charushin V.N. Hydrolysis of 1-methyl- and 1-phenyl-3-amino-1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane amides // The 3rd European Meeting on Boron Chemistry EUROBORON 3. Programme and Abstracts. - Pruhonice-by-Prague, Czech Republic, 2004. - P39.
60. Krasnov V.P., Levit G.L., Korolyova M.A., Charushin V.N., Chupakhin O.N. Acylative kinetic resolution of chiral heterocyclic amines. A new approach // 7th SAC Seminar "Scientific Advances in Chemistry: Heterocycles, Catalysis and Polymers as Driving Forces". - Ekaterinburg, 2004. – С. 139.
61. Levit G.L., Krasnov V.P., Demin A.M., Charushin V.N., Chupakhin O.N. Kinetic resolution of racemic 3-aminocarboranes by using chiral heterocyclic compounds // 7th SAC Seminar "Scientific Advances in Chemistry: Heterocycles, Catalysis and Polymers as Driving Forces". - Ekaterinburg, 2004. – С. 140.
62. Krasnov V.P., Levit G.L., Demin A.M., Anikina L.V., Tolstikov A.G., Charushin V.N., Chupakhin O.N. Synthesis and anti-inflammatory activity of indomethacin amides with amino acid derivatives // 7th SAC Seminar "Scientific Advances in Chemistry: Heterocycles, Catalysis and Polymers as Driving Forces". - Ekaterinburg, 2004. – С. 146.
63. Краснов В.П., Левит Г.Л. Кинетическое разделение рацемических аминов и спиртов в результате реакции ацилирования // Всероссийская конференция «Техническая химия. Достижения и перспективы» Доклады. – Пермь. -2006. – Т. 1. - С. 8-15.
64. Левит Г.Л., Краснов В.П., Чупахин О.Н., Орлова О.Л., Барышников А.Ю. Оригинальный противоопухолевый препарат лизомустин. Результаты и перспективы // Всероссийская конференция «Техническая химия. Достижения и перспективы». Доклады. – Пермь. -2006. – Т. 1. - С. 133-137.
65. Левит Г.Л., Демин А.М., Ежикова М.А., Матвеева Т.В., Садретдинова Л.Ш., Кодесс М.И., Краснов В.П. Рацемизация 3-амино-1-метил-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборана в процессе кислотного гидролиза его амидов // International Symposium on Advanced Science in Organic Chemistry. Abstracts. – Sudak, Crimea. – 2006. – С-094.
66. Краснов В.П., Левит Г.Л., Жданова Е.А., Солиева Н.З., Садретдинова Л.Ш., Чупахин О.Н. Кинетическое разделение рацемических производных пиперидина // Труды Третьей Международной конференции “Химия и биологическая активность азотсодержащих гетероциклов”. – Черногоровка. - 2006. –Т.2. - С. 155-157.
67. Levit G.L., Krasnov V.P., Gruzdev D.A., Demin A.M., Bazhov I.V., Ol'shevskaya V.A., Kalinin V.N., Cheong Ch.S., Chupakhin O.N., Charushin V.N. Synthesis of amides and N-acyl derivatives of 3-amino-1-carboxymethyl-1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane // EUROBORON4. Abstracts. – Bremen, 2-6 September. – 2007. - P. 137.

68. 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 15th European Symposium on Organic Chemistry. Abstracts. – Dublin, Ireland. – 2007. – P. 231.
69. Жданова Е.А., Левит Г.Л., Гришаков А.Н., Краснов В.П. Метод определения стереоизомерной чистоты компонентов лизомустина // Российский биотерапевтический журнал (Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты»). – 2008. – С. 41.
70. Тумашов А.А., Левит Г.Л., Краснов В.П. Изучение кинетики разложения субстанции лизомустина в растворах // Всероссийский симпозиум «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия». Тезисы. – Москва-Клязьма, 2008. – С. 115.
71. Жданова Е.А., Солиева Н.З., Левит Г.Л., Гришаков А.Н., Тумашов А.А., Краснов В.П. Метод определения стереоизомерной чистоты лизина // Всероссийский симпозиум «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия». Тезисы. – Москва-Клязьма, 2008. – С. 116.