

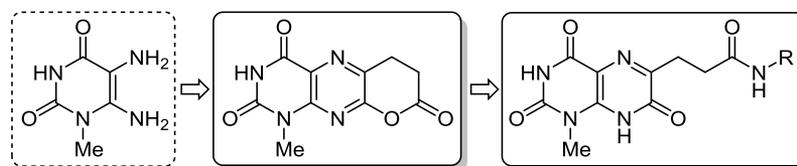
Амиды замещенных 3-(птеридин-6-ил)пропановых кислот: синтез, спектральные характеристики и цитотоксическая активность

Максим С. Казунин¹, Алексей Ю. Воскобойник¹, Оксана М. Шаталова², Людмила Н. Малюштан², Сергей И. Коваленко^{1*}

¹ Запорожский государственный медицинский университет, пр. Маяковского, 26, Запорожье 69035, Украина; e-mail: kovalenkosergiy@gmail.com

² Проблемная лаборатория морфофункциональных исследований, Национальный фармацевтический университет, ул. Куликовская, 12, Харьков 61000, Украина; e-mail: physio@nuph.edu.ua

Поступило 19.01.2019
Принято 27.02.2019



В представленном исследовании реакцией гетероциклизации 1-метил-5,6-диаминоурацила и 2-оксопентандиовой кислоты синтезирована 3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропановая кислота, внутримолекулярная циклизация которой приводит к образованию трициклического лактона, а именно 1-метил-6,7-дигидро-2*H*-пирано[3,2-*g*]птеридин-2,4,8-(1*H*,3*H*)-триона. Реакциями последнего с *N*-нуклеофилами получен ряд амидов – структурных аналогов антифолатов. Строение и индивидуальность синтезированных соединений подтверждены спектроскопией ИК, ЯМР ¹H, ¹³C, хромато-масс- и масс-спектрометрией. Установлено, что синтезированные соединения проявляют цитотоксическое действие по отношению к клеткам гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) и могут быть интересны в плане дальнейшего изучения их противоопухолевой активности по отношению к другим клеточным линиям.

Ключевые слова: амиды, антифолаты, 1-метил-5,6-диаминоурацил, 3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропановая кислота, *N*-нуклеофилы, гетероциклизация, структурное подобие, цитотоксичность.

Известно, что фолиевая кислота является субстратом и коферментом клеточного метаболизма¹ и участвует во многих биохимических процессах, прежде всего в синтезе азотистых пуриновых оснований нуклеиновых кислот.² Структурные аналоги фолиевой кислоты – антифолаты, ингибирующие метаболические пути, в которых принимают участие фолаты и их коферментные формы, нашли применение в медицинской практике как антибактериальные, противомаларийные и противоопухолевые препараты.^{3–5} Существующие и находящиеся в процессе разработки антифолаты, исходя из особенностей структуры и, как следствие, путей трансмембранного переноса, подразделяются на классические и неклассические. Необходимо отметить, что стратегии направленного поиска классических антифолатов были основаны на структурной модификации фолиевой кислоты и заключаются в восстановлении пиридазинового фрагмента и формилиро-

вании по положению 5 (рис. 1, направление 1), замене гидроксильной группы в положении 4 на аминогруппу (направление 2) с последующим метилированием экзотрициклической аминогруппы (направление 3) или ее заменой углеводородным фрагментом (направление 4). В то же время исследования, посвященные поиску биологически активных агентов среди аналогов фолиевой кислоты, в молекулах которых произведены замены последовательности фрагментов в *n*-аминобензоил-1-глутаматном остатке (положение 6) и аминогруппы на оксогруппу (положение 2, направление 5), являются малочисленными.

Цель работы – синтез амидов 3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропановой кислоты как перспективных антифолатов, проявляющих цитотоксическое действие, с возможностью их дальнейшей структурной модификации для направленного поиска противоопухолевых агентов.

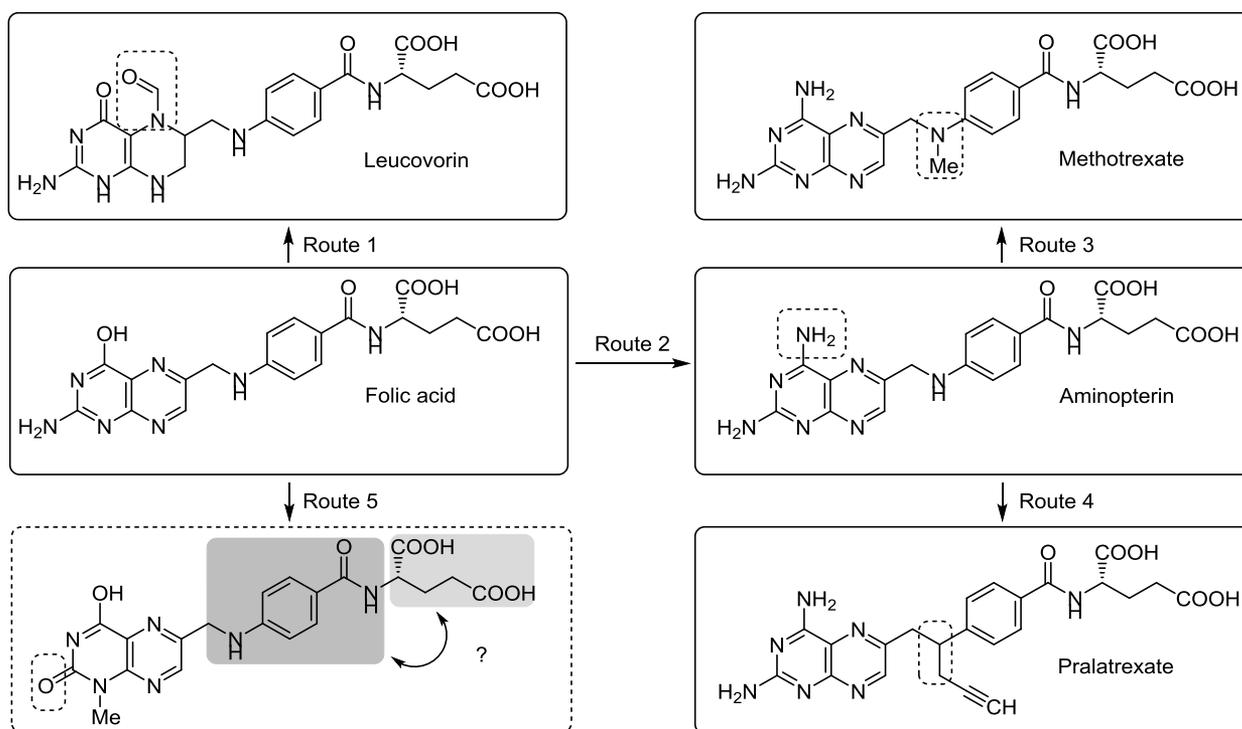


Рисунок 1. Структурная модификация фолиевой кислоты в создании классических антифолатов с терапевтическим действием.

Для реализации поставленной цели в качестве исходного соединения использовался 1-метил-5,6-диаминоурацил (**1**), полученный по известной методике из соответствующего нитрозопроизводного.^{6,7} Для формирования птеридиновой системы использовали известный метод гетероциклизации 1,2-дикарбонильных соединений с замещенными 5,6-диаминоурацилами.^{8–10} Таким образом, синтез кислоты **2** проводился путем нагревания 1-метил-5,6-диаминоурацила (**1**) с 2-оксопентандиовой кислотой в AcOH, используемой в качестве растворителя (схема 1). Установлено, что реакция протекает региоселективно и реализуется в первую очередь по более нуклеофильной аминогруппе в положении 5 замещенного урацила и карбонильной группе в α -положении 2-оксопентандиовой кислоты через промежуточное образование илиденопроизводного.^{11,12}

Полученная кислота **2** является перспективным объектом структурной модификации, причем одним из наиболее целесообразных методов является преобразование карбоксильной группы в амидный фрагмент. Тем более на оправданность такого направления исследований указывает тот факт, что многие из известных классических антифолатов содержат амидный фрагмент в положении 6 (рис. 1).

В настоящее время известно значительное количество методов синтеза амидов из соответствующих

карбоновых кислот, наиболее распространенные из которых основаны на взаимодействии аминов с генерированными *in situ* "активированными" производными карбоновых кислот.¹³ Эти методы зачастую требуют использования дорогостоящих или токсичных реагентов, дополнительной очистки растворителей и особых условий реакций. Учитывая упомянутые факты, а также структурные особенности кислоты **2**, было решено разработать метод синтеза амидов, основанный на взаимодействии *N*-нуклеофилов с лактоном **3**. Последний может быть получен с высоким выходом нагреванием 3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропановой кислоты (**2**) в смеси AcOH и Ac₂O (схема 1).

Образование кислоты **2** и лактона **3** подтверждается проведенными спектральными анализами. Так, спектр ЯМР ¹H соединения **2** характеризуется сигналами дупротонного мультиплета при 11.57–11.98 м. д., соответствующего карбоксильной группе и протону в положении 8.¹⁴ В слабом поле регистрируется сигнал синглетного протона в положении 3 при 11.42 м. д. Сильное поле характеризуется АВ-системой, состоящей из двух триплетов при 2.93 и 2.69 м. д., соответствующих этиленовому фрагменту в положении 6, а также трехпротонным синглетом метильной группы в положении 1 при 3.44 м. д. Формирование лактонного

Схема 1

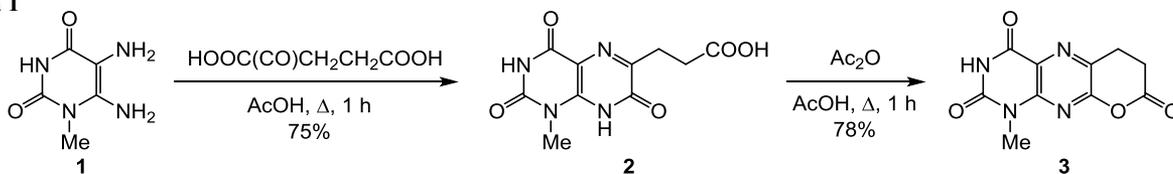
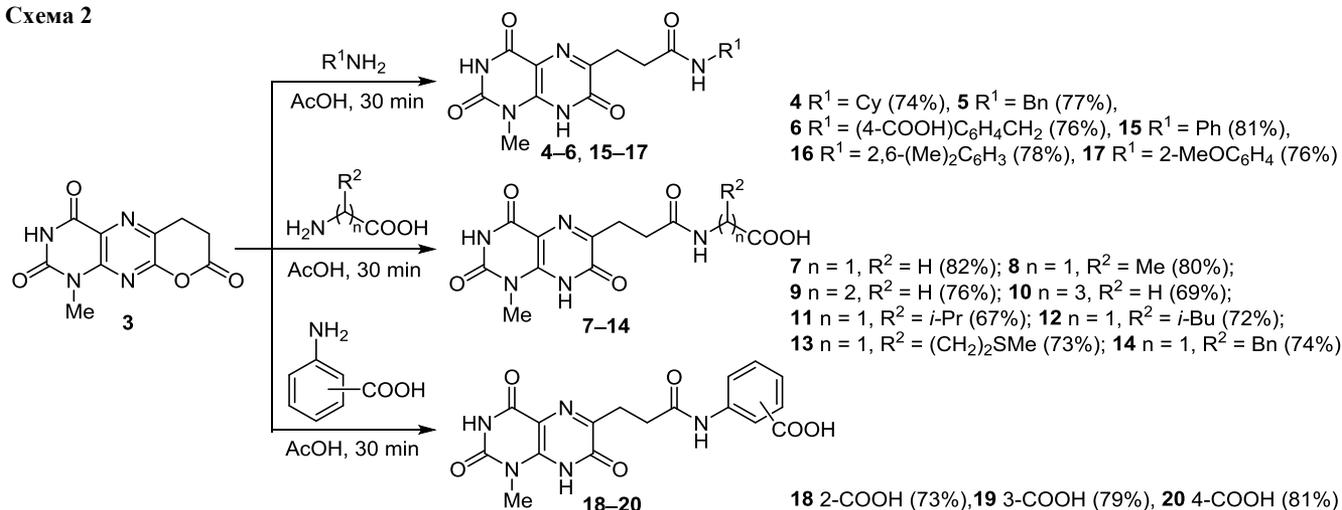


Схема 2



фрагмента (соединение **3**) существенно меняет спектральную картину. Так, в спектре ЯМР ¹H соединения **3** отсутствуют сигналы протонов карбоксильной группы и протонов в положении 8 птеридинового цикла, а сигналы этиленового фрагмента претерпевают существенный парамагнитный сдвиг и регистрируются в виде триплетов при 3.06 и 3.25 м. д.

Спектры ЯМР ¹³C соединений **2**, **3** дополнительно подтверждают структуры. Так, в спектре ЯМР ¹³C кислоты **2** характеристическими являются сигналы атомов углерода карбоксильной группы при 174.1 м. д., атомов углерода в положении 7 птеридиновой системы при 159.9 м. д. и атомов углерода этиленового фрагмента при 30.7 и 26.9 м. д. Образование пиранового фрагмента в соединении **3** приводит к появлению сигнала атома углерода группы CO при 166.4 м. д., а также к существенному диамагнитному сдвигу сигналов других атомов в цикле.

Полученный 1-метил-6,7-дигидро-2H-пирано[3,2-g]-птеридин-2,4,8-(1H,3H)-трион (**3**), являясь эффективным ацилирующим агентом, легко вступает в реакции с *N*-нуклеофилами, в результате которой с высокими выходами образуются амиды **4–20** (схема 2). Следует отметить, что оптимальными условиями для проведения реакции являются безводные растворители, наиболее приемлемым из которых оказалась AcOH. В качестве нуклеофилов были использованы соединения, содержащие первичную аминогруппу (алифатические и ароматические амины и аминокислоты). Использование данных реагентов было обусловлено тем, что образующиеся в результате реакции амиды **4–20** выступают структурными аналогами антифолатов.

В спектрах ЯМР ¹H соединений **4–20** характеристическими являются сигналы протонов при экзоциклической амидной группе, которые в зависимости от электронного окружения, проявляются как мультиплеты (соединения **4**, **5**, **9**, **10**), дублеты (соединения **8**, **11–14**) или триплеты (соединения **6**, **7**) в диапазоне 7.55–8.48 м. д. или синглеты (соединения **15–20**) при 8.86–11.35 м. д. Отмечается и существенный парамагнитный сдвиг сигнала амидного протона в спектре соединения

18, что, вероятно, обусловлено образованием водородной связи. Сигналы протонов этиленового фрагмента в спектрах ЯМР ¹H амидов **4–20** представлены двумя сигналами двупротонных триплетов или мультиплетов при 2.53–3.34 и 2.74–3.20 м. д. Также в спектрах ЯМР ¹H соединений **4–20** регистрируются сигналы протонов в положении 3 при 11.37–11.73 м. д. и метильной группы в положении 1 при 3.37–3.54 м. д. Кроме того, в спектрах ЯМР ¹H соединений **4–20** присутствуют сигналы протонов алифатических, ароматических фрагментов амидов с соответствующей мультиплетностью и химическими сдвигами.¹⁵

Спектры ЯМР ¹³C амидов **4**, **6**, **7**, **12–16**, **18–20** характеризуются сигналами углерода экзоциклической амидной группы при 167.3–172.0 м. д., а также сигналами атомов углерода заместителей при экзоциклическом атоме азота.

В масс-спектрах регистрируются индивидуальные пики квазимолекулярных ионов [M+H]⁺, имеющие высокую интенсивность и однозначно подтверждающие строение и индивидуальность синтезированных соединений.

В масс-спектре (ионизация ЭУ) соединения **2** ион [M]⁺ не регистрируется, а основной распад связан с образованием фрагментарных ионов Φ₁ ([M–H₂O]⁺ с *m/z* 248), Φ₂ ([M–COOH]⁺ с *m/z* 221) и Φ₃ ([M–CO₂]⁺ с *m/z* 220), характеризующих гетерилалкилкарбоновые кислоты.¹⁶ В масс-спектре соединения **20** основное направление фрагментации ионов [M]⁺ связано с α-разрывом и непосредственным разрывом амидной связи с образованием фрагментарных ионов Φ₁ ([M–C(O)NHC₆H₄COOH]⁺ с *m/z* 220) и Φ₂ ([NHC₆H₄COOH]⁺ с *m/z* 120). Кроме того, в спектре присутствуют фрагментарные ионы, характеризующие птеридиновую систему.¹⁷

Продолжая направленный поиск соединений с противоопухолевой активностью среди антифолатов и изучение влияния заместителей в положении 6 соответствующей птеридиновой системы на эту активность, мы отобрали соединения **12** и **14** для испытания их цитотоксического действия на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) в МТТ-тесте.

Таблица 1. Доля жизнеспособных клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека (НерG2) в условиях *in vitro* после инкубации с соединением **14** в течение 48, 72 и 96 ч (среднее \pm ошибка среднего, $n = 3$), %

Время, ч	Концентрация, %				
	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313
48	4.647 \pm 0.413*	7.268 \pm 0.859*	38.725 \pm 4.296*	64.164 \pm 2.167	69.109 \pm 6.553
72	5.512 \pm 0.364*	13.062 \pm 0.3*	17.975 \pm 1.715*	98.502 \pm 4.552	98.083 \pm 4.552
96	34.161 \pm 0.598*	30.711 \pm 0.365*	37.612 \pm 8.666*	113.803 \pm 7.625	101.035 \pm 4.662

* Различия достоверны относительно контроля при $p < 0.05$.

Результаты исследований показали, что способность клеточной культуры восстанавливать тетразолий снижалась в присутствии растворов соединений **14** и **12** и носила дозо- и времязависимый характер (табл. 1, 2). Так, водные растворы соединения **14** в концентрациях 0.125–0.5% снижали жизнеспособность клеток в культуре при выдержке 48 ч (табл. 1).

Наиболее выраженное снижение показателя жизнеспособности клеток установлено для концентрации 0.5% ($p < 0.05$). В концентрациях 0.25 и 0.125% исследуемое соединение **14** приводило к увеличению количества погибших клеток, снижая показатель жизнеспособности до 7.27 и 38.73% ($p < 0.05$) соответственно. Наименьшие из исследованных концентраций (0.0625 и 0.0313%) не оказывали достоверного токсического влияния на клетки НерG2 при выдержке 48 ч. Цитотоксичность растворов соединения **14** снижалась при увеличении времени контакта с клетками НерG2 до 72 ч. Так, при инкубации клеток с растворами наименьшей концентрации (0.0625 и 0.0313%) в течение 72 ч доля жизнеспособных клеток составила 98.50 и 98.08% соответственно ($p > 0.05$). Увеличение концентрации действующего вещества (0.125, 0.25, 0.5%) при выдержке 72 ч приводило к пропорциональному снижению доли жизнеспособных клеток на 17.98, 13.06, 5.51% ($p < 0.05$) соответственно. При увеличении времени контакта исследуемых растворов с клетками НерG2 до 96 ч выживаемость клеток во всех исследованных концентрациях была выше, чем при выдержке 72 ч, и составляла 34.16, 30.71, 37.61, 113.80, 101.04% соответственно для концентраций 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313%. Наблюдаемый эффект может быть связан с метаболизацией клетками печени исследуемых растворов.^{18–20}

Различные проявления цитотоксического влияния соединения **12** были отмечены в концентрациях 0.0313–0.5% при выдержке в течение 48 ч (табл. 2).

Наиболее выраженное влияние на жизнеспособность клеток установлено для концентрации 0.5% – снижение жизнеспособности клеток до 9.5% ($p < 0.05$). В концентрации 0.25% исследуемое соединение **12** приводило к

увеличению доли погибших клеток, снижая показатель жизнеспособности до 48.0% ($p < 0.05$). Концентрации 0.125, 0.0625 и 0.0313% в данном временном промежутке достоверно не снижали жизнеспособности клеток в исследуемой культуре. Цитотоксический эффект исследуемых растворов соединения **12** увеличивался при увеличении времени контакта с клетками НерG2. Однако стоит отметить, что при инкубации клеток с 0.5% раствором соединения **12** в течение 72 ч, доля жизнеспособных клеток составила 15.5%, а через 96 ч инкубации повышения цитотоксического влияния не отмечалось, напротив – доля жизнеспособных клеток увеличилась и составила 27.9% ($p > 0.05$). Снижение концентрации действующего вещества (0.125, 0.0625, 0.0313%) при выдержке 72 ч приводило к пропорциональному снижению жизнеспособных клеток до 4.7, 38.8, 65.1% ($p < 0.05$) соответственно. При увеличении времени контакта исследуемых растворов с клетками НерG2 до 96 ч выживаемость клеток во всех исследованных концентрациях была выше, по сравнению с выдержкой 72 ч, и составила 16.7, 33.47, 90.8, 116.1% соответственно для концентраций 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313%. Наблюдаемый эффект может быть связан с возможной метаболизацией клетками печени исследуемых растворов.

Таким образом, на основе 1-метил-5,6-диаминоурацила и 2-оксопентандиовой кислоты гетероциклизацией получена 3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропановая кислота, для которой проведена активация карбоксильной группы через образование лактона. Последний под действием *N*-нуклеофилов образует ряд амидов. Строение синтезированных соединений доказано спектроскопией ИК, ЯМР ¹H и ¹³C, хромато-масс- и масс-спектрометрией. Синтезированные соединения проявляют цитотоксическое действие в концентрациях 0.125–0.5% при контакте с клетками НерG2 в течение 48 ч, вызывая увеличение доли погибших клеток от 42.9 до 95.35% ($p < 0.05$). Цитотоксичность соединений носит дозо- и времязависимый характер.

Таблица 2. Доля жизнеспособных клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека (НерG2) в условиях *in vitro* после инкубации с соединением **12** в течение 48, 72 и 96 ч (среднее \pm ошибка среднего, $n = 3$), %

Время, ч	Концентрация, %				
	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313
48	9.532 \pm 1.374*	48.019 \pm 0.878*	57.194 \pm 5.16	84.540 \pm 4.43	101.340 \pm 4.334
72	15.518 \pm 2.34*	5.752 \pm 0.452*	4.733 \pm 0.216*	38.766 \pm 6.85*	65.129 \pm 1.238*
96	27.881 \pm 0.42*	16.701 \pm 0.897*	33.471 \pm 5.584*	90.821 \pm 10.241	116.149 \pm 8.703

* Различия достоверны относительно контроля при $p < 0.05$.

Экспериментальная часть

ИК спектры зарегистрированы на спектрофотометре Bruker Alpha в области 7500–400 см⁻¹ с использованием приставки ATR (прямое введение образца). Спектры ЯМР ¹H и ¹³C зарегистрированы на приборе Mercury 400 (400 и 100 МГц соответственно) в ДМСО-*d*₆, внутренний стандарт ТМС. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ¹³C проведено с использованием АРТ-эксперимента. Хромато-масс-спектры зарегистрированы на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100 Series, оснащенный диодно-матричным и масс-селективным детектором Agilent LC/MSD SL. Система растворителей MeCN–H₂O–HCO₂H, градиентное элюирование. Способ ионизации – химическая ионизация при атмосферном давлении методом электрораспыления (ХИАД-ЭС). Режим ионизации – одновременное сканирование положительных и отрицательных ионов в диапазоне 80–1000 *m/z*. Масс-спектры зарегистрированы на приборе Varian 1200L, ионизация ЭУ (70 эВ), прямое введение образца, температура источника ионов 230 °С, температура квадруполя 150 °С, скорость нагревания 120 °С/мин в интервале от 50 до 350 °С, диапазон считывания массовых чисел 40–700 *m/z*. Элементный анализ (С, Н, N) выполнен на приборе Elementar vario EL cube. Температуры плавления определены капиллярным способом на приборе Stuart SMP30.

Соединение **1** получено согласно описанному ранее методу.¹⁴ Используются коммерчески доступные реактивы компаний Merck, Sigma-Aldrich и "Енамин".

3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропановая кислота (2). К суспензии 1.56 г (10 ммоль) 1-метил-5,6-диаминоурацила (**1**) в 30 мл АсОН добавляют 1.46 г (10 ммоль) 2-оксопентандиовой кислоты. При нагревании образуется прозрачный раствор, из которого выпадает осадок. Реакционную смесь кипятят в течение 1 ч и охлаждают. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой и высушивают. Выход 1.99 г (75%), светло-желтый порошок, т. пл. >300 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3500, 3056, 2980, 1643, 1556, 1452, 1421, 1325, 1181, 834, 791, 750, 693, 669, 630. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.69 (2H, т, *J* = 7.2, CH₂CH₂COOH); 2.93 (2H, т, *J* = 7.1, CH₂CH₂COOH); 3.44 (3H, с, 1-NCH₃); 11.42 (1H, с, 3-NH); 11.57–11.98 (2H, м, 8-NH, COOH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 26.9 (CH₂CH₂COOH); 28.5 (NCH₃); 30.7 (CH₂CH₂COOH); 118.2 (C-4a); 141.2 (C-8a); 148.1 (C-6); 150.6 (C-2); 159.9 (C-4,7); 174.1 (COOH). Масс-спектр (ЭУ), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 248 (29), 246 (9), 221 (11), 220 (100), 167 (18), 149 (28), 121 (7), 83 (19), 68 (7), 67 (7). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 267 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: С 45.15; Н 3.82; N 21.09. С₁₀H₁₀N₄O₅. Вычислено, %: С 45.12; Н 3.79; N 21.05.

1-Метил-6,7-дигидро-2H-пирано[3,2-*g*]птеридин-2,4,8(1H,3H)-трион (3). Суспензию 2.66 г (10 ммоль) 3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропановой кислоты (**2**) в смеси 10 мл АсОН и 10 мл Ас₂O кипятят в течение 1 ч. При охлаждении раствора до комнатной температуры выпадает кристал-

лический осадок. Полученный осадок отфильтровывают, промывают Et₂O и высушивают. Выход 1.93 г (78%), белые кристаллы, т. пл. 294–296 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3010, 2850, 1809, 1675, 1560, 1513, 1435, 1349, 1282, 1256, 1197, 1095, 1056, 1017, 981, 883, 806, 749, 719, 673, 618. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 3.06 (2H, т, *J* = 7.4, CH₂CH₂CO); 3.25 (2H, т, *J* = 7.3, CH₂CH₂CO); 3.46 (3H, с, 1-NCH₃); 11.84 (1H, с, 3-NH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 24.7 (C-7); 28.3 (C-6); 28.7 (NCH₃); 124.0 (C-4a); 135.9 (C-5a); 148.3 (C-10a); 150.4 (C-2); 155.6 (C-9a); 159.3 (C-4); 166.4 (C-8). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 249 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: С 48.43; Н 3.29; N 22.61. С₁₀H₈N₄O₄. Вычислено, %: С 48.39; Н 3.25; N 22.57.

Синтез амидов 3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропановых кислот 4–20 (общая методика). К раствору 1.24 г (5 ммоль) 1-метил-6,7-дигидро-2H-пирано[3,2-*g*]птеридин-2,4,8(1H,3H)-триона (**3**) в 20 мл АсОН добавляют 5 ммоль соответствующего амина, ароматической кислоты или аминокислоты и нагревают до растворения. Реакционную смесь кипятят в течение 30 мин, образующийся при охлаждении осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат.

N-Циклогексил-3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропанамид (4). Выход 1.28 г (74%), белый порошок, т. пл. 286–288 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3020, 2910, 2860, 1694, 1526, 1434, 1322, 1192, 840, 729, 685, 632. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.04–1.68 (10H, м, 2,3,4,5,6,-CH₂ Cy); 2.69 (2H, т, *J* = 6.9, CH₂CH₂CONH); 2.88 (2H, т, *J* = 6.9, CH₂CH₂CONH); 3.37–3.54 (4H, м, 3-NCH₃, 1-CH Cy); 7.55 (1H, д, *J* = 8.9, CONH); 11.40–12.63 (2H, м, 3,8-NH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 25.0 (C-3,5 Cy); 25.7 (C-4 Cy); 27.9 (CH₂CH₂CO); 28.5 (NCH₃); 32.8 (CH₂CH₂CO); 32.9 (C-2,6 Cy); 47.8 (C-1 Cy); 118.3 (C-4a); 141.9 (C-8a); 148.2 (C-6); 150.7 (C-2); 159.9 (C-7); 159.9 (C-4), 170.6 (CONH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 348 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: С 55.36; Н 6.13; N 20.19. С₁₆H₂₁N₅O₄. Вычислено, %: С 55.32; Н 6.09; N 20.16.

N-Бензил-3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропанамид (5). Выход 1.37 г (77%), белый порошок, т. пл. 289–292 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3320, 3190, 3050, 2870, 1671, 1615, 1550, 1427, 1397, 1349, 1256, 1222, 1142, 803, 750, 704. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.59–2.70 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 2.95–3.05 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 3.45 (3H, с, 1-NCH₃); 4.27 (2H, д, *J* = 5.8, NHCH₂Ph); 6.74–7.38 (5H, м, H-2,3,4,5,6 Ph); 7.97–8.48 (1H, м, CONH); 11.40 (1H, с, 3-NH); 12.86 (1H, с, 8-NH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 356 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: С 57.49; Н 4.85; N 19.75. С₁₇H₁₇N₅O₄. Вычислено, %: С 57.46; Н 4.82; N 19.71.

4-{{3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропанамидо}метил}бензойная кислота (6). Выход 1.52 г (76%), белый порошок, т. пл. >300 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3470, 3310, 3020, 2750, 1693, 1614, 1551, 1428, 1396, 1350, 1257, 1224, 1140, 763. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.67 (2H, т, *J* = 7.3, CH₂CH₂CONH); 3.14 (2H, т, *J* = 7.3, CH₂CH₂CONH);

3.45 (3H, с, 1-NCH₃); 4.33 (2H, д, $J = 5.6$, NHCH₂Ph); 7.33 (2H, д, $J = 6.8$, H-3,5 Ar); 7.86 (2H, д, $J = 7.1$, H-2,6 Ar); 8.39 (1H, т, $J = 5.7$, CONH); 11.47 (1H, с, 3-NH); 11.87–12.61 (2H, м, 8-NH, COOH). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 27.5 (CH₂CH₂CO); 28.5 (NCH₃); 32.3 (CH₂CH₂CO); 42.3 (CH₂NH); 118.4 (C-4a); 127.4 (C-3,5 Ar); 129.5 (C-1 Ar); 129.7 (C-2,6 Ar); 141.7 (C-8a); 145.2 (C-4 Ar); 148.2 (C-6); 150.7 (C-2); 159.8–160.2 (C-4,7); 167.6 (COOH); 171.9 (CONH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 400 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 54.11; H 4.26; N 17.59. C₁₈H₁₇N₅O₆. Вычислено, %: C 54.14; H 4.29; N 17.54.

3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]глицин (7). Выход 1.32 г (82%), белый порошок, т. пл. 278–280 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3405, 3005, 2780, 1715, 1601, 1551, 1427, 1347, 1281, 1199, 793, 751, 632. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J , Гц): 2.62 (2H, т, $J = 7.7$, CH₂CH₂CONH); 2.98 (2H, т, $J = 7.5$, CH₂CH₂CONH); 3.44 (3H, с, 1-NCH₃); 3.73 (2H, д, $J = 5.5$, NHCH₂COOH); 8.09 (1H, т, $J = 5.6$, CONH); 11.37 (1H, с, 3-NH); 12.28–12.56 (2H, м, 8-NH, COOH). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 27.7 (CH₂CH₂CO); 28.5 (NCH₃); 32.4 (CH₂CH₂CO); 41.0 (CH₂NH); 118.1 (C-4a); 141.7 (C-8a); 148.3 (C-6); 150.7 (C-2); 159.9 (C-7); 160.0 (C-4); 171.8 (CONH); 172.2 (COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 324 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 44.61; H 4.09; N 21.69. C₁₂H₁₃N₅O₆. Вычислено, %: C 44.59; H 4.05; N 21.66.

3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]аланин (8). Выход 1.35 г (80%), белый порошок, т. пл. 272–274 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3460, 3060, 2810, 1714, 1598, 1522, 1422, 1346, 1279, 1201, 1150, 858, 751. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J , Гц): 1.30 (3H, д, $J = 7.3$, NHCH(CH₃)COOH); 2.60 (2H, т, $J = 7.8$, CH₂CH₂CONH); 2.74–3.04 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 3.43 (3H, с, 1-NCH₃); 4.21 (1H, пентет, $J = 7.2$, NHCH(CH₃)COOH); 8.03 (1H, д, $J = 7.4$, CONH); 11.40 (1H, с, 3-NH); 12.19–12.78 (2H, м, 8-NH, COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 338 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 46.31; H 4.51; N 20.79. C₁₃H₁₅N₅O₆. Вычислено, %: C 46.29; H 4.48; N 20.76.

3-[[3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]амино}пропановая кислота (9). Выход 1.28 г (76%), белый порошок, т. пл. 254–256 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3390, 3103, 2892, 1712, 1520, 1338, 1176, 847, 688, 630. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J , Гц): 1.77–2.04 (2H, м, NHCH₂CH₂COOH); 2.78–3.34 (6H, м, NHCH₂CH₂COOH, CH₂CH₂CONH); 3.45 (3H, с, 1-NCH₃); 7.86 (1H, с, CONH); 11.40 (1H, с, 3-NH); 11.97–12.37 (2H, м, 8-NH, COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 338 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 46.32; H 4.50; N 20.78. C₁₃H₁₅N₅O₆. Вычислено, %: C 46.29; H 4.48; N 20.76.

4-[[3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]амино}бутановая кислота (10). Выход 1.21 г (69%), белый порошок, т. пл. 245–247 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3380, 3200, 2910, 1712, 1519, 1337, 1177, 846, 688, 630. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J , Гц): 1.66 (2H, пентет, $J = 7.1$, CONHCH₂CH₂CH₂COOH); 2.18 (2H, т, $J = 7.3$, CONHCH₂CH₂CH₂COOH); 2.55 (2H,

т, $J = 6.5$, CH₂CH₂CONH); 2.90–3.02 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 3.09 (2H, к, $J = 6.3$, NHCH₂CH₂CH₂COOH); 3.44 (3H, с, 1-NCH₃), 7.79 (1H, т, $J = 5.4$, CONH); 11.41 (1H, с, 3-NH); 12.00–12.78 (2H, м, 8-NH, COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 352 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 47.89; H 4.90; N 19.95. C₁₄H₁₇N₅O₆. Вычислено, %: C 47.86; H 4.88; N 19.93.

3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]валин (11). Выход 1.23 г (67%), белый порошок, т. пл. 269–271 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3680, 3190, 2893, 1696, 1549, 1428, 1341, 1216, 751. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J , Гц): 0.91 (6H, д, $J = 6.6$, NHCH(CH(CH₃)₂)COOH); 2.07 (1H, д, к, $J = 13.3$, $J = 6.6$, NHCH(CH(CH₃)₂)COOH); 2.66 (2H, т, $J = 8.1$, CH₂CH₂CONH); 2.97 (2H, т, $J = 8.1$, CH₂CH₂CONH); 3.43 (3H, с, 1-NCH₃), 4.16 (1H, д, д, $J = 8.4$, $J = 5.6$, NHCH(CH(CH₃)₂)COOH); 7.87 (1H, д, $J = 8.6$, CONH); 11.40 (1H, с, 3-NH); 12.54 (2H, с, 8-NH, COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 366 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 49.33; H 5.26; N 19.19. C₁₅H₁₉N₅O₆. Вычислено, %: C 49.31; H 5.24; N 19.17.

3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]лейцин (12). Выход 1.36 г (72%), белый порошок, т. пл. 216–218 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3610, 3250, 2920, 1696, 1551, 1426, 1222. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J , Гц): 0.90 (6H, д, д, $J = 16.3$, $J = 6.5$, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)COOH); 1.41–1.58 (1H, м, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)COOH); 1.66 (2H, д, т, $J = 15.1$, $J = 6.7$, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)COOH); 2.64 (2H, т, $J = 8.1$, CH₂CH₂CONH); 2.95 (2H, т, $J = 8.1$, CH₂CH₂CONH); 3.44 (3H, с, 1-NCH₃); 4.16–4.29 (1H, м, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)COOH); 7.98 (1H, д, $J = 8.1$, CONH); 11.41 (1H, с, 3-NH); 12.04–13.05 (2H, м, 8-NH, COOH). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 21.7, 23.3 (CHCH₂CH(CH₃)₂); 24.7 (CHCH₂CH(CH₃)₂); 27.8 (CH₂CH₂CO); 28.5 (NCH₃); 32.4 (CH₂CH₂CO); 40.1 (CHCH₂CH(CH₃)₂); 50.6 (CHCH₂CH(CH₃)₂); 118.3 (C-4a); 141.6 (C-8a); 148.1 (C-6); 150.6 (C-2); 159.9 (C-7); 159.9 (C-4); 171.8 (CONH); 174.6 (COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 380 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 50.68; H 5.61; N 18.48. C₁₆H₂₁N₅O₆. Вычислено, %: C 50.66; H 5.58; N 18.46.

3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]метионин (13). Выход 1.45 г (73%), белый порошок, т. пл. 222–224 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3420, 3056, 2830, 1703, 1548, 1425, 1342, 1222, 752, 634. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J , Гц): 1.77–2.03 (2H, м, NHCH(CH₂CH₂SCH₃)COOH); 2.05 (3H, с, NHCH(CH₂CH₂SCH₃)COOH); 2.35–2.49 (2H, м, NHCH(CH₂CH₂SCH₃)COOH); 2.63 (2H, т, $J = 6.6$, CH₂CH₂CONH); 2.88–3.04 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 3.44 (3H, с, 1-NCH₃); 4.30 (1H, т, д, $J = 8.5$, $J = 4.5$, NHCH(CH₂CH₂SCH₃)COOH); 8.07 (1H, д, $J = 8.0$, CONH); 11.41 (1H, с, 3-NH); 12.63 (2H, с, 8-NH, COOH). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 15.0 (CHCH₂CH₂SCH₃); 27.7 (CH₂CH₂CO); 28.5 (NCH₃); 30.1 (CHCH₂CH₂SCH₃); 31.1 (CHCH₂CH₂SCH₃); 32.4 (CH₂CH₂CO); 51.3 (CHCH₂CH₂SCH₃); 118.4 (C-4a); 141.6 (C-8a); 148.1 (C-6); 150.7 (C-2); 159.9 (C-4,7); 172.0 (CONH); 173.8 (COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 398 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 45.36;

H 4.85; N 17.65. C₁₅H₁₉N₅O₆S. Вычислено, %: C 45.34; H 4.82; N 17.62.

3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]фенилаланин (14). Выход 1.53 г (74%), белый порошок, т. пл. 162–164 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3300, 3020, 2890, 1681, 1612, 1549, 1428, 1347, 1246, 754, 699. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.53–2.65 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 2.83–2.96 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 3.00–3.12 (2H, м, NHCH(CH₂Ph)COOH); 3.43 (3H, с, 1-NCH₃); 4.36–4.50 (1H, м, NHCH(CH₂Ph)COOH); 7.10–7.29 (5H, м, H-2,3,4,5,6 Ph); 8.05 (1H, д, *J* = 7.9, CONH); 11.42 (1H, с, 3-NH); 12.58 (2H, с, 8-NH, COOH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 27.7 (CH₂CH₂CO); 28.5 (NCH₃); 32.4 (CH₂CH₂CO); 37.2 (CHCH₂); 53.9 (CHCH₂); 118.4 (C-4a); 126.7 (C-4 Ph); 128.5 (C-2,6 Ph); 129.5 (C-3,5 Ph); 138.1 (C-1 Ph); 141.6 (C-8a); 148.2 (C-6); 150.7 (C-2); 159.9 (C-7); 159.9 (C-4); 171.8 (CONH); 173.5 (COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 414 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 55.22; H 4.65; N 16.97. C₁₉H₁₉N₅O₆. Вычислено, %: C 55.20; H 4.63; N 16.94.

3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)-N-фенилпропанамид (15). Выход 1.38 г (81%), белый порошок, т. пл. >295 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3410, 3190, 3010, 1679, 1595, 1563, 1498, 1438, 1310, 1192, 802, 749, 690, 626. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.82 (2H, т, *J* = 7.6, CH₂CH₂CONH); 3.08 (2H, т, *J* = 7.7, CH₂CH₂CONH); 3.46 (3H, с, 1-NCH₃); 6.90–7.03 (1H, м, H-4 Ph); 7.12–7.27 (2H, м, H-3,5 Ph); 7.59 (2H, д, *J* = 6.4, H-2,6 Ph); 9.88 (1H, с, CONH); 11.44 (1H, с, 3-NH); 12.98 (1H, с, 8-NH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 27.3 (CH₂CH₂CO); 28.6 (NCH₃); 33.4 (CH₂CH₂CO); 119.1–119.6 (C-4a, C-2,6 Ph); 123.4 (C-4 Ph); 129.1 (C-3,5 Ph); 139.8 (C-1 Ph); 141.6 (C-8a); 148.2 (C-6); 150.7 (C-2); 159.9 (C-4,7); 170.8 (CONH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 342 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 56.33; H 4.45; N 20.55. C₁₆H₁₅N₅O₄. Вычислено, %: C 56.30; H 4.43; N 20.52.

N-(2,6-Диметилфенил)-3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропанамид (16). Выход 1.44 г (78%), белый порошок, т. пл. >297 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3210, 3020, 2840, 1703, 1621, 1555, 1439, 1349, 1232, 760, 643. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.14 (6H, с, 2,6-CH₃); 2.84 (2H, т, *J* = 7.6, CH₂CH₂CONH); 3.09 (2H, т, *J* = 7.6, CH₂CH₂CONH); 3.46 (3H, с, 1-NCH₃); 6.57–7.25 (3H, м, H-3,4,5 Ar); 9.22 (1H, с, CONH); 11.44 (1H, с, 3-NH); 12.88 (1H, с, 8-NH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 18.5 (2,6-CH₃); 27.7 (CH₂CH₂CO); 28.6 (NCH₃); 32.4 (CH₂CH₂CO); 118.4 (C-4a); 126.6 (C-4 Ar); 128.0 (C-3,5 Ar); 135.7 (C-2,6 Ar); 135.7 (C-1 Ar); 141.7 (C-8a); 148.2 (C-6); 150.7 (C-2); 159.9 (C-7); 159.9 (C-4); 170.4 (CONH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 370 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 58.55; H 5.20; N 18.98. C₁₈H₁₉N₅O₄. Вычислено, %: C 58.53; H 5.18; N 18.96.

N-(2-Метоксифенил)-3-(1-метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропанамид (17). Выход 1.41 г (76%), белый порошок, т. пл. >300 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3020, 2810, 1684, 1560, 1534, 1486, 1440, 1398, 1329, 1293, 1213, 1022, 866, 801, 751, 628. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.90 (2H, т,

CH₂CH₂CONH); 3.08 (2H, т, *J* = 7.3, CH₂CH₂CONH); 3.46 (3H, с, 1-NCH₃); 3.86 (3H, с, OCH₃); 6.84 (1H, т, *J* = 8.3, H-5 Ar); 6.91 (1H, д, *J* = 8.4, H-3 Ar); 6.98 (1H, т, *J* = 8.4, H-4 Ar); 8.03 (1H, д, *J* = 9.0, H-6 Ar); 8.86 (1H, с, CONH); 11.43 (1H, с, 3-NH); 12.94 (1H, с, 8-NH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z*: 372 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 55.01; H 4.63; N 18.88. C₁₇H₁₇N₅O₅. Вычислено, %: C 54.98; H 4.61; N 18.86.

2-{3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]амино}бензойная кислота (18). Выход 1.4 г (73%), белый порошок, т. пл. 295–297 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3190, 3110, 2960, 1642, 1555, 1393, 1224, 1180, 799, 765, 718, 646. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.88 (2H, т, *J* = 7.4, CH₂CH₂CONH); 2.99–3.20 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 3.44 (3H, с, 1-NCH₃); 7.05 (1H, т, *J* = 7.6, H-5 Ar); 7.49 (1H, т, *J* = 8.3, H-4 Ar); 7.98 (1H, д, *J* = 6.7, H-3 Ar); 8.57 (1H, д, *J* = 8.3, H-6 Ar); 11.35 (1H, с, CONH); 11.42 (1H, с, 3-NH); 12.95 (2H, с, 8-NH, COOH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 27.1 (CH₂CH₂CO); 28.5 (NCH₃); 34.4 (CH₂CH₂CO); 116.8 (C-4a); 116.8 (C-1 Ar); 120.4 (Ar C-5); 122.9 (C-3 Ar); 131.4 (C-6 Ar); 134.4 (C-4 Ar); 141.1 (C-2 Ar); 141.3 (C-8a); 148.2 (C-6); 150.6 (C-2); 159.9 (C-4,7); 169.9 (CONH); 170.8 (COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 386 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 53.02; H 3.95; N 18.20. C₁₇H₁₅N₅O₆. Вычислено, %: C 52.99; H 3.92; N 18.18.

3-{3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]амино}бензойная кислота (19). Выход 1.52 г (79%), белый порошок, т. пл. >300 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3330, 3160, 3080, 1711, 1632, 1541, 1429, 1346, 1275, 1241, 1190, 1136, 1022, 844, 761, 728, 686, 635. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.84 (2H, т, *J* = 7.4, CH₂CH₂CONH); 3.09 (2H, т, *J* = 7.5, CH₂CH₂CONH); 3.46 (3H, с, 1-NCH₃); 7.32 (1H, т, *J* = 8.0, H-5 Ar); 7.58 (1H, д, *J* = 7.8, H-4 Ar); 7.84 (1H, д, *J* = 8.4, H-6 Ar); 8.19 (1H, с, H-2 Ar); 10.09 (1H, с, CONH); 11.44 (1H, с, 3-NH); 12.28 (2H, с, 8-NH, COOH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 27.2 (CH₂CH₂CO); 28.6 (NCH₃); 33.4 (CH₂CH₂CO); 118.4 (C-4a); 120.2 (C-2 Ar); 123.6 (C-6 Ar); 124.2 (C-4 Ar); 129.3 (C-5 Ar); 131.6 (C-1 Ar); 140.0 (C-3 Ar); 141.6 (C-8a); 148.2 (C-6); 150.7 (C-2); 159.9 (C-7); 159.9 (C-4); 167.6 (CONH); 171.1 (COOH). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), *m/z* (*I*_{отн.}, %): 386 [M+H]⁺ (100). Найдено, %: C 53.02; H 3.95; N 18.20. C₁₇H₁₅N₅O₆. Вычислено, %: C 52.99; H 3.92; N 18.18.

4-{3-(1-Метил-2,4,7-триоксо-1,2,3,4,7,8-гексагидроптеридин-6-ил)пропаноил]амино}бензойная кислота (20). Выход 1.56 г (81%), белый порошок, т. пл. >300 °С. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3306, 3220, 1681, 1597, 1565, 1530, 1437, 1296, 1256, 1195, 860, 771, 627. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (*J*, Гц): 2.78–2.92 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 3.05–3.16 (2H, м, CH₂CH₂CONH); 3.46 (3H, с, 1-NCH₃); 7.69 (2H, д, *J* = 8.2, H-3,5 Ar); 7.84 (2H, д, *J* = 8.5, H-2,6 Ar); 10.20 (1H, с, CONH); 11.44 (1H, с, 3-NH); 11.81 (2H, с, 8-NH, COOH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 27.0 (CH₂CH₂CO); 28.6 (NCH₃); 33.5 (CH₂CH₂CO); 118.6 (C-4a); 118.7 (C-3,5 Ar); 125.2 (C-1 Ar); 130.8 (C-2,6 Ar); 141.5 (C-8a); 143.8 (C-4 Ar); 148.2 (C-6); 150.7 (C-2); 159.9 (C-7); 159.9 (C-4); 167.3 (CONH); 171.4 (COOH). Масс-спектр

(ЭИ), m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 220 (15), 149 (5), 138 (8), 137 (100), 121 (9), 120 (97), 92 (36), 65 (22), 64 (4), 63 (6). Масс-спектр (ХИАД-ЭС), m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 386 $[M+H]^+$ (100). Найдено, %: С 53.02; Н 3.95; N 18.20. $C_{17}H_{15}N_5O_6$. Вычислено, %: С 52.99; Н 3.92; N 18.18.

Определение цитотоксического действия соединений 12 и 14 на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) в условиях *in vitro*. Клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) получены из Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины. Клетки культивируют *in vitro* при 37 °С в среде DMEM (BioWest, Франция) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (BioWest, Франция) в концентрации 10%. Культуру клеток поддерживают в культуральных флаконах объемом 25 см² до формирования плотного монослоя при 37 ± 0.5 °С, 5% CO₂, влажности атмосферы 95%. Для получения различных концентраций исследуемых соединений проводят титрование исходных 10% растворов соединений 12 и 14 (в 0.1 М NaOH) в иммунологическом планшете методом перекачки. В качестве растворителя используют физиологический раствор. Исследуют следующие концентрации соединений: 0.5, 0.25, 0.0125, 0.0625 и 0.0315%.

Эксперименты по оценке цитотоксического влияния изучаемых соединений на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) проводят в стандартных 96-луночных планшетах для иммунологического анализа (SPL, Корея). Клетки засевают в лунки планшета в концентрации 2·10⁶ клеток/мл и инкубируют с исследуемыми водными экстрактами в течение 48, 72 и 96 ч. Параллельно инкубируют контрольные образцы клеток, в которые вместо растворов исследуемых соединений добавляют стерильный фосфатно-солевой буфер. Эксперимент воспроизводят три раза. Измерение оптической плотности растворов проводят на спектрофотометре STAT FAX 303 plus при длине волны 492 и 630 нм. Значение оптической плотности (A) растворов пропорционально содержанию в них живых клеток. Количество жизнеспособных клеток при контакте с исследуемым раствором рассчитывают по формуле $(A_{\text{опыта}}/A_{\text{контроля}}) \cdot 100\%$.

Математическую обработку полученных данных проводят методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel и Statistica с определением показателей: среднее арифметическое значение, ошибка среднего арифметического, достоверность различий между группами сравнения. Различия считают достоверными при $p < 0.05$. Расчет доли выживших клеток в каждой лунке планшета проводят после оценки достоверности отличия оптической плотности в экспериментальных лунках от оптической плотности в лунках контроля. В результате каждая концентрация образца характеризуется набором значений долей выживших клеток.^{21,22}

Работа выполнена при финансовой поддержке НПО "Енамин" (Киев, Украина).

Список литературы

1. Qujeq, D.; Ahmadi, H. *Am. J. Nephrol.* **2001**, *21*, 340.
2. Cunnington, C.; Van Assche, T.; Shirodaria, C.; Kylintireas, I.; Lindsay, A. C.; Lee, J. M.; Antoniadis, C.; Margaritis, M.; Lee, R.; Cerrato, R.; Crabtree, M. J.; Francis, J. M.; Sayeed, R.; Ratnatunga, C.; Pillai, R.; Choudhury, R. P.; Neubauer, S.; Channon, K. M. *Circulation* **2012**, *125*, 1356.
3. Werner-Felmayer, G.; Golderer, G.; Werner, E. R. *Curr. Drug Metab.* **2002**, *3*, 159.
4. Shalini, A.; Pavitra, K. K. *Agro Food Ind. Hi-Tech* **2012**, *23*, 25.
5. Kompis, I. M.; Islam, K.; Then, R. L. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 593.
6. Palanki, M. S. S.; Dneprovskaia, E.; Doukas, J.; Fine, R. M.; Hood, J.; Kang, X.; Lohse, D.; Martin, M.; Noronha, G.; Soll, R. M.; Wrasidlo, W.; Yee, S.; Zhu, H. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4279.
7. Kuroda, Y.; Isarai, K.; Murata, S. *Heterocycl. Commun.* **2012**, *18*, 117.
8. Murata, S.; Ichinose, H.; Urano, F. In *Bioactive Heterocycles II. Topics in Heterocyclic Chemistry*; Eguchi, S., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2007, vol. 8, p. 127.
9. Kim, Y.; Kang, Y.; Baek, D. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2001**, *22*, 141.
10. Guiney, D.; Gibson, C. L.; Suckling, C. J. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 664.
11. Kazunin, M. S.; Voskoboynik, O. Yu.; Nosulenko, I. S.; Berest, G. G.; Sergeieva, T.; Okovytyy, S.; Karpenko, O. V.; Priimenko, B. O.; Kovalenko, S. I. *J. Heterocycl. Chem.* **2018**, *55*, 1033.
12. Pfeleiderer, W. *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 993.
13. Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606.
14. El-Sabbagh, O. I.; El-Sadek, M. E.; El-Kalyoubi, S.; Ismail, I. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, *340*, 26.
15. Jacobsen, N. E. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*; John Wiley & Sons, Inc., 2007.
16. *Масс-спектрометрия в органической химии*; Лебедев, А. Т.; Ред.; БИНОМ. Лаборатория знаний: Москва, 2003.
17. Daele, V. J.; Blancquaert, D.; Kiekens, F.; Van Der Straeten, D.; Lambert, W. E.; Stove, C. P. *Food Chem.* **2016**, *194*, 1189.
18. Митрошина, Е. В.; Мищенко, Т. А.; Ведунова, М. В. *Определение жизнеспособности клеточных культур: Учебно-методическое пособие*; Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского: Нижний Новгород, 2015. http://www.neuro.unn.ru/sites/default/files/opredelenie_zhiznesposobnosti.pdf
19. Мицкевич, П. Б.; Космачева, С. М.; Ибрагимова, Ж. А.; Шман, Т. В.; Мыслицкий, В. Ф. *Применение МТТ-теста для оценки чувствительности лейкозных клеток к цитостатическим препаратам *in vitro* и прогнозирования ответа на химиотерапию при лейкозах; Инструкция по применению*; Министерство здравоохранения республики Беларусь: Минск. Регистрационный номер 1111-1102, дата утверждения 13.02.2003. <http://med.by/methods/pdf/111-1102.pdf>
20. Mosmann, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
21. *Cancer Cell Culture: Methods And Protocols (Methods In Molecular Medicine)*; Langdon, S. P., Eds.; Humana Press: Totowa, 2004, p. 165.
22. Supino, R. In *In Vitro Toxicity Testing Protocols (Methods In Molecular Biology)*; O'Hare, S.; Atterwill, C. K., Eds.; Springer: New York, 1995, vol. 43, p. 138.