СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА „ОРГАНИЧНА ХИМИЯ И ФАРМАКОГНОЗИЯ“

Весела Михайлова Михайлова

Синтез на дизаместени производни на пиролин- и пиролидинкарбоксилни киселини с потенциална биологична активност

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен

„*Доктор*“

Професионално направление 4.2 – Химически науки (Органична химия)

Научен ръководител: доц. д-р Донка Ташева

София, 2025 г.

Изследванията по дисертационния труд са извършени във Факултета по химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Дисертацията съдържа 199 страници, в които са включени 175 схеми, 12 таблици и 20 фигури. Библиографската справка обхваща 265 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедрения съвет на катедра „Органична химия и фармакогнозия“, Факултет по химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, състоял се на 09.04.2025 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ……2025 г. от ……..… часа в Заседателната зала на Факултет по химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Материалите по защитата са на разположение в Деканата на ФХФ, СУ „Св. Климент Охридски“, бул „Джеймс Баучер“ № 1.

СЪДЪРЖАНИЕ

СЪКРАЩЕНИЯ 2

ВЪВЕДЕНИЕ 3

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ 4

2. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ 5

2.1. Синтез на 3,5-диарил-2-((дифенилметилиден)амино)- 5-оксопентаннитрили (3) 6

2.2. Синтез на 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (4) 11

2.3. Взаимодействие на 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол- 2-карбонитрили (4) с HCl/диоксан/MeOH 13

2.4. Синтез на 3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (7) 15

2.5. Синтез на 3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (8) 18

2.6. Синтез на метил-3,5-диарилпиролидин-2-карбоксилати (9) 20

2.7. Синтез на *rel*-(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилна киселина (10a) 22

2.8. Структурно охарактеризиране 22

2.8.1. Структурно охарактеризиране на оксонитрили 3 23

2.8.2. Структурно охарактеризиране на 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (4) 25

2.8.3. Структурно охарактеризиране на метил-3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол- 2-карбоксилати (5) 31

2.8.4. Структурно охарактеризиране на пиролидин-2-карбонитрили 7-1 33

2.8.5. Структурно охарактеризиране на пиролидин-2-карбонитрили 8-1 34

2.8.6. Структурно охарактеризиране на метил-3,5-диарилпиролидин-2-карбоксилати (9-1) 35

2.8.7. Структурно охарактеризиране на 3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилна киселина (10a) 36

2.9. In vitro антипролиферативна активност 37

3. ОБОБЩЕНИЕ 41

4. ПРИНОСИ 43

5. ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ И ПРОЕКТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА 44

6. ЛИТЕРАТУРА 46

СЪКРАЩЕНИЯ:

TEBA	бензилтриетиламониев хлорид
LC-HRMS	течна хроматография/масспектрометрия с висока разделителна способност
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид
MCF-10A	клетъчна линия от нетуморогенни епителни клетки на млечна жлеза
MCF-7	клетъчна линия от луминален тип А карцином на млечна жлеза
MDA-MB-231	клетъчна линия от тройно негативен карцином на млечна жлеза
H1299	клетъчна линия от недребноклетъчен карцином на белия дроб
A549	клетъчна линия от алвеоларен аденокарцином на белия дроб
HeLa	клетъчна линия от карцином на маточната шийка
Hep G2	клетъчна линия от хепатоцелуларен карцином
HT-29	клетъчна линия от колоректален аденокарцином
PC-3	клетъчна линия от аденокарцином на простатата
IC_{50}	концентрацията, която предизвиква 50 % инхибиране на клетъчната пролиферация спрямо нетретираната контрола
SI	индекс на селективност ($SI = IC_{50}(MCF\text{-}10A)/IC_{50}$(туморна клетъчна линия))

ВЪВЕДЕНИЕ

Известно е, че раковите клетки претърпяват интензивно метаболитно препрограмиране, за да запазят окислително-редукционния и енергийния си баланс, като същевременно претърпяват метаболитни изменения, водещи до бързото им размножаване [1,2]. В зависимост от вида на раковите клетки са установени промени в различни метаболитни пътища, които засягат метаболизма на ключови биомолекули: липиди, нуклеинови киселини, въглехидрати и аминокиселини, включително незаменими аминокиселини [3]. Сред тези биомолекули, аминокиселините заемат централно място в множество метаболитни процеси в клетката и служат като алтернативен енергиен източник на глюкозата. Метаболизмът на аминокиселините се ускорява при множество злокачествени заболявания.

L-Пролинът, в сравнение с другите протеиногенни аминокиселини, има отличителна структура и е единствената аминокиселина с вторична аминогрупа в скелета на пиролидиновия пръстен и карбоксилна група в позиция 2. Метаболитният цикъл на L-пролина играе решаваща роля в преживяемостта, пролиферацията и метастазирането на раковите клетки [4-6]. Ключов интермедиат при биосинтеза и деградацията на L-пролина е Δ^1-пиролин-5-карбоксилат (P5C). Последната реакция в метаболитния път на L-пролина е редукцията на Δ^1-пиролин-5-карбоксилат до пролин, която се катализира от P5C редуктазата (PYCR1) [7,8]. Различни вещества, насочени към борба с раковите заболявания, са полезни като химически сонди за изучаване на механизмите на тези заболявания в процеса на откриване на лекарствени препарати.

Дизаместените синтетични производни на 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилната киселина са структурни аналози на Δ^1-пиролин-5-карбоксилната киселина. В научната литература няма данни за тяхната биологична активност.

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целите на изследването са:

1. Разработване на методи за синтез на 3,5-дизаместени производни на 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилната киселина и изследване на антипролиферативната им активност срещу човешки туморни клетъчни линии.
2. Получаване на 3,5-дизаместени производни на пролина.

За изпълнение на целите са поставени изследователските задачи:

1. Намиране на ефективни методи за синтез на заместени 2-амино-5-оксонитрили, предшественици на дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили.
2. Разработване на ефективни методи за получаване на дизаместени производни на 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилната киселина (Δ^1-пиролин-5-карбоксилната киселина).
3. Изследване на антипролиферативната активност на новосинтезираните производни на 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилната киселина срещу човешки туморни клетъчни линии.
4. Намиране на ефективни методи за редукция на производни на 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилната киселина с цел получаване на 3,5-дизаместени производни на пролина.

2. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Наличието на пиролидинов пръстен в структурата на L-пролина го превръща в уникална протеиногенна аминокиселина с важна роля за вторичната и третичната структура на белтъците. L-Пролинът играе важна роля в клетъчните сигнални пътища като апоптозата [9-11]. Известно е, че L-пролинът участва и в метаболизма на раковите клетки. Установена е ключовата роля на метаболитния цикъл на L-пролина при преживяемостта, пролиферацията и метастазирането на раковите клетки [4,12,13]. Ключов интермедиат в биосинтеза и разграждането на пролин е 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилната киселина (Δ^1-пиролин-5-карбоксилна киселина). Ензимите от групата на пиролин-5-карбоксилат редуктаза (PYCR) катализират NAD(P)H-зависимото превръщане на интермедиата 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилна киселина в пролин. Установена е свръхекспресия на PYCR-1 в раковите тъкани при рак на простатата [7] и рак на дебелото черво [14], в сравнение с нормалните тъкани. Наблюдавано е и ускоряване на пролиферацията на туморните клетки при някои видове рак на гърдата [15].

Прегледът на литературата показа, че биологичната активност, включително и антипролиферативната, на дизаместени синтетични аналози на Δ^1-пиролин-5-карбоксилна киселина не са изследвани.

Циклизацията на бифункционални съединения – аминоалдехиди и аминокетони [16], естери, съдържащи оксимен фрагмент [17], 5-оксоиминоестери [18], оксоестери, съдържащи нитрогрупа [19] и диполярно циклоприсъединяване [20,21] са синтетични методи, използвани за получаване на производни на 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилната киселина.

От своя страна, алдимините и кетимините на естерите и нитрила на глицина (шифови бази на О'Донел) са анионни синтони за синтеза на заместени Δ^1-пиролини посредством 1,4-присъединяване на α-иминоестери или α-иминонитрили към α,β-ненаситени естери или карбонилни съединения и следваща вътрешномолекулна циклизация [22-30].

2.1. Синтез на 3,5-диарил-2-((дифенилметилиден)амино)-5-оксопентаннитрили (3)

За получаване на индивидуалните диастереомери на защитени 2-амино-5-оксонитрили беше проведена реакция на [(дифенилметилиден)амино]ацетонитрил (ДФМАН) с енони, съдържащи различни ароматни или хетероароматни заместители при използване на 33% NaOH в среда от CH_3CN при 0°C (Схема 1).

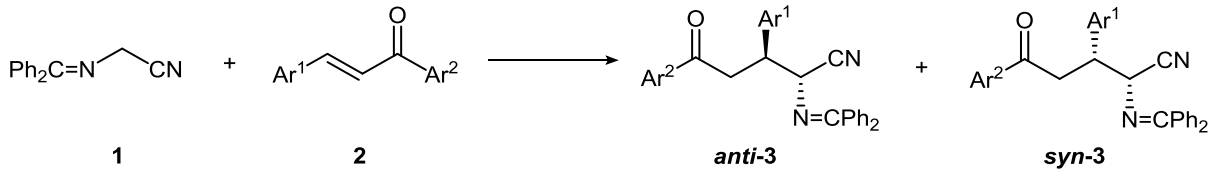


Схема 1. Синтез на *rel*-(*2R,3S*)-3,5-диарил-2-((дифенилметилиден)амино)-5-оксопентаннитрили (*anti*-**3**) и *rel*-(*2R,3R*)-3,5-диарил-2-((дифенилметилиден)амино)-5-оксопентаннитрили (*syn*-**3**), получени като рацемати: А) 33% NaOH, CH_3CN, 0°C или Б) 33% NaOH, ТЕВА, C_6H_6, 10 min, 25°C

В тези условия, реакцията на ДФМАН с бензилиденацетофенон протича с висок добив и с висока диастереоселективност (99:1), както е показано в предишни наши изследвания [27]. Както се вижда от представените в Таблица 1 данни, реакциите на изходния нитрил **1** с халконите **2а-и** протичат с добри до високи добиви. Присъединяването по Михаел се благоприятства от ененните, съдържащи силни електронакцепторни групи като нитрогрупа в ароматното ядро Ar^1 (**3г**) или пиридин-3-ил- (**3и**), вероятно поради стабилизиране на преходното състояние, водещо до продукта на 1,4-присъединяване. В тези случаи реакциите протичат за по-кратки реакционни времена, отколкото с халконите, съдържащи електронодонорни заместители в ароматното ядро Ar^1. Присъствието на електронодонорни заместители в ядрото Ar^1 води до повишаване на енергията на преходното състояние и до увеличаване на реакционното време. Реакцията на присъединяване към енона **2д**, съдържащ силно електронодонорната метокси група в ароматното ядро Ar^2, която се спряга с карбонилната група чрез резонансен ефект, води до увеличаване на енергията на преходното състояние на реакцията и до удължаване на реакционното време. Продуктът **3г**, съдържащ нитро група в ароматното ядро Ar^1, беше получен с висок добив, а продуктът, съдържащ силно електронодонорната диметиламиногрупа в позиция 4 в ядрото Ar^1 (**3в**) беше получен с добър добив. Трябва да отбележим, че реакциите протичат с висока диастереоселективност в случаите, в които

реакционните смеси кристализират (**3а**, **3б**, **3в**, **3д**, **3е**, **3з** и **3и**). Преобладаващият диастереоизомер на съединенията **3а**, **3б**, **3д**, и **3е** изолирахме като хроматографски еднороден продукт след разбъркване с CH_3OH, без да е необходимо допълнително пречистване, а съединенията **3в**, **3з** и **3и** – след прекристализация. В случаите, когато реакционните смеси не кристализират, диастереоселективността на реакциите е по-ниска, което беше потвърдено с ^{1}H ЯМР спектрите на суровите продукти. Оксонитрилите **3г** и **3ж** изолирахме като диастереомерни смеси след пречистване на суровите продукти с колонна хроматография. Предполагаме, че високата диастереоселективност на реакцията за по-голямата част от присъединителните продукти **3**, се дължи на асиметрично превръщане от втори род, както сме наблюдавали и в други случаи [31].

Таблица 1. Добиви и диастереомерни съотношения на 3,5-диарил-2-((дифенилметилиден)амино)-5-оксопентаннитрили (**3а-м**)

			Метод А[а]			Метод Б[б]	
3	**Ar^1**	**Ar^2**	**Реакц. време (мин)**	**Добив[в] (%)**	**Диаст. съотн.[г] *anti*/*syn***	**Добив[д] (%)**	**Диаст. съотн.[г] *anti*/*syn***
а	C_6H_5	C_6H_5	30	84[е]	99:1	92	40:60
б	p-$CH_3OC_6H_4$	C_6H_5	30	84	92:8	92	39:61
в	p-$(CH_3)_2NC_6H_4$	C_6H_5	30	75	88:12	-	-
г	p-$NO_2C_6H_4$	C_6H_5	10	94[д]	82:18	-	-
д	C_6H_5	p-$CH_3OC_6H_4$	60	87	93:7	89	44:56
е	p-ClC_6H_4	p-$CH_3OC_6H_4$	30	85	94:6	91	42:58
ж	p-FC_6H_4	3,4,5-$(CH_3O)_3C_6H_2$	240	87[д]	49:51	-	-
з	2-тиенил	C_6H_5	30	83	95:5	93	39:61
и	3-пиридил	C_6H_5	20	67	82:18	84	40:60
й	p-$CH_3C_6H_4$	C_6H_5	30	85[е]		91	44:56
к	p-ClC_6H_4	C_6H_5	30	85[е]		95	40:60
л	C_6H_5	p-$CH_3C_6H_4$	30	85[е]		85	53:47
м	C_6H_5	p-ClC_6H_4	30	89[е]		84	37:63

[а]Метод А (33% NaOH, CH_3CN, 0°C); [б]Метод Б (33% NaOH, TEBA, C_6H_6, 25°C, 10 мин); [в]Добив на индивидуален диастереомер (*anti*-изомер), получен след разбъркване с MeOH или прекристализация; [г]Диастереомерно съотношение на суровите продукти, определено с ^{1}H ЯМР; [д]Добив на диастереомерна смес след пречистване с колонна хроматография; [е]Получени в предишни наши изследвания [27]

На преобладаващите диастереоизомери на оксонитрилите **3** приписахме конфигурация *rel*-(2*R*,3*S*) (*anti*-**3**), въз основа на сравнение на техните ^{1}H ЯМР спектри с тези на получени по-рано в нашата лаборатория защитени 2-амино-5-оксонитрили [27]. Химичните отмествания за CH_2 протони за всички съединения са в интервала 3.65-3.77 и 3.71-3.78 ppm константите на спин-спиново взаимодействие между атомите H-4 и H-3 са съответно 4.8-5.5 Hz и 8.4-9.0 Hz.

Реакцията на присъединяване по Михаел на изходния нитрил **1** към някои от заместените халкони проведохме в условията на течно-течен междуфазов катализ (Метод Б). При използване на 33% NaOH като база, в присъствие на TEBA като междуфазов катализатор и в среда от бензен за кратко реакционно време (10 мин) реакциите протичат с висок добив и ниска диастереоселективност. Във всички случаи при тези условия не наблюдавахме кристализиране на реакционните смеси и оксонитрилите **3** получихме като диастереомерни смеси. След пречистване на суровите продукти посредством колонна хроматография, изолирахме с високи добиви продуктите на 1,4-присъединяване **3а**, **3б**, **3д**, **3е**, **3з-м** като смеси от диастереомери. Метиленовите протони CH_2 за всички съединения с *rel*-(2*R*,3*R*)-конфигурация (*syn*-изомери) са в интервалите 3.46-3.63 и 3.86-4.00 ppm константите на спин-спиново взаимодействие между H-4 и H-3 атомите са съответно 5.3-5.4 Hz и 8.1-8.4 Hz. Опитите ни да изолираме индивидуалните диастереомери на оксонитрилите **3** посредством колонна хроматография се оказаха неуспешни.

В хода на изследванията като електронодефицитни алкени използвахме съединения, съдържащи халогенен атом и метилова група в ароматното ядро Ar^1 и две метокси групи в позиции 2 и 4 и хидроксилна група в позиция 6 на ядрото Ar^2. В условията, в които реакцията за получаване на продукта **3а**, протича с висока диастереоселективност (33% NaOH, CH_3CN, 0°C), продуктът **3н** беше изолиран с нисък добив (23%) и беше наблюдавана ниска диастереоселективност (Схема 2). В суровата реакционна смес бяха регистрирани и много странични продукти (ТСХ и МС). За да намерим подходящи условия за получаване на **3н**, изследвахме влиянието на вида на базата, вида на разтворителя, температурата, а някои от реакциите проведохме и при ултразвуково облъчване.

Таблица 2 Добиви на оксонитрила **3н** в различни условия

№	Разтворител	База	Реакц. време (мин)	Темп. (°C)	Добив (%)[а]	Диаст. съотн.[б] *anti/syn*
1	CH_3CN	33% NaOH	375	0	23	48:52
2	CH_3CN	тв. NaOH	160	25	13	49:51
3	CH_3CN	11% LiOH	300	40	65	46:54
4	C_2H_5OH	тв. LiOH	180	40	59	43:57
5	C_2H_5OH	11% LiOH	210	40[в]	59	44:56
6	$C_6H_5CH_3$[г]	тв. LiOH	510	50[в]	65	49:51
7	CH_2Cl_2[д]	тв. LiOH	420	40[в]	66	55:45
8	CH_2Cl_2[д]	тв. CaO	125	40	88	44:56

[а]На диастереомерна смес след пречистване с колонна хроматография; [б]На суровите продукти, определено с ^{1}H ЯМР; [в]Ултразвуково облъчване; [г]В присъствие на ТЕВА; [д]В присъствие на Bu_4NHSO_4

Установено е, че LiOH е подходяща база за получаване на арилметилиден-ацетофенони, съдържащи OH-група в едно от ароматните ядра, както и тяхното превръщане във флаванони [32-34]. Показано е, че тези реакции на циклизация протичат с високи добиви, което се дължи на координационните свойства на литиевите йони. От данните, представени в Таблица 2, се вижда, че при провеждане на реакцията на нитрила **1** и халкона **2н** с LiOH като база (наситен разтвор или твърда) в среда от CH_3CN, CH_2Cl_2, етанол или толуен в присъствие на ТЕВА като междуфазов катализатор, продуктът **3н** беше получен с добри добиви като диастереомерна смес (1:1).

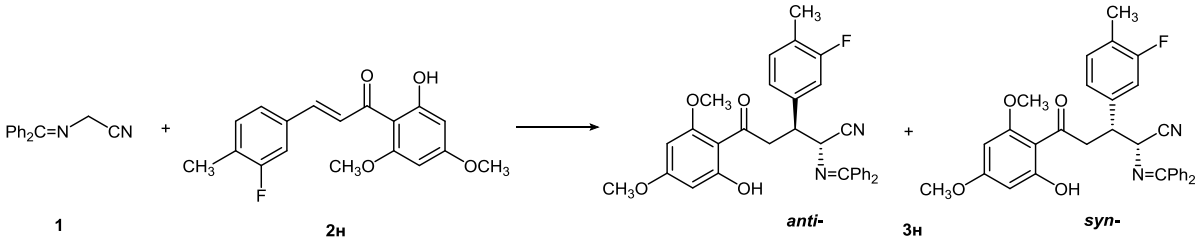
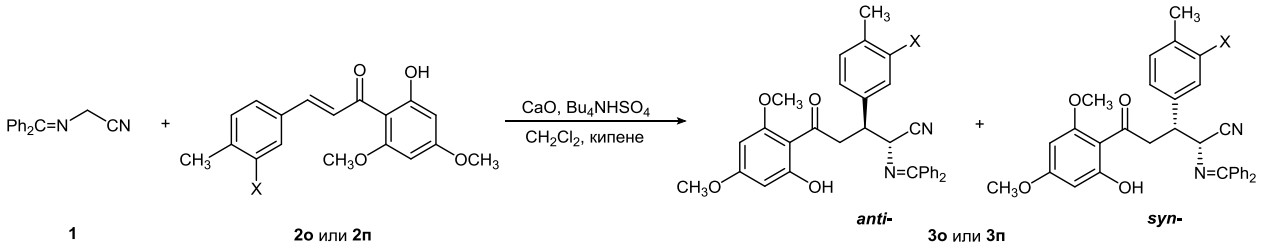


Схема 2. Синтез на *rel*-(*2R,3S*)-5-(2,4-диметокси-6-хидроксифенил)-2-((дифенилметилиден)амино)-3-(4-метил-3-флуорофенил)-5-оксопентаннитрил (*anti*-**3н**) и *rel*-(*2R,3R*)-5-(2,4-диметокси-6-хидроксифенил)-2-((дифенилметилиден)амино)-3-(4-метил-3-флуорофенил)-5-оксопентаннитрил (*syn*-**3н**), получени като рацемати

Установено е, че калциевите йони образуват по-стабилни комплекси с кислородни атоми в различни лиганди в сравнение с литиевите йони, което ни даде основание да използваме калциев оксид като база. В предишни изследвания се съобщава за успешното използване на CaO като база за синтез на арилметилиденацетофенони, съдържащи хидроксилни групи в ароматните ядра [35]. При провеждане на реакцията в условията на твърдо-течен междуфазов катализ с използване на твърд CaO като база, Bu_4NHSO_4 като междуфазов катализатор при кипене в сух CH_2Cl_2 получихме оксонитрила **3н** като смес от диастереомери в съотношение 1:1 (^{1}H ЯМР). След пречистване с колонна хроматография изолирахме продукта **3н** с висок добив (88%) като диастереомерна смес.

В избраните условия (тв. CaO, Bu_4NHSO_4, CH_2Cl_2, кипене) извършихме реакцията и с другите два халкона, съдържащи халогенните заместители хлор и бром в ароматното ядро Ar[1]. И в тези случаи реакциите протичат с ниска диастереоселективност (^{1}H ЯМР).



1 **2о** или **2п** **3о** или **3п**

X = Cl за **2о** и **3о**
X = Br за **2п** и **3п**

Схема 3 Синтез на *rel*-(*2R,3S*)-3,5-диарил-2-((дифенилметилиден)амино)-5-оксопентан-нитрили (*anti*-**3о**, *anti*-3**п**) и *rel*-(*2R,3R*)-3,5-диарил-2-((дифенилметилиден)амино)-5-оксопентаннитрили (*syn*-**3о**, *syn*-**3п**)

Таблица 3 Добиви и диастереомерни съотношения на 3,5-диарил-2-((дифенилметилиден)амино)-5-оксопентаннитрили (**3н-3п**)

Метод С[а]				
3	**X**	**Реакц. време (мин)**	**Диаст. съотн.[б]** ***anti/syn***	**Добив (%)[в]**
н	F	125	44:56	88
о	Cl	130	44:56	91
п	Br	335	45:55	90

[а]Метод С (CaO, Bu_4NHSO_4, CH_2Cl_2, кипене); [б]На суровите продукти, определено с ^{1}H ЯМР; [в]На диастереомерна смес след пречистване с колонна хроматография

След колоннохроматографско пречистване на суровите продукти, изолирахме продуктите **3о** и **3п** с високи добиви като диастереомерни смеси (Схема 3, Таблица 3). Високите добиви, с които получихме на **3н-п**, най-вероятно се дължат на формиране на комплекс между калциевите йони с карбонилния кислороден атом и с феноксидния кислороден атом от ароматното ядрото Ar^2.

2.2. Синтез на 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (4)

Като следващ етап, изследвахме реакцията на хидролитична циклизация на получените оксонитрили **3**. От литературата е известно, че свалянето на алкилиденовата [25,36] или дифенилметилиденовата [37,38] защита на аминогрупата се провежда в меки киселинни условия.

В нашата лаборатория е осъществена хидролитична циклизация на индивидуалния диастереомер на **3а** с 10% HCl в среда от диетилов етер/метанол за 5 часа при стайна температура, при която е получен пиролинкарбонитрилът **4а** с добър добив [27]. Хидролитичната циклизация на някои Михаелови адукти (**3б**, **3д** и **3ж**) в тези условия протече за доста по-дълго реакционно време (24-32 часа), поради което проведохме реакциите с по-концентрирана (20% HCl, Метод А) (Схема 4).

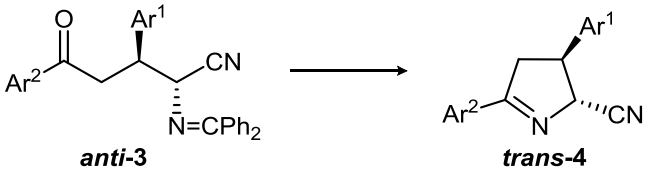
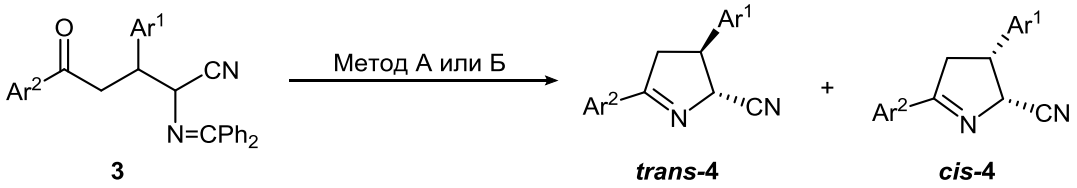


Схема 4. Синтез на *rel*-(2*R*,3*S*)-3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (*trans*-**4**), получени като рацемати: 1. 20% HCl, $(C_2H_5)_2O$, CH_3OH, 25°C, 2. NH_3, CH_2Cl_2

Реакциите протичат за различни реакционни времена – от 30 min за **3в** до 540 мин за **3з** и 24 часа за **3ж**. От оксонитрилите **3** с *anti*-конфигурация получихме съответните 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (**4**) като индивидуални диастереомери, на които приписахме *trans*-конфигурация.

В описаните условия осъществихме циклизация на диастереомерните смеси на някои заместени оксонитрили.



3 ***trans*-4** ***cis*-4**

Схема 5. Синтез на *rel*-(2*R*,3*S*)-3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (*trans*-**4**) и *rel*-(2*R*,3*R*)-3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (*cis*-**4**), получени като рацемати: Метод А (1. 20% HCl, $(C_2H_5)_2O$, CH_3OH, 25°C, 2. NH_3, CH_2Cl_2); Метод Б (1. CH_3COOH, H_2O, 25°C, 2. NH_3, CH_2Cl_2)

След пречистване с колонна хроматография изолирахме индивидуалните диастереомери на *trans*-**4а-в**, *trans*-**4д-п**, *cis*-**4а,** *cis*-**4б**, *cis*-**4д-п** с добри до високи добиви, а съединение **4г** изолирахме като диастереомерна смес (Таблица 4).

Таблица 4 Добиви и диастереомерни съотношения на 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (**4**)

			Метод[а]		**Метод Б**[б]	
4	**Ar[1]**	**Ar[2]**	**Реакц. време (мин)**	**Добив**[в] **(%)**	**Реакц. време (мин)**	**Добив**[г] **(%)** ***trans, cis***
а	C_6H_5	C_6H_5	120	96	150	39, 46
б	p-$CH_3OC_6H_4$	C_6H_5	180	91	150	30, 43
в	p-$(CH_3)_2NC_6H_4$	C_6H_5	30	75	-	-
г	p-$NO_2C_6H_4$	C_6H_5	210	86[д]	-	-
д	C_6H_5	p-$CH_3OC_6H_4$	300	78	180	41, 49
е	p-ClC_6H_4	p-$CH_3OC_6H_4$	300	92	360	38, 49
ж	p-FC_6H_4	3,4,5-$(CH_3O)_3C_6H_2$	24 ч	28, 38[г]	360	51, 41
з	2-тиенил	C_6H_5	540	68	180	39, 30
и	3-пиридил	C_6H_5	210	86	400	51, 30
й	p-$CH_3C_6H_4$	C_6H_5	-	-	270	36, 43
к	p-ClC_6H_4	C_6H_5	-	-	180	45, 43
л	C_6H_5	p-$CH_3C_6H_4$	-	-	180	50, 36
м	C_6H_5	p-ClC_6H_4	-	-	205	34, 51
н	3-F-4-$CH_3C_6H_3$	2,4-$(CH_3O)_2$-6-$(OH)C_6H_2$	120	37, 55[г]	-	-
о	3-Cl-4-$CH_3C_6H_3$	2,4-$(CH_3O)_2$-6-$(OH)C_6H_2$	120	45, 51[г]	-	-
п	3-Br-4-$CH_3C_6H_3$	2,4-$(CH_3O)_2$-6-$(OH)C_6H_2$	120	35, 51[г]	-	-

[а]Метод А (1. 20% HCl, $(C_2H_5)_2O$, CH_3OH, 25°C, 2. NH_3, CH_2Cl_2); [б]Метод Б (1. CH_3COOH, H_2O, 25°C, 2. NH_3, CH_2Cl_2); [в]Добив на *trans*-изомер, изолиран след пречистване с колонна хроматография; [г]Добив на *trans*- и *cis*-диастереомери, изолирани като индивидуални диастереомери след пречистване с колонна хроматография; [д]Добив на диастереомерна смес след пречистване с колонна хроматография

Анализът на ^{1}H ЯМР спектри на суровите реакционни продукти показа, че в условията на циклизация реакциите протичат без епимеризация. Това твърдение съвпада с резултатите от предишни наши изследвания [27] и е в съответствие с изледванията на други автори [24]. В някои случаи изолирането на продуктите **4** беше затруднено поради високата им разтворимост както в органичния, така и във водния слой. Ето защо, осъществихме циклизацията на някои диастереомерни смеси на оксонитрилите **3** в слабо кисела среда, като използвахме CH_3COOH (Метод Б). Реакциите на циклизация протичат без епимеризация (^{1}H ЯМР). След колоннохроматографско пречистване, изолирахме като индивидуални диастереомери *trans*-**4** и *cis*-**4** с добри до високи добиви (Схема 5, Таблица 4). Приписването на относителната конфигурация на съединенията *trans*-**4** е разгледано в раздел 2.8.2.

2.3. Взаимодействие на 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (4) с HCl/диоксан/MeOH

Реакцията на Pinner е директен път за превръщане на нитрили в естери [39-42]. Изследвахме превръщането на нитрилите **4** в естери. Доколкото ни е известно, в литературата не е описано използването на тази реакция за превръщане на 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили в техни естери. Изходните карбонитрили **4** подложихме на метанолиза с използване на 4 М разтвор на хлороводород/диоксан в среда от абсолютен метанол при стайна температура (Схема 6, Таблица 5).

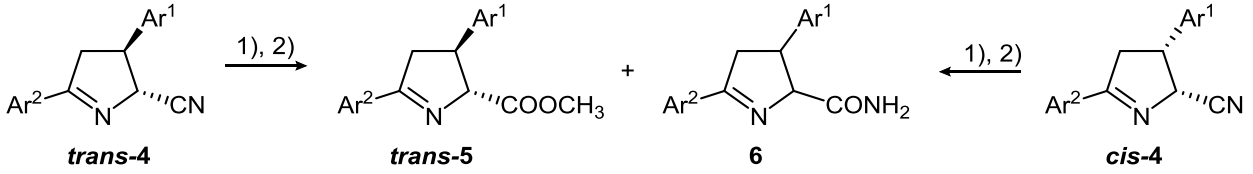


Схема 6 Синтез на метил-*rel*-(2*R*,3*S*)-3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилати (*trans*-**5**), получени като рацемати: 1) 4M HCl/диоксан/CH_3OH; 2) H_2O, $NaHCO_3$

Метанолизата на карбонитрилите *trans*-**4а-з** и *trans*-**4й-н**, проведохме за различни реакционни времена (120-420 мин) с излишък от хлороводород/диоксан в среда от абсолютен метанол при стайна температура и последваща обработка във водна среда. Във всички случаи бяха получени естерите **5** с *trans*-конфигурация, която беше потвърдена с техните ^{1}H ЯМР спектри. В суровите реакционни продукти бяха регистрирани и *cis*- и

trans-изомерите на съответните амиди **6**. След колоннохроматографско пречистване изолирахме метиловите естери *trans*-**5а-з** и *trans*-**5й-н** с добри добиви. При метанолиза на *trans*-**4й**, успяхме да изолираме освен естера *trans*-**5й** и амида **6й** като смес от диастереомери.

Таблица 5. Добиви на метил-3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилати *trans*-**5а-з**, *trans*-**5й-н** и на амида **6н**

5	**Ar[1]**	**Ar[2]**	**Реакц. време (мин)**	**Добив[а] (%)**
а	C_6H_5	C_6H_5	300	59
			24 ч	64[б]
б	p-$CH_3OC_6H_4$	C_6H_5	270	68
в	p-$(CH_3)_2NC_6H_4$	C_6H_5	150	73
г	p-$NO_2C_6H_4$	C_6H_5	150	39[в]
д	C_6H_5	p-$CH_3OC_6H_4$	270	80
е	p-ClC_6H_4	p-$CH_3OC_6H_4$	240	71
ж	p-FC_6H_4	3,4,5-$(CH_3O)_3C_6H_2$	170	-
			27 ч	53[б]
з	2-тиенил	C_6H_5	120	72
й	p-$CH_3C_6H_4$	C_6H_5	240	64
к	p-ClC_6H_4	C_6H_5	240	63
л	C_6H_5	p-$CH_3C_6H_4$	420	64
м	C_6H_5	p-ClC_6H_4	240	62
н	3-F-4-$CH_3C_6H_3$	2,4-$(CH_3O)_2$-6-$(OH)C_6H_2$	120	68
6н	3-F-4-$CH_3C_6H_3$	2,4-$(CH_3O)_2$-6-$(OH)C_6H_2$	27 ч	56[г]

[а]Добив на *trans*-**5**, получен при метанолиза на *trans*-**4** и изолиран след колонна хроматография; [б]Добив на *trans*-**5**, получен при метанолиза на *cis*-**4**, след пречистване с колонна хроматография; [в]Добив на *trans*-**5**, получен при метанолиза на *trans*-**4** (диастереомерна смес, диаст. съотн. = 78:22), след пречистване с колонна хроматография; [г]Добив на *cis*-**6н**, получен при метанолиза на *cis*-**4н**, след пречистване с колонна хроматография

В описаните условия метанолизата на нитрилите *cis*-**4а** и *cis*-**4ж** протича с епимеризация и значително реакционно време. Естерите *trans*-**4а** и *trans*-**4ж** са изолирани с добри добиви след колоннохроматографско пречистване. В описаните условия метанолизата на нитрила *cis*-**4н** протече за дълго реакционно време, като изолирахме амида *cis*-**6н** с добър добив след пречистване с колонна хроматография.

Приписването на относителната конфигурация на съединенията *trans*-**5** е разгледано в раздел 2.8.3.

2.4. Синтез на 3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (7)

В литературата са описани няколко метода за редукция на заместени Δ^1-пиролинкарбонитрили, като някои от авторите съобщават и за протичане на процеси на децианиране [24,43-45].

За да намерим условия за редукция на азометиновата връзка в синтезираните от нас 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (**4**), използвахме различни редуциращи агенти, специфични за редукция на имини – $Zn/HCOONH_4$, $Mg/NH_4Cl/CH_3OH$ или комплексни метални хидриди ($(CH_3)_4NBH(OAc)_3$), $NaBH_3CN$, $NaBH_4$ [24,45-48].

Таблица 6 Опити за редукция на *trans*-**4а** в различни условия

Редуктор	**Еквиваленти**	**Разтворител**	**Продължи-телност**	**Темп. (°C)**	**Добив (%)[а]**
$Zn/HCOONH_4$	11/7	CH_3OH	18 ч	50	-
Mg/NH_4Cl	20/5	абс. CH_3OH	120 мин	25	-
$(CH_3)_4NBH(OAc)_3$	2.5	абс. CH_3OH	72 ч	25	-
$(CH_3)_4NBH(OAc)_3$	2.5	THF	72 ч	кипене	-
$NaBH_3CN$	3	абс. C_2H_5OH	2 ч	25	18
$NaBH_4$[б]	2	абс. CH_3OH	72 ч	25	(< 5%)
$NaBH_4$	1	CH_3COOH	8 мин	25	70

[а]Добив на индивидуален диастереомер след пречистване с колонна хроматография; [б]В присъствие на CH_3COOH

Предварителните изследвания, проведени с пиролина *trans*-**4а**, показаха, че при използването на излишък от Mg или Zn в присъствие на NH_4Cl получихме сложни реакционни смеси, от които не успяхме да изолираме индивидуален продукт. Използването на $(CH_3)_4NBH(OAc)_3$ в среда от абс. CH_3OH при стайна темп. или при кипене в THF не доведе до получаване на редуциран продукт и при голяма продължителност на реакциите (72 часа). Известно е, че $NaBH_3CN$ и $NaBH_4$ са редуктори за имини [24,43] като реакциите обикновено се извършват с излишък от редуциращия агент, в присъствие на оцетна киселина в среда от етанол или метанол. При използване на трикратен молен излишък на $NaBH_3CN$ в абсолютен етанол при стайна температура и продължителност на реакцията 2 часа, изолирахме пиролидинкарбонитрила **7** като индивидуален диастереомер с нисък добив (18%). При опит за редукция на карбонитрила *trans*-**4а** с два молни еквивалента от $NaBH_4$ и излишък от CH_3COOH в среда от метанол, получихме сложна

реакционна смес, от която изолирахме само следи от пиролидинкарбонитрила **7**. Установихме, че при използване на един молен еквивалент от $NaBH_4$, в среда от оцетна киселина редукцията на нитрила *trans*-**4а** протича с висок добив и висока диастереоселективност (Схема 7, Таблица 6).

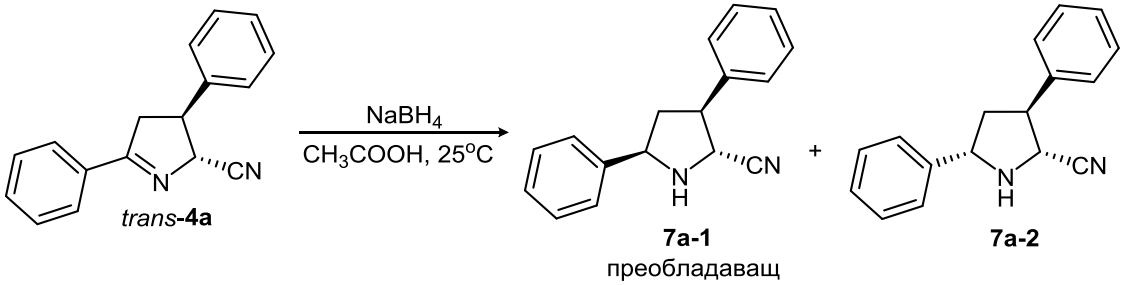


Схема 7 Синтез на *rel*-(2*R*, 3*S*, 5*R*)-3,5-дифенилпиролидин-2-карбонитрил (**7а-1**), получен като рацемат

Полученият суров маслообразен реакционен продукт пречистихме с колонна хроматография. Относителната конфигурация на преобладаващия диастереомер на пиролидин-2-карбонитрила **7а** приписахме след изолирането му като индивидуален диастереомер посредством двумерни ЯМР техники (раздел 2.8.4.).

В описаните условия осъществихме редукциите и на *trans*-изомерите на нитрилите *trans*-**4б-м** (Схема 8). Реакциите протичат за кратки реакционни времена (от 4 до 15 мин) с висока диастереоселективност (^{1}H ЯМР).

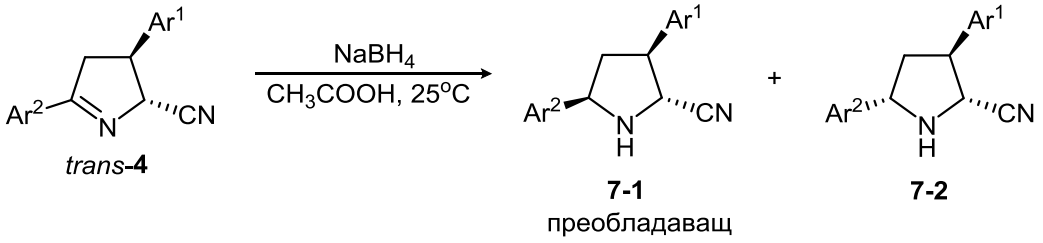


Схема 8 Синтез на *rel*-(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (**7-1**) и *rel*-(2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (**7-2**), получени като рацемати

Преобладаващите диастереомери **7-1** изолирахме с добри добиви след пречистване с колонна хроматография (Таблица 7). Във всички случаи поради близките R_f стойности на диастереомерите, изомерите които се получават в по-малко количество (**7-2**), не могат да бъдат изолирани.

Таблица 7 Добиви и диастереомерни съотношения на 3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (**7**)

7	**Ar^1**	**Ar^2**	**Реакц. време (мин)**	**Диаст. съотн.[а] 7-1/7-2**	**Добив 7-1 и 7-2 (%)[б]**	**Добив 7-1 (%)[в]**
а	C_6H_5	C_6H_5	8	89:11	88	70
б	p-$CH_3OC_6H_4$	C_6H_5	8	-	87	72
д	C_6H_5	p-$CH_3OC_6H_4$	15	88:12	76	63
е	p-$ClOC_6H_4$	p-$CH_3OC_6H_4$	15	-	80	66
ж	p-FC_6H_4	3,4,5-$(CH_3O)_3C_6H_2$	10	-	82	74
з	2-тиенил	C_6H_5	8	-	75	65
л	Ph	p-$CH_3C_6H_4$	12	88:12	83	75
м	Ph	p-ClC_6H_4	4	89:11	71	65

[а]На суровите продукти (^{1}H ЯМР); [б]Добив на диастереомерна смес след пречистване с колонна хроматография; [в]На преобладаващ диастереомер, изолиран след пречистване с колонна хроматография

Относителната конфигурация на всички изолирани преобладаващи изомери **7а-м** е приписана въз основа на сходството в ^{1}H ЯМР спектрите (химични отмествания и константи на спин-спиново взаимодействие) на преобладаващите диастереомери.

Пиролидинкарбонитрилите **7-1** лесно се окисляват, поради което ги превърнахме в *p*-толуенсулфонати.

2.5. Синтез на 3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (8)

Като следващ етап в нашите изследвания изучихме редукцията на *cis*-изомерите на 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрилите (**4**) (Схема 9, Таблица 8).

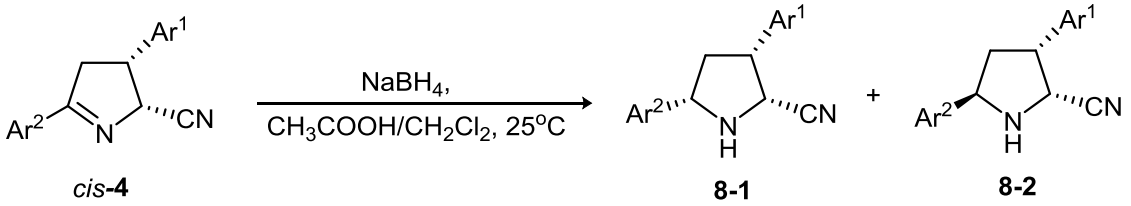


Схема 9 Синтез на *rel*-(2*R*,3*R*,5*S*)-3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (**8-1**) и *rel*-(2*R*,3*R*,5*R*)-3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (**8-2**), получени като рацемати

Провеждането на редукцията на някои от нитрилите *cis*-**4**, в условията, в които редуцирахме *trans*-изомерите, доведе до получаване на сложни реакционни смеси, от които беше трудно изолирането на пиролидинкарбонитрилите. Ето защо, реакциите на редукция проведохме при използване на еквимоларно количество $NaBH_4$ в среда от оцетна киселина и дихлорометан. В тези случаи редукциите протичат с висока диастереоселективност (^{1}H ЯМР). Суровите реакционни продукти **8** превърнахме в *p*-толуенсулфонати поради трудности в колоннохроматографското им пречистване (Таблица 8).

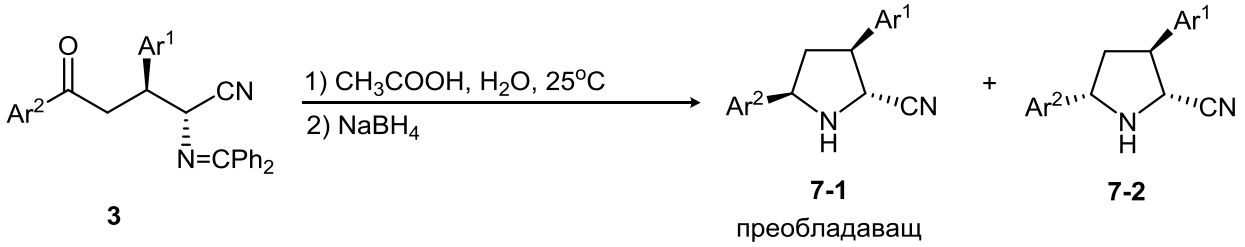
Таблица 8 Добиви и диастереомерни съотношения на 3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (**8**)

8	**Ar^1**	**Ar^2**	**Реакц. време (мин)**	**Диаст. съотн.[а] 8-1/8-2**	**Добив 8-1 (%)[б]**
а	C_6H_5	C_6H_5	8	98:2	78
б	p-$CH_3OC_6H_4$	C_6H_5	8	98:2	88
д	C_6H_5	p-$CH_3OC_6H_4$	15	96:4	83
ж	p-FC_6H_4	3,4,5-$(CH_3O)_3C_6H_2$	10	97:3	83
з	2-тиенил	C_6H_5	8	97:3	85
л	C_6H_5	p-$CH_3C_6H_4$	12	97:3	82
м	C_6H_5	p-ClC_6H_4	4	97:3	77

[а]На суровите продукти, определено с ^{1}H ЯМР; [б]На *p*-толуенсулфонат

Приписването на относителната конфигурация на съединения **8** е описано в раздел 2.8.5.

За намаляване на броя на процедурите по пречистване и изолиране на пиролидин-2-карбонитрилите и съкращаване времето за синтез, *anti*-изомерите на оксонитрилите (**3а**, **3б**, **3д** и **3е)** подложихме на хидролитична циклизация и следваща редукция с $NaBH_4$ (2 екв.) в среда от оцетна киселина (one-pot синтез) (Схема 10).



3 **7-1** преобладаващ **7-2**

Схема 10 One-pot синтез на *rel*-(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (**7-1**) и *rel*-(2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (**7-2**), получени като рацемати

В описаните условия изолирахме преобладаващите диастереомери **7-1** с добри добиви след пречистване на суровите продукти с колонна хроматография (Таблица 9). В таблицата са представени и общите добиви на всяка двойка диастереомери след пречистване с колонна хроматография.

Таблица 9 Добиви и диастереомерни съотношения на 3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили (**7**) от one-pot синтез

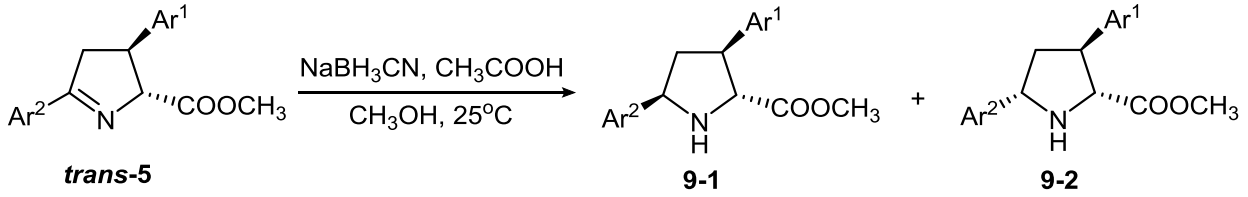
7	**Ar^1**	**Ar^2**	**Реакц. време[а] (мин)**	**Реакц. време[б] (мин)**	**Диаст. съотн.[в] 7-1/7-2**	**Добив 7-1 и 7-2 (%)[г]**	**Добив 7-1 (%)[д]**
а	C_6H_5	C_6H_5	140	15	90:10	84	72
б	p-$CH_3OC_6H_4$	C_6H_5	300	15	90:10	84	74
д	C_6H_5	p-$CH_3OC_6H_4$	360	25	88:12	71	59
е	p-ClC_6H_4	p-$CH_3OC_6H_4$	600	25	87:13	68	55

[а]За хидролитична циклизация; [б]За редукция; [в]На суровите продукти (^{1}H ЯМР); [г]Добив на диастереомерна смес след пречистване с колонна хроматография; [д]На преобладаващ диастереомер, изолиран след пречистване с колонна хроматография

Въз основа на проведените експерименти, можем да заключим, че използваните метали като Zn и Mg, са неподходящи като редуктори за съединения, съдържащи Δ^1-пиролинов пръстен. Метанолът често се използва като разтворител при редукция на различни съединения с борохидриди. При изследваните пиролинкарбонитрили добивът на редуциран продукт е по-нисък от 5%. За успешната редукция е необходимо присъствието на протонна или Люисова киселина за активиране на азометиновата връзка в изходните нитрили **4**.

2.6. Синтез на метил-3,5-диарилпиролидин-2-карбоксилати (9)

От литературата е известно, че $NaBH_3CN$ е успешно използван за редукция на циклични имини [45]. Както беше описано в раздел 2.4., редукцията на Δ^1-пиролинкарбонитрилите **4** протича с ниски добиви при използването на този редуциращ агент. В присъствие на оцетна киселина се наблюдава увеличаване на добива и съкращаване на реакционното време. Ето защо редукцията на цикличната иминогрупа в метил-*rel*-(2*R*,3*S*)-3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилати (*trans*-**5**) проведохме при използване на $NaBH_3CN$ в среда от метанол и в присъствие на оцетна киселина. (Схема 11, Таблица 10).



***trans*-5** **9-1** **9-2**

Схема 11 Синтез на метил-*rel*-(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-диарилпиролидин-2-карбоксилати (**9-1**) и метил-*rel*-(2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-диарилпиролидин-2-карбоксилати (**9-2**), получени като рацемати

В описаните условия редукцията на естера *trans*-**5а** протече с относително висока диастереоселективност. След пречистване с колонна хроматография изолирахме преобладаващия диастереомер на пиролидиновия естер **9а-1** с добър добив. На естера **9а-1** приписахме относителна конфигурация *rel*-(2*R*,3*S*,5*R*) посредством използване на двумерни ЯМР техники (раздел 2.8.6.).

В избраните условия ($NaBH_3CN$, CH_3COOH, абс. MeOH) осъществихме редукция и на някои други заместени естери – *trans*-**5б**, *trans*-**5д**, *trans*-**5е**, *trans*-**5й-м.** Анализът на суровите реакционни смеси посредством ^{1}H ЯМР показа, че реакциите на редукция

протичат с относително висока диастереоселективност (Таблица 10). Получените продукти пречистихме посредством колонна хроматография, при което изолирахме с добри добиви преобладаващите диастереомери на синтетичните аналози на пролина – естери на 3,5-дизаместените пиролидин-2-карбоксилните киселини **9-1**.

Таблица 10 Добиви и диастереомерни съотношения на метил-3,5-диарил-пиролидин-2-карбоксилати (**9**)

9	**Ar[1]**	**Ar[2]**	**Реакц. време (мин)**	**Диаст. съотн.[а] 9-1/9-2**	**Добив 9-1 и 9-2 (%)[б]**	**Добив 9-1 (%)[в]**
а	C_6H_5	C_6H_5	300	87:13	78	68
			8[г]	86:14	74	64
б	4-$CH_3OC_6H_4$	C_6H_5	360	90:10	80	70
д	C_6H_5	4-$CH_3OC_6H_4$	450	88:12	71	68
е	4-ClC_6H_4	4-$CH_3OC_6H_4$	480	91:9	77	63
й	4-$CH_3C_6H_4$	C_6H_5	240	83:17	85	64
к	4-ClC_6H_4	C_6H_5	420	84:16	66	58
л	C_6H_5	4-$CH_3C_6H_4$	300	85:15	86	78
м	C_6H_5	p-ClC_6H_4	420	85:15	80	27

[а]На суровите продукти (^{1}H ЯМР); [б]Добив на диастереомерна смес след пречистване с колонна хроматография; [в]Добив на преобладаващ диастереомер, изолиран след пречистване с колонна хроматография; [г]Редукция с $NaBH_4$ (1 екв.), CH_3COOH, 25°C

Естерът *trans*-**5а** подложихме и на редукция с използване на $NaBH_4$ в среда от оцетна киселина при стайна температура. В този случай реакцията протече със висока диастереоселективност и за по-кратко реакционно време. След колоннохроматографско пречистване изолирахме естера **9а-1** с добър добив (64%).

Относителната конфигурация на естерите **9-1** приписахме посредством използване на двумерни ЯМР техники (раздел 2.8.6.)

2.7. Синтез на *rel*-(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилна киселина (10а)

С цел получаване на синтетичния аналог на пролина - 3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилната киселина осъществихме осапунване на естера **9а-1** под действие на еквимоларно количество 1М водна NaOH в среда от CH_3OH при 0°С за 6 часа (Схема 11).

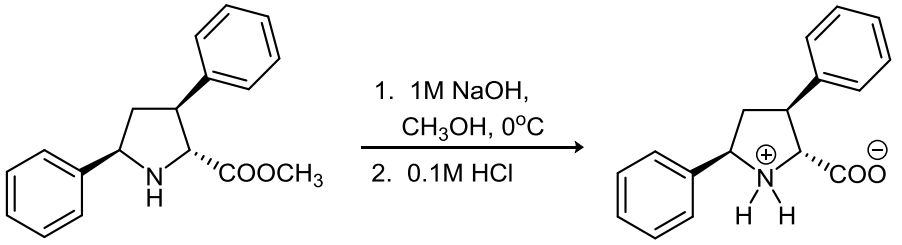


Схема 12 Синтез на *rel*-(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилна киселина (**10а**), получена като рацемат

Установихме, че в избраните от нас условия реакцията протича без епимеризация. 3,5-Дифенилпиролидин-2-карбоксилната киселина (**10а**) изолирахме като цвитерион с добър добив (72%) след добавяне на разредена солна киселина.

Относителната конфигурация на киселината **10а** приписахме посредством използване на двумерни ЯМР техники (раздел 2.8.7.).

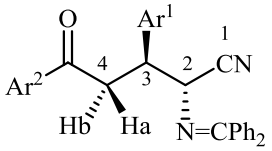
2.8. Структурно охарактеризиране

3,5-Диарил-2-((дифенилметилиден)амино)-5-оксопентаннитрилите (**3**), 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрилите (**4**), метил-3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилатите (**5**), карбоксамидите **6й** и **6н**, 3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрилите (**7**) и (**8**), метил-3,5-диарилпиролидин-2-карбоксилатите (**9**) и 3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилната киселина (**10а**) са охарактеризирани с ИЧ, ^{1}H, ^{13}C ЯМР. Относителната конфигурация на съединения *trans*-**4о**, *trans*-**5м**, **7а-1**, **7а-2**, **8д-1**, **9а-1** и **10а** е приписана при анализ на техните NOESY спектри. Получените съединения са охарактеризирани и с мас-спектрометрия с висока разделителна способност при електроспрей йонизация в положителен режим (HRMS ESI(+)). Грешката на регистрираните отношения m/z на първичните продуктови йони $[M+H]^+$ е по-малка от 5 ppm. Друга цел за използване на HRMS е да се изследва типът на фрагментация на тези съединения посредством

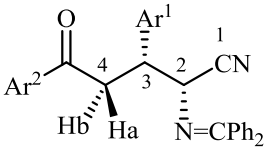
ESI-MS/MS в позитивен режим. Използването на MS/MS позволява структурното определяне на междинните продуктови йони по пътя на фрагментацията. Дори когато точната структура на дадени междинни продуктови йони не е известна, е възможно да се получи важна информация за молекулната структура и начина на свързване на атомите в изследваното съединение. С помощта на тази техника може да се извърши в редица случаи и диференциране на изомери. Така, на базата на получените от нас данни от MS/MS на синтезираните вещества, могат да се докажат структурите на подобни съединения.

2.8.1. Структурно охарактеризиране на оксонитрили 3

Както вече беше споменато, на оксонитрилите *anti*-**3** приписахме относителна конфигурация *rel*-(2*R*,3*S*), въз основа на сравнение на техните ^{1}H ЯМР спектри с тези на получени по-рано в нашата лаборатория оксонитрили [27]. За всички *anti*-стереоизомери химичните отмествания за протоните от метиленовата група са в интервала 3.65-3.77 ppm (за Н4а) и 3.71-3.78 ppm (за Н4б), а вициналните константи $J_{H3\text{-}H4a}$ и $J_{H3\text{-}H4б}$ са съответно 4.8-5.5 Hz и 8.4-9.0 Hz. От ^{1}H ЯМР спектри на диастереомерните смеси определихме, че всички *syn*-изомери имат химични отмествания за протоните от метиленовата група в интервала 3.46-3.63 ppm (за Н4а) и 3.86-4.00 ppm (за Н4б), и вицинални константи $J_{H3\text{-}H4a}$ и $J_{H3\text{-}H4б}$ съответно 8.1-8.4 Hz и 5.3-5.4 Hz.



***anti*-3**



***syn*-3**

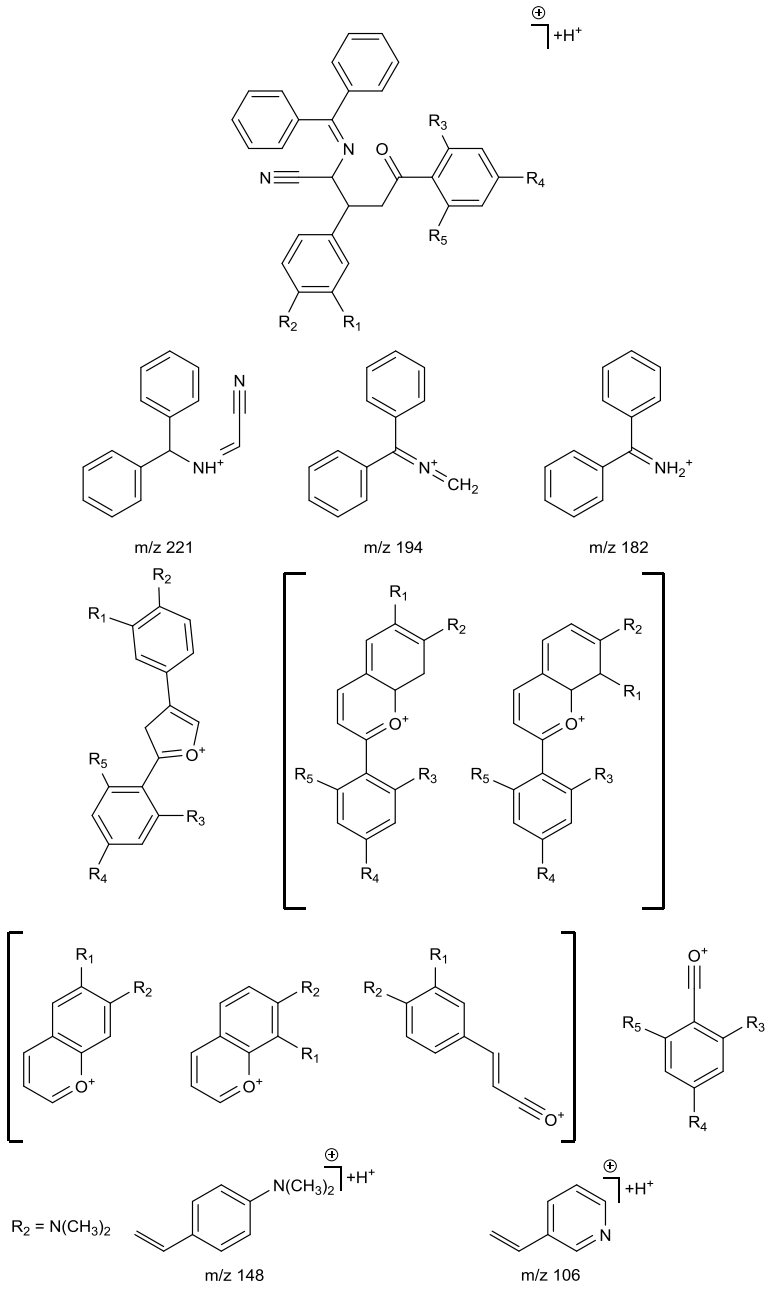
CH$_2$ 3.65-3.77; 3.71-3.78 ppm	**CH$_2$** 3.46-3.63; 3.86-4.00 ppm
$J_{H4\text{-}H3}$ 4.8-5.5 Hz; 8.4-9.0 Hz	$J_{H4\text{-}H3}$ 5.3-5.4 Hz; 8.1-8.4 Hz

Фигура1 Избрани ^{1}H ЯМР спектрални данни на оксонитрилите **3**

Сходството в ^{1}H ЯМР спектри на изолираните преобладаващи изомери на съединенията **3** (получени по метод А) ни даде основание да им припишем *anti*-конфигурация, а на другите диастереомери – *syn*-конфигурация.

Мас-спектрален анализ

Анализът на MS/MS спектрите на съединенията **3а-3п** показа, че с изключение на **3и**, най-интензивните пикове на фрагментните йони в спектрите са при m/z 221, както и съответните ацилоксониеви йони (Ar^2-C≡O^+), които са базов пик. Йоните при m/z 221 се получават при разкъсване на връзката C2-C3, а ацилоксониевите йони се генерират при разкъсвате на връзката C4-C5(=O).



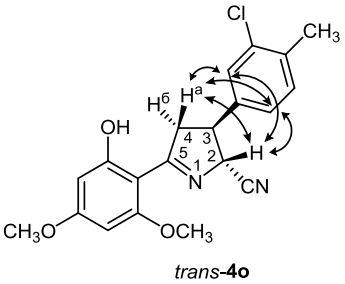
Фигура 2 Предполагаеми структури на фрагментните йони, наблюдавани в MS/MS спектрите на съединения **3а-3п**

От получените резултати може да се заключи, че природата на заместителите в ароматните ядра (с изключение на **3и** и в определена степен **3в**) нямат съществен ефект върху фрагментацията на първичните продуктови йони. Това вероятно се дължи на факта, че се протонира азотният атом от имино групата, като този катион може да се стабилизира резонансно с един от бензеновите пръстени. В структурата на съединение **3в**, в положение 4 на Ar^1 като заместител има N,N-(диметиламино) група. Този азотен атом също се протонира и в MS/MS спектъра се наблюдава пик със средна интензивност при m/z 148, получен вследствие на β-елиминиране при връзката C3-C4, за сметка на ниско интензивен пик при m/z 221. В MS/MS спектъра на съединение **3и** (Ar^2 = C_5H_4N), се наблюдава практически само един пик при m/z 106, получен също при β-елиминиране при връзката C3-C4. Този факт ни дава основание да твърдим, че в газовата фаза се протонира практически само азотният атом от пиридиновия цикъл, като в този катион при отсъствие на солватация, положителният заряд се делокализира по пиридиновия пръстен, поради което йонът има най-ниска енергия.

2.8.2. Структурно охарактеризиране на 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (4)

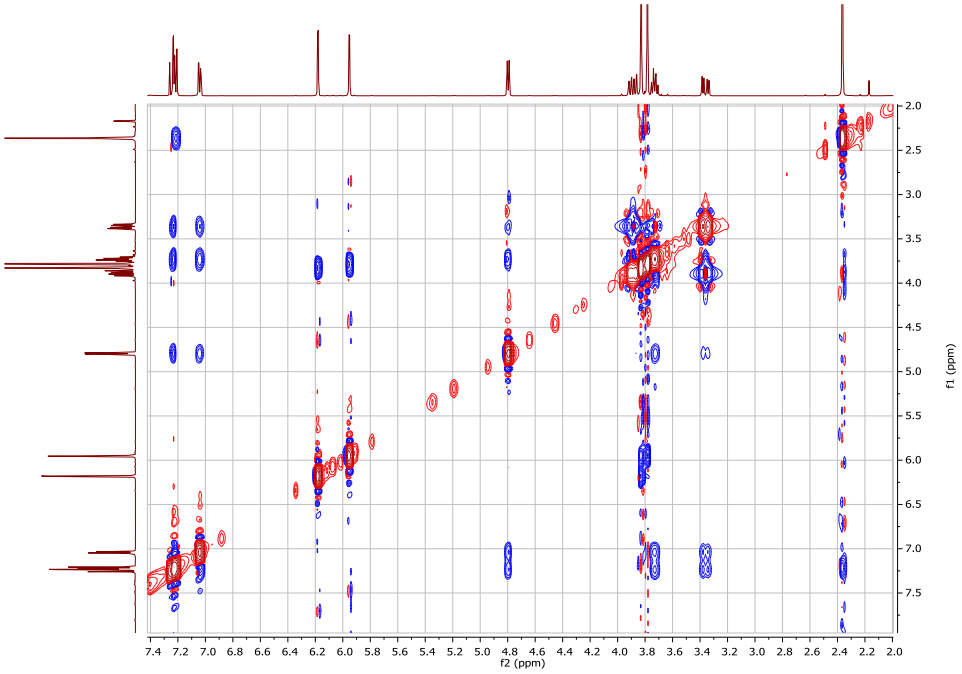
Относителна конфигурация на 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрилите (*trans*-4)

В предишни изследвания е установено, че дифенилзаместеният нитрил *trans*-**4а**, получен при хидролитична циклизация на *anti*-изомера на оксонитрила **3а**, има *trans*-конфигурация [27]. Относителната конфигурация на съединение *trans*-**4о** приписахме чрез използване на двумерни ЯМР техники. Анализът на NOESY спектъра на съединение *trans*-**4о** показа, че се наблюдава ядрен ефект на Оверхаузер между *орто*-протоните на бензеновото ядро при третия въглероден атом с протоните при втория и четвъртия въглероден атом H-4a, както и между протоните при втория и четвъртия въглероден атом H-4a, което показва че ароматното ядро при C-3 е *trans*-разположено спрямо цианогрупата при C-2 (Фигура 3).



trans-**4о**

Фигура 3



Фигура 4 NOESY спектър на 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрила *trans*-**4о**

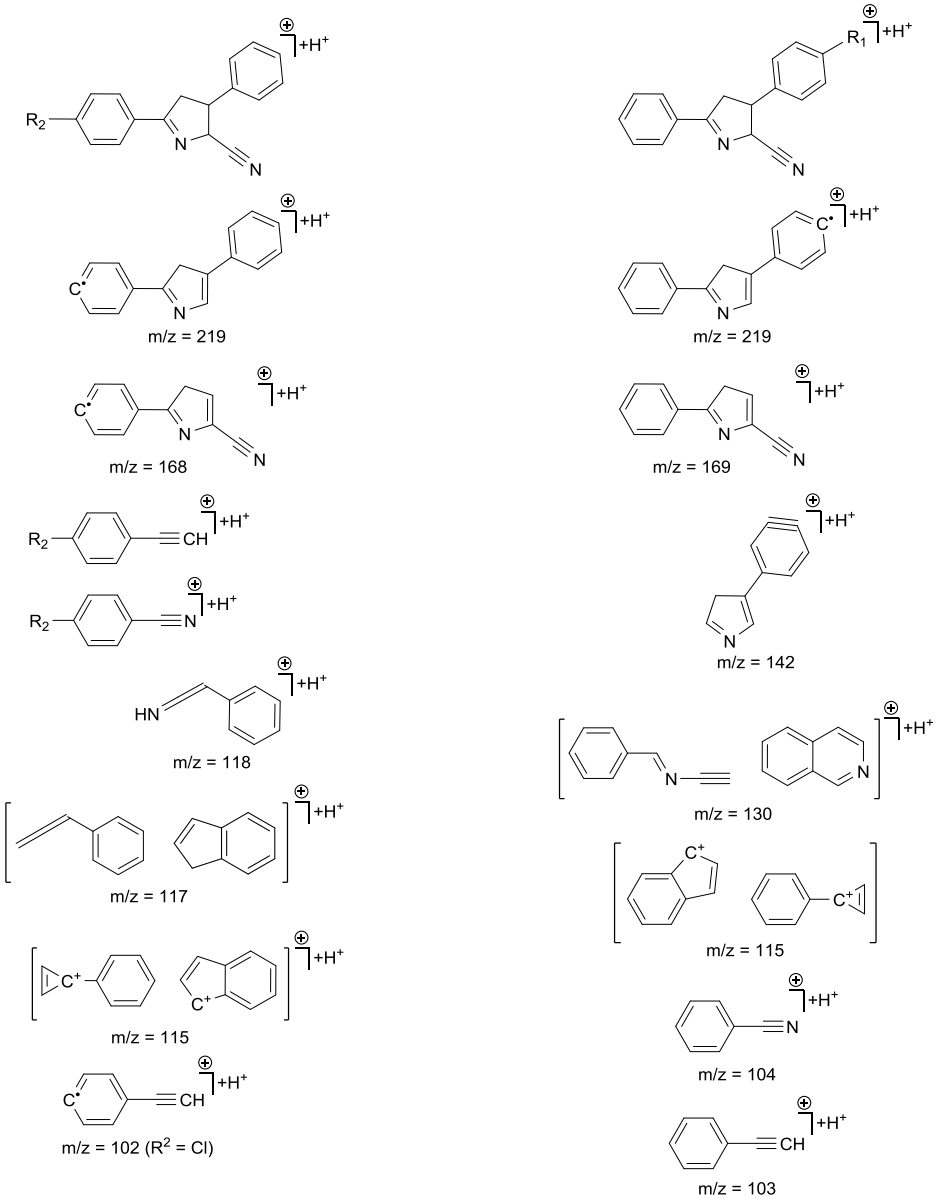
Сходството в ^{1}H ЯМР спектри на *trans*-**4а** и *trans*-**4о** с ^{1}H ЯМР спектри на 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрилите *trans*-**4б-и** и *trans*-**4н-п** ни даде основание да припишем *trans*-конфигурация на тези съединения, поради близките стойностите на химичните отмествания за съответните протони от 3,4-дихидро-2*H*-пироловия пръстен (в интервала 4.79-4.96 ppm за H-2, 3.72-4.22 ppm за H-3, 3.17-3.36 ppm за H-4а и 3.62-3.89 ppm за H-4б), както и близките стойности на вициналните константи на спин-спиново взаимодействие (в интервала $J_{H2\text{-}H3}$ = 6.8-7.5 Hz, $J_{H3\text{-}H4a}$ = 7.0-7.7 Hz, $J_{H3\text{-}H4б}$ = 9.4-9.5 Hz).

Мас-спектрален анализ

Въз основа на анализа на MS/MS спектрите на съединенията **4а-4п**, може да се твърди, че получените фрагментни йони и тяхното количество зависят от природата на заместителите и с кой ароматен пръстен са свързани те. Освен това, предполагаме, че първоначално формираните йони претърпяват изомеризация – изменение на положението на двойна връзка и/или преместване на протони.

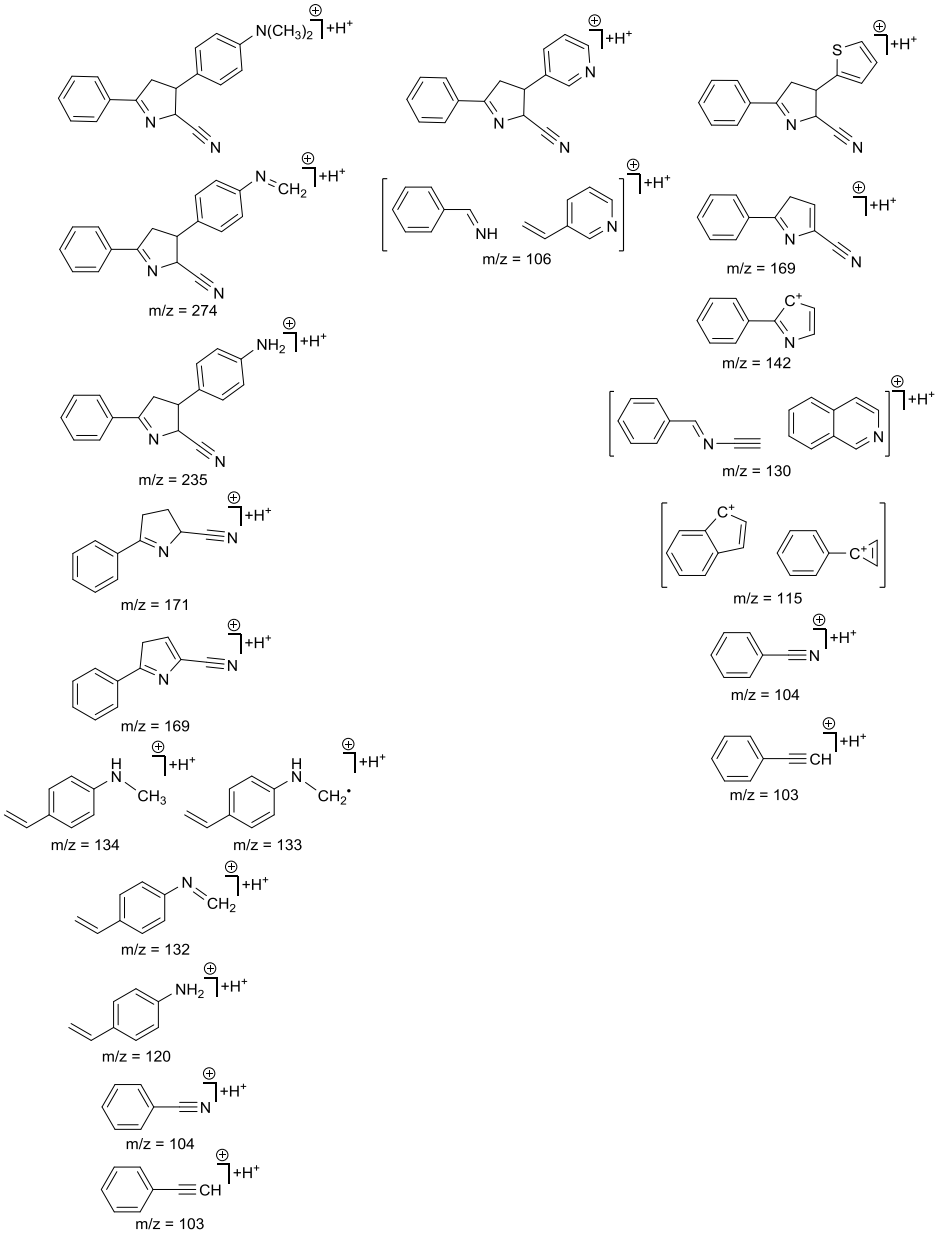
В MS/MS спектрите на съединенията, които имат заместител в положение 4 на ароматното ядро Ar[1], се формират йони при m/z 103, които са базов пик (протониран етинилбензен). Освен това се получават и бензенкарбонитрилиеви йони при m/z 104. В спектъра на съединение **4в** базовият пик е при m/z 133 и е етенил-N-метиланилиниев

катион радикал. Това потвърждава нашата хипотеза, че при протониране на анилиновия азотен атом се получава катион с по-ниска енергия в сравнение с този, който се получава при протониране на пиролиновия азотен атом. Базовият пик в спектъра на съединение **4и** е при m/z 106. На този йон могат да се препишат две различни структури – фенилметаниминиев йон и етинилпиридиниев йон. Въз основа на извода направен за съединение **3и**, можем да кажем, че и в този случай протонирането става предимно по пиридиновия азотен атом.



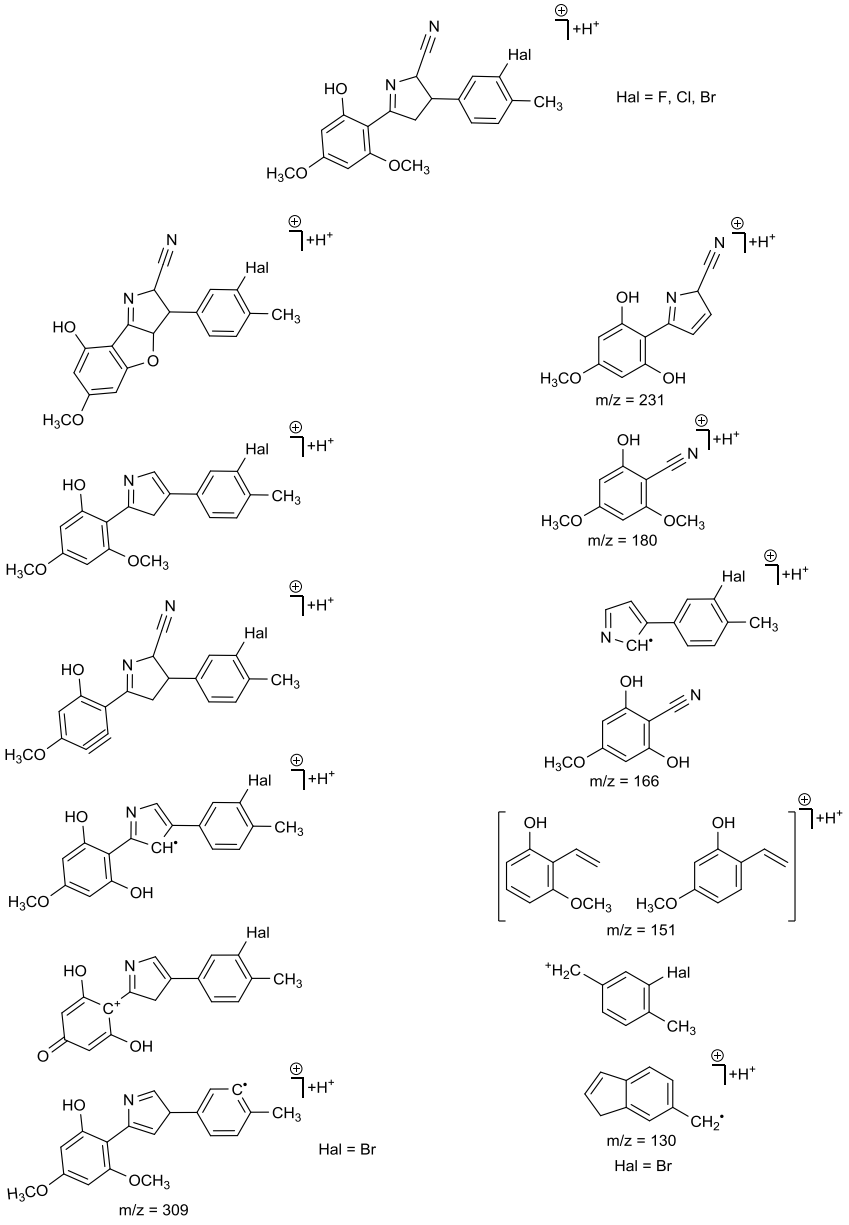
Фигура 5 Предполагаеми структури на фрагментните йони, наблюдавани в MS/MS спектрите на съединения **4а**, **4б**, **4г**-**4ж** и **4й**-**4н**

В MS/MS спектрите на съединенията, които имат заместител в положение 4 на ароматното ядро Ar^2, се наблюдават пикове с висока интензивност или като базов пик, които съответстват на протонирани 4-заместени етинилбензени. Освен това се получават и съответните 4-заместени бензенкарбонитрилиеви йони. Трябва да се отбележи, че в спектъра на съединение **4м** има пик със средна интензивност при m/z 102, получен вследствие на хомолитично разкъсване на връзката C-Cl в структурата на 4-етенил-1-хлоро-бензеновия катион. В спектрите на тези съединения има и пик при m/z 115.



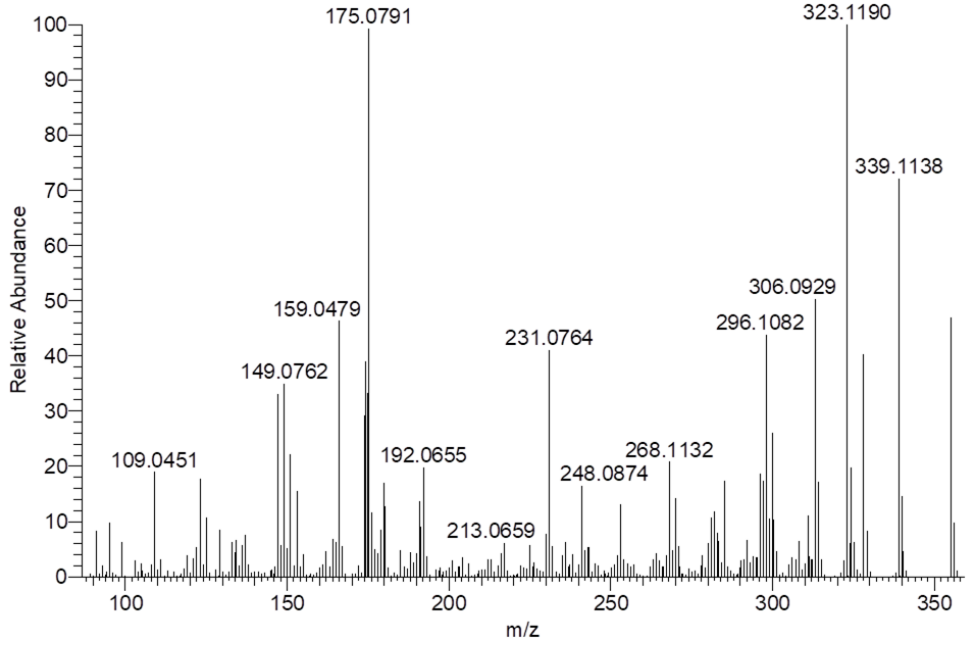
Фигура 6 Предполагаеми структури на фрагментните йони, наблюдавани в MS/MS спектрите на съединения **4в**, **4з** и **4и**

В MS/MS спектрите на съединенията **4н**-**4п** се наблюдават голям брой фрагментни йони. Четири фрагментни йона дават пикове с висока интензивност в съответните MS/MS спектри. Те се формират от съответните първични йони, след отделяне на карбен, циановодород, метанол и отделяне на циановодород и метилов радикал. В спектрите на **4н** (Hal = F) и **4о** (Hal = Cl) базовите пикове при m/z 175 и m/z 191 съответно, имат структура на (4-метилфенил-3-халогено)пиролов катион радикал. Базовият пик в спектъра на съединение **4п** (Hal = Br) е при m/z 130 ($C_{10}H_{10}$).

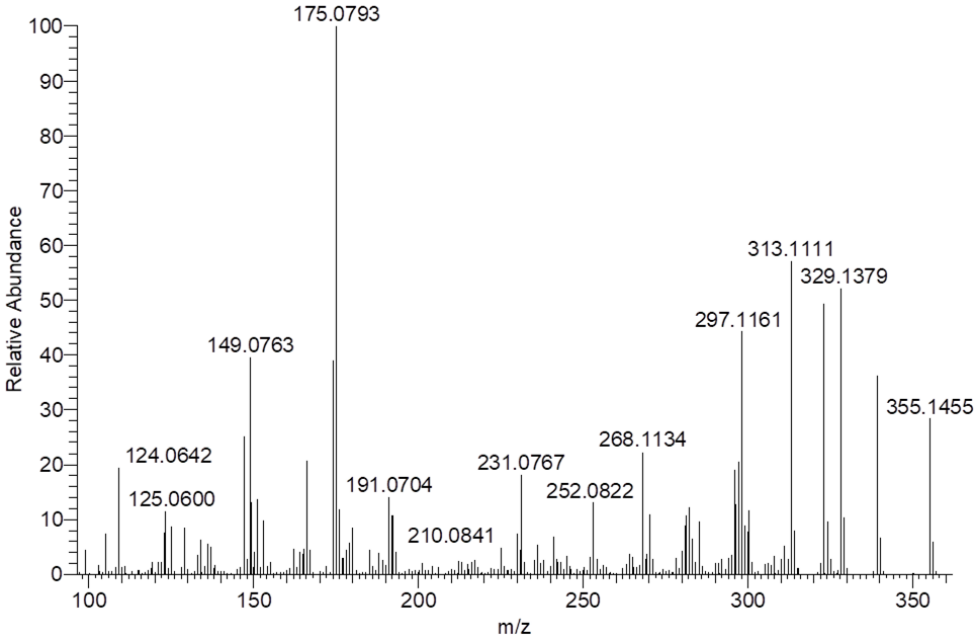


Фигура 7 Предполагаеми структури на фрагментните йони, наблюдавани в MS/MS спектрите на съединения **4н**-**4п**

Въпреки че фрагментацията на *cis*- и *trans*-изомерите е много сходна, има съществена разлика в интензитета на пиковете на основните йони. Това може да се илюстрира с MS/MS спектрите на двата изомера на съединение **4н**.



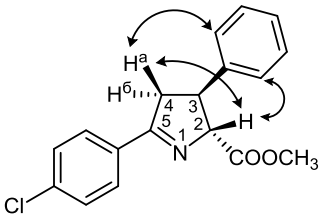
Фигура 8 MS/MS спектър на *trans*-**4н**



Фигура 9 MS/MS спектър на *cis*-**4н**

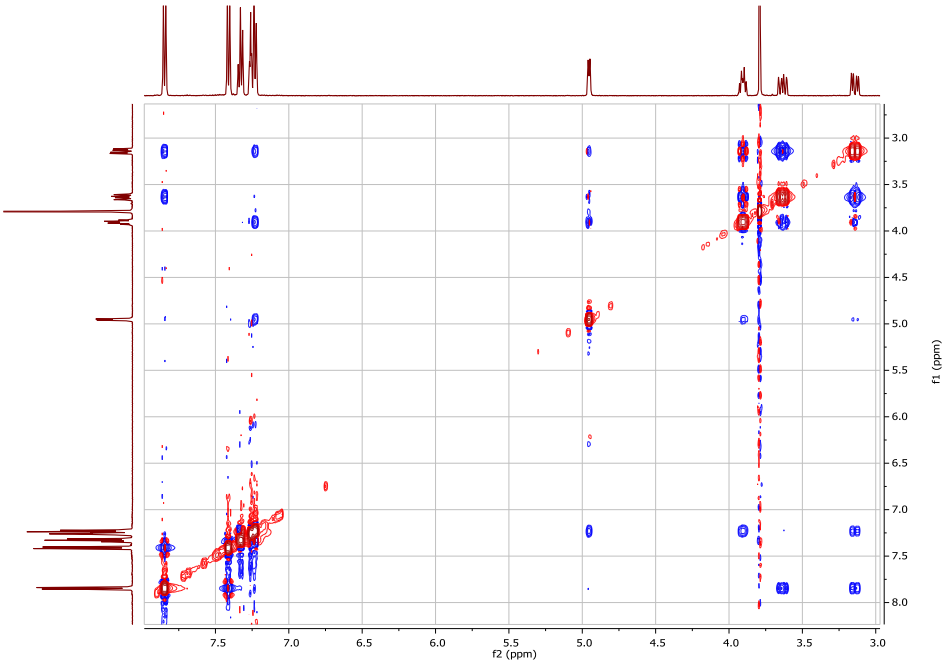
2.8.3. Структурно охарактеризиране на метил-3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилати (5)

При анализ на NOESY спектъра на съединение *trans*-**5м** установихме, че се наблюдава ядрен ефект на Оверхаузер между *орто*-протоните на бензеновото ядро при третия въглероден атом с протоните при втория и четвъртия въглероден атом Н-4а от дихидропироловия пръстен, както и между протоните при втория и четвъртия въглероден атом Н-4а, което показва че това бензеново ядро при С-3 е *trans*-разположено спрямо естерната група (Фигура 10).



trans-**5м**

Фигура 10

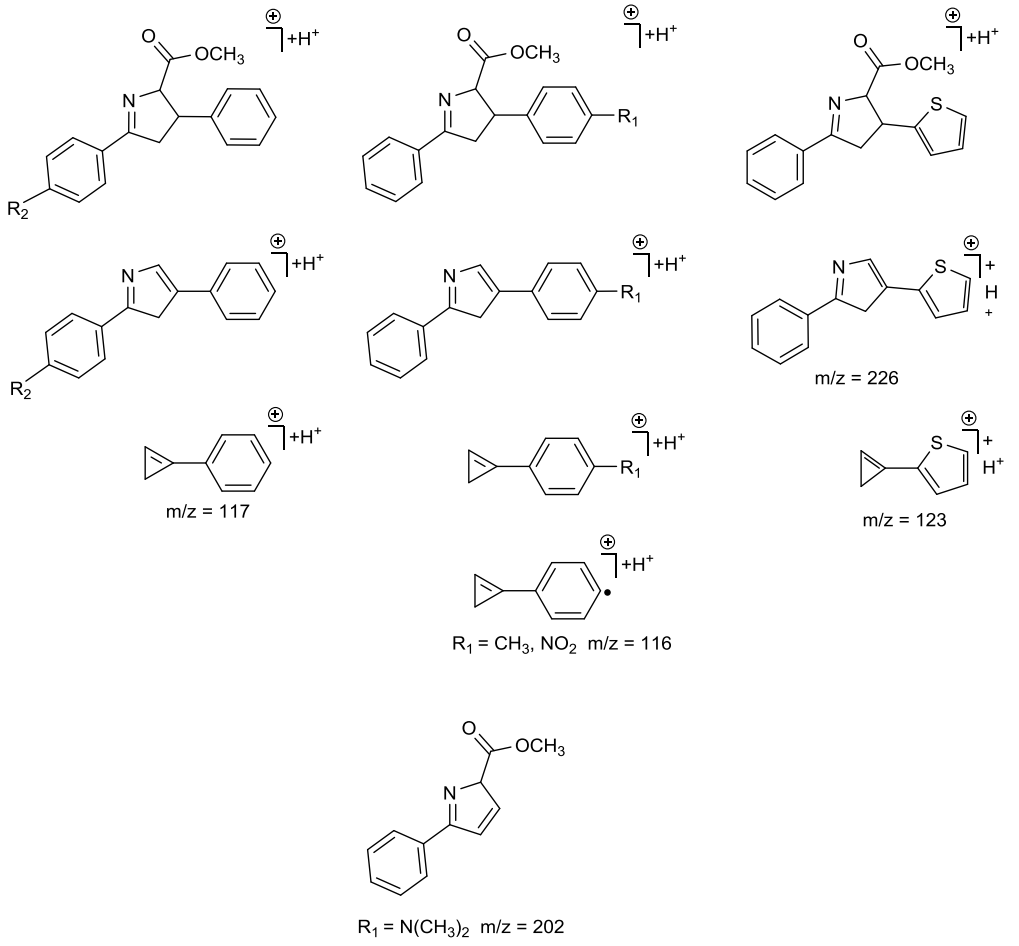


Фигура 11 NOESY спектър на метил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилата *trans*-**5м**

Поради близките стойности на химичните отмествания за протоните Н-2, Н-3, Н-4а и Н-4б от дихидропироловия пръстен, съответно 4.77-4.96 ppm за Н-2, 3.81-4.21 ppm за Н-3, 3.08-3.31 ppm за Н-4а и 3.61-3.82 ppm за Н-4б, както и близките стойности на вициналните константи на спин-спиново взаимодействие $J_{H2\text{-}H3}$ = 6.0-7.4 Hz, $J_{H3\text{-}H4a}$ = 6.0-7.4 Hz, $J_{H3\text{-}H4б}$ = 9.4-9.7 Hz, на останалите метилови естери **5** също приписахме *trans*-конфигурация.

Мас-спектрален анализ

В MS/MS спектрите на съединенията **5а-5з** и **5й-5н** се наблюдават пикове на йони с различна интензивност, получени при β-елиминиране на метилформиат, като се образуват съответните протонирани дизаместени пироли. В газова фаза, поради отсъствие на солватация, протича *cis*-β-елиминиране. Това потвърждава, че заместителите в положения 2 и 3 са в *trans*-конфигурация при изследваните естери **5.**



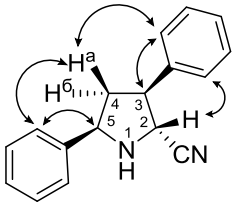
Фигура 12 Предполагаеми структури на фрагментните йони, наблюдавани в MS/MS спектрите на съединения **5а-5з** и **5й-5н**

При наличие на заместител в положение 4 на ароматното ядро Ar^1 се образуват фрагментни йони, които са протонираната форма на съответните циклопропенилбензени. В някои случаи се формират съответни катион-радикали. Фрагментни йони при m/z 117 (протонираната форма на циклопропенилбензен) се формират при наличие на заместител в положение 4 в ароматното ядро Ar^2. И в двата случая става елиминиране на бензонитрил

или 4-заместен бензонитрил от съответния пирилиев йон. В MS/MS спектъра на съединение **5в** се наблюдава пик на йон при m/z 202, който се образува при елиминиране на N,N-диметиланилин от първичния продуктов йон.

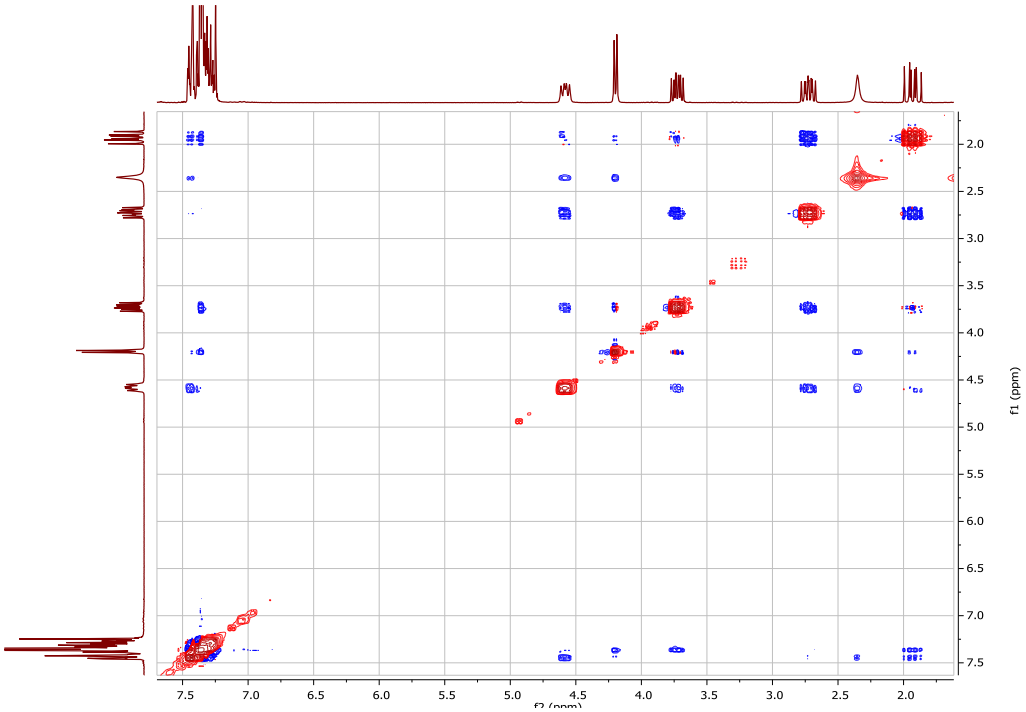
2.8.4. Структурно охарактеризиране на пиролидин-2-карбонитрили 7-1

В NOESY спектъра на съединение **7а-1** се регистрират силни взаимодействия между между *орто*-протоните на ароматното ядро при третия въглероден атом от пиролидиновия пръстен, геминалния H-3 протон и двата вицинални H-2 и H-4а протони, както и между *орто*-протоните на ароматното ядро при петия въглероден атом, геминалния H-5 протон и вициналния H-4а, което показва взаимното разположение на двете бензенови ядра е *cis*-, а двете бензенови ядра са в *trans*-положение спрямо цианогрупата при C-2 (Фигура 13).



7а-1

Фигура 13



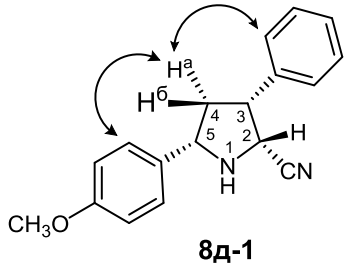
Фигура 14 NOESY спектър на 3,5-дифенилпиролидин-2-карбонитрил (**7а-1**)

На останалите пиролидин-2-карбонитрили **7-1** приписахме същата конфигурация, поради близките стойности на химичните отмествания за протоните H-2, H-3, H-4а, H-4б и H-5 от пиролидиновия пръстен, съответно в интервала 4.18-4.22 ppm, 3.71-4.04 ppm, 1.83-2.01 ppm, 2.68-2.81 ppm и 4.53-4.62 ppm, и близките стойности на вицинални константи

на спин-спиново взаимодействие $J_{H2\text{-}H3}$ = 4.8-6.1 Hz, $J_{H3\text{-}H4a}$ = 9.4-10.2 Hz, $J_{H3\text{-}H4б}$ = 7.6-8.1 Hz, $J_{H4a\text{-}H5}$ = 9.9-10.5 Hz и $J_{H4б\text{-}H5}$ = 5.9-6.5 Hz.

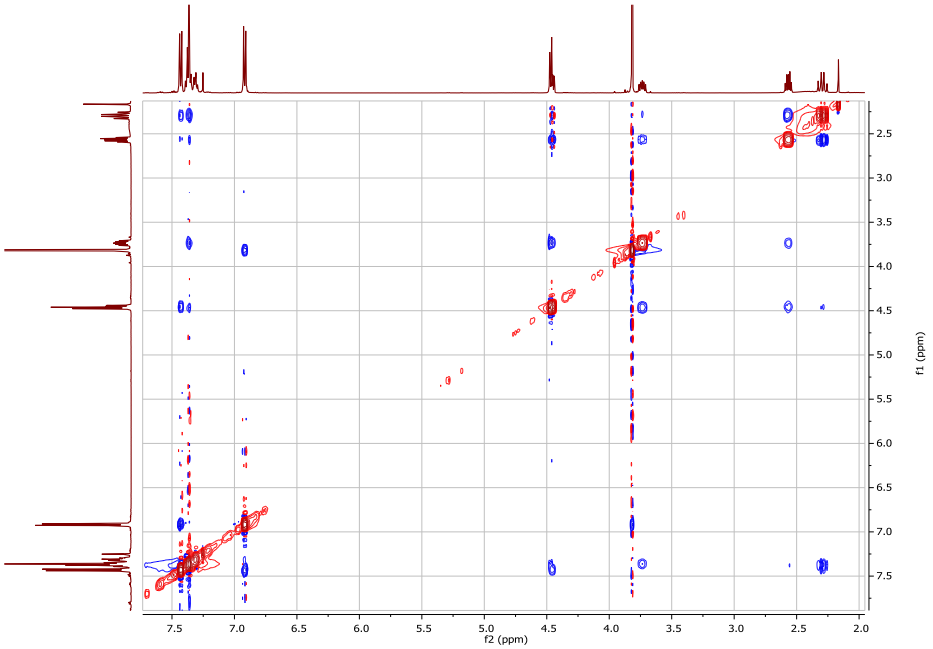
2.8.5. Структурно охарактеризиране на пиролидин-2-карбонитрили 8-1

Анализът на NOESY спектъра на пиролидин-2-карбонитрила **8д-1** показа, че се наблюдава ядрен ефект на Оверхаузер между протона при четвъртия въглероден атом от пръстена H-4a с *орто*-протоните на ароматните ядра при третия и петия въглероден атом, както и между протона при четвъртия въглероден атом от пръстена H-4б с протоните при втория, третия и петия въглероден атом, което показва, че двете ароматни ядра и цианогрупата имат *cis*-разположение (Фигура 15).



8д-1

Фигура 15

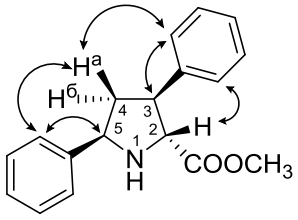


Фигура 16 NOESY спектър на 3,5-дифенилпиролидин-2-карбонитрил (**8д-1**)

Изолираните преобладаващи диастереомери на пиролидинкарбонитрилите **8а-1**, **8б-1**, **8ж-1**, **8з-1**, **8л-1** и **8м-1** имат близки стойности на химичните отмествания за съответните протони от пиролидиновите пръстени (4.45-4.52 ppm за H-2, 3.68-3.77 ppm за H-3, 2.25-2.30 ppm за H-4a, 2.54-2.63 ppm за H-4б и 4.45-4.52 ppm за H-5) и близки стойности на вициналните константи на спин-спиново взаимодействие $J_{H2\text{-}H3}$ = 7.8 Hz, $J_{H4a\text{-}H5}$ = 10.5-10.6 Hz и $J_{H4б\text{-}H5}$ = 5.9-6.1 Hz ($J_{H3\text{-}H4a}$ и $J_{H3\text{-}H4б}$ не могат да се определят), поради което им приписахме същата относителната конфигурация като на **8д-1**.

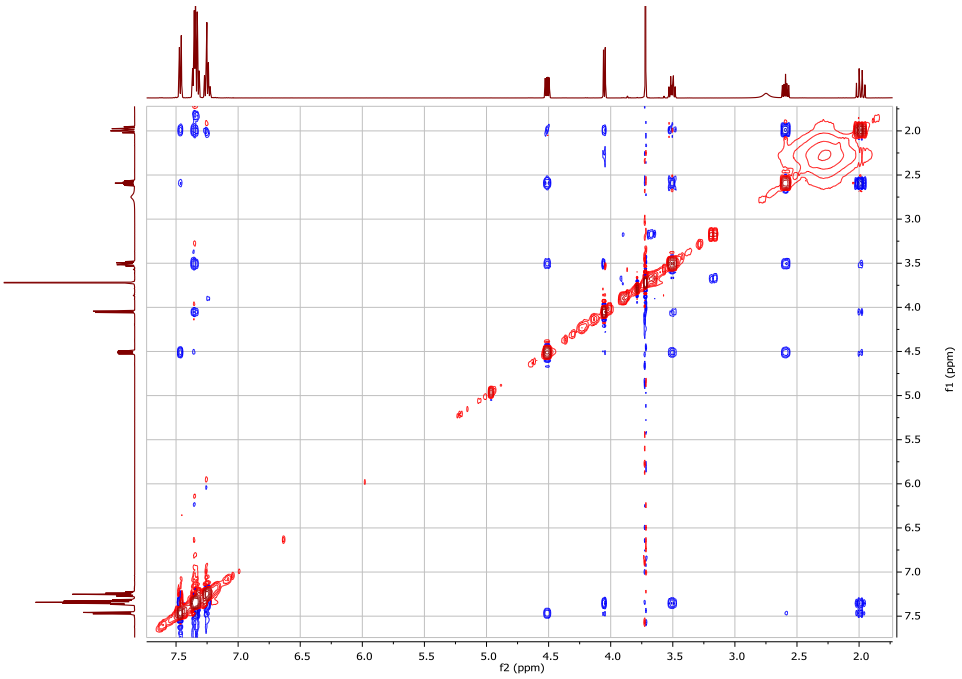
2.8.6. Структурно охарактеризиране на метил-3,5-диарилпиролидин-2-карбоксилати (9-1)

Наблюдава се ядрен ефект на Оверхаузер между *орто*-протоните на ароматното ядро при третия въглероден атом с протоните при втория и четвъртия въглероден атом Н-4а, както и между *орто*-протоните на ароматното ядро при петия въглероден атом с протона Н-4а, което показва, че двете ароматни ядра са разположени от едната страна на пиролидиновия пръстен. Това се потвърждава и от наблюдаваното близко разположение между протоните в положение 3, 4б и 5, които са разположени от другата страна на пиролидиновия пръстен (Фигура 17).



9a-1

Фигура 17

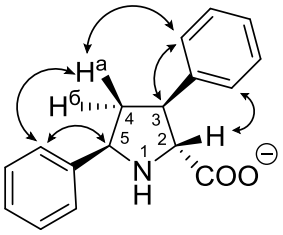


Фигура 18 NOESY спектър на метил-3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилат (**9a-1**)

На останалите пиролидин-2-карбонитрили **9-1** приписахме същата конфигурация, поради близките стойности на химичните отмествания за протоните Н-2, Н-3, Н-4а, Н-4б и Н-5 от пиролидиновия пръстен, съответно в интервала 3.97-4.05 ppm, 3.45-3.51 ppm, 1.89-1.99 ppm, 2.53-2.59 ppm и 4.44-4.51 ppm, и близките стойности на вициналните константи на спин-спиново взаимодействие J_{H2-H3} = 6.9-7.2 Hz, J_{H3-H4a} = 7.2-7.3 Hz, $J_{H3-H4б}$ = 10.7-11.0 Hz, J_{H4a-H5} = 10.5-10.8 Hz и $J_{H4б-H5}$ = 5.5-5.6 Hz.

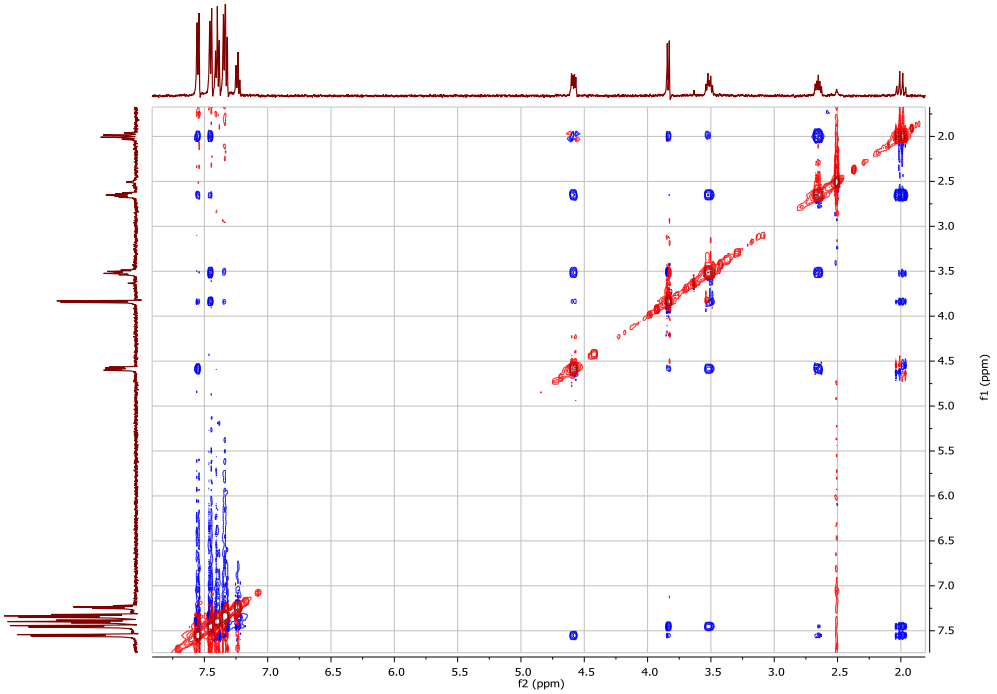
2.8.7. Структурно охарактеризиране на 3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилна киселина (10a)

Анализът на NOESY спектъра на 3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилната киселина (**10a**) показа, че се наблюдават силни ядрени ефекти на Оверхаузер между *орто*-протоните на ароматното ядро при третия въглероден атом от пиролидиновия пръстен с геминалния H-3 протон и вициналните протони H-2 и H-4a, както и между *орто*-протоните на ароматното ядро при петия въглероден атом с протона H-4a, което показва, че двете ароматни ядра са разположени от едната страна на пиролидиновия пръстен, а карбоксилатната група има *trans*-разположение спрямо тях (Фигура 19).



10a

Фигура 19



Фигура 20 NOESY спектър на 3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилна киселина (**10a**)

2.9. In vitro антипролиферативна активност

Направените предварителни изследвания върху антипролиферативната активност на някои от синтезираните от нас съединения спрямо човешката туморна клетъчна линия MDA-MB-231 (тройно негативен рак на гърдата) показаха, че някои от нитрилите (напр. *cis*-**4н**) проявяват относително висока антипролиферативна активност, докато естерите **5** показват много ниска активност (IC_{50} > 4100 μM), независимо от вида на заместителя в ароматните пръстени Ar^1 и Ar^2. Получените резултати ни дадоха основание да продължим изследванията върху антипролиферативната активност с избраните съединения и спрямо други туморни клетъчни линии. Изследвано е и влиянието на пространственото разположение на заместителите при C2 и C3 в заместените Δ^1-пиролинкарбонитрили **4**. Антипролиферативната активност на индивидуалните диастереомери на някои нитрили **4** и на амида **6н** е изследвана върху осем човешки туморни клетъчни линии при използване на MTT анализ [49]. За тези експерименти са използвани човешките туморни клетъчни линии: MCF-7 (луминален тип А рак на гърдата), MD-MBA-231, H1299 (недребноклетъчен рак на белия дроб), A549 (алвеоларен аденокарцином на белия дроб), HeLa (рак на маточната шийка), HepG2 (хепатоцелуларен карцином), HT-29 (колоректален аденокарцином) и PC3 (аденокарцином на простатата). Като модел на нормална тъкан е използвана клетъчна линия MCF-10A (нетуморогенни епителни клетки на млечната жлеза). В Таблици 11 и 12 са представени данни за концентрацията, която предизвиква 50 % инхибиране на клетъчната пролиферация (IC_{50}) и индексът на селективност (SI = IC_{50}(MCF-10A)/IC_{50}(туморна клетъчна линия)).

Както се вижда от Таблица 11, Δ^1-пиролинкарбонитрилът *trans*-**4л**, съдържащ метилова група в ароматния пръстен Ar^2, проявява сравнително висока антипролиферативна активност (IC_{50} = 11.7 μM) и висок индекс на селективност (SI = 15.5) спрямо клетките на белодробния алвеоларен аденокарцином A549. От друга страна, другият стреоизомер, *cis*-**4л**, показва значително по-ниска активност (IC_{50} = 82.2 μM) и много нисък индекс на селективност (SI = 1.27). Съединението *cis*-**4и** има добър индекс на селективност (SI = 7.33), но ниска антипролиферативна активност (IC_{50} = 311 μM).

Таблица 11. In vitro изследвания на антипролиферативната активност на някои нитрили **4**

Клетъчна линия	Цисплатин*	*trans*-**4л**	*cis*-**4л**	*cis*-**4д**	*cis*-**4и**
	IC_{50} [μM] ± SD (SI)	**IC_{50} [μM] ± SD (SI)**	**IC_{50} [μM] ± SD (SI)**	**IC_{50} [μM] ± SD (SI)**	**IC_{50} [μM] ± SD (SI)**
MCF-10A	23.2 ± 1.4 (1)	182 ± 5.8 (1)	104 ± 6 (1)	427 ± 12 (1)	2277 ± 178 (1)
MCF-7	45.8 ± 3.2 (0.50)	568 ± 57 (0.32)	374 ± 6 (0.28)	1766 ± 232 (0.24)	1377 ± 255 (1.65)
MDA-MB-231	1.8 ± 0.1 (12.7)	313 ± 20 (0.58)	2562 ± 107 (0.04)	>3619 (<0.12)	>4110 (<0.55)
H1299	5.0 ± 0.9 (4.62)	354 ± 15 (0.51)	205 ± 6 (0.51)	840 ± 43 (0.51)	2984 ± 62 (0.76)
A549	38.6 ± 4.7 (0.60)	11.7 ± 0.8 (15.5)	82.2 ± 5.8 (1.27)	341 ± 26 (1.25)	311 ± 19 (7.33)
HeLa	19.6 ± 3.2 (1.18)	84.1 ± 2.3 (2.16)	169 ± 10 (0.61)	158 ± 6.5 (2.69)	2219 ± 136 (1.03)
HepG2	19.1 ± 0.4 (1.22)	159 ± 4.6 (1.14)	235 ± 15 (0.44)	554 ± 34 (0.77)	2996 ± 107 (0.76)
HT-29	8.2 ± 0.3 (2.84)	136 ± 7.7 (1.33)	853 ± 46 (0.12)	308 ± 8 (1.39)	1640 ± 132 (1.39)
PC3	3.4 ± 0.5 (6.93)	121 ± 13 (1.50)	297 ± 25 (0.35)	478 ± 58 (0.80)	1915 ± 70 (1.19)

*Положителен контрол

Цисплатин е добре известен химиотерапевтик, използван за лечение на различни ракови заболявания при човека като предизвиква апоптоза в раковите клетки [50]. Цисплатин беше използван като положителен контрол в нашите изследвания. От резултатите в Таблица 11 се вижда, че за клетъчната линия A549 стойността на IC_{50} за съединението *trans*-**4л** е 3.3 пъти по-ниска от IC_{50} на Цисплатин. Съществува добра линейна корелация между стойностите на IC_{50} за двете съединения спрямо четирите клетъчни линии: MCF-10A, HepG2, HT-29 и PC3. Освен това, индексът на селективност (SI) на *trans*-**4л** е 26 пъти по-висок от този на Цисплатин. Въз основа на тези резултати предполагаме, че съединението *trans*-**4л** е много обещаващо като потенциална противоракова субстанция срещу клетъчната линия A549 (алвеоларен аденокарцином на белия дроб).

Арилметилиденацетофенони, съдържащи OH група в позиция 6 и/или хидроксилна и алкокси групи в позиции 2 и 4 на ароматното ядро Ar^2, са предшественици на флавоноиди [51] – съединения с противотуморна активност. Поради тази причина продължихме изследванията със съединения **4н-п.**

Първоначалните експерименти върху антипролиферативната активност на нитрилите **4н-п** показаха, че съединенията **4о** и **4п**, съдържащи хлор или бром като заместители, спрямо клетки от клетъчна линия MDA-MB-231, имат ниска активност – *cis*-**4о** (IC_{50} = 75.8 μM) и *cis*-**4п** (IC_{50} = 35.9 μM). *Trans*-**4о** и *trans*-**4п** показаха много ниска

активност. Въз основа на тези резултати бяха проведени допълнителни експерименти върху стереоизомерите на флуоросъдържащия нитрил **4н**.

Както се вижда от Таблица 12, нитрилът *cis*-**4н** проявява относително висока активност (IC_{50} = 16 μM) и висок индекс на селективност (SI = 10.5) спрямо клетъчната линия MDA-MB-231. Това съединение показва умерена активност срещу клетъчните линии H1299 (IC_{50} = 25.4 μM) и HT-29 (IC_{50} = 19.6 μM) с добър индекс на селективност – съответно – 6.68 и 8.86. *Trans*-**4н** проявява ниска активност и има нисък индекс на селективност спрямо всички туморни клетъчни линии. За разлика от нитрила *cis*-**4н**, амидът cis-**6н** има много ниска активност спрямо всички туморни клетъчни линии. Трябва да се отбележи, че това съединение показва добър SI (6.67) спрямо клетките от клетъчна линия HT-29. Получените данни показват, че наличието на цианогрупа в положение 2 на 3,4-дихидро-2*H*-пироловия пръстен е от съществено значение за биологичната активност на изследваните съединения. От данните в Таблици 11 и 12 се вижда, че стойностите на IC_{50} на съединението *cis*-**4н** за клетъчните линии HT-29, H1299 и MDA-MB-231 са съответно 2.5, 5 и 9 пъти по-високи от тези на Цисплатин. Съществува добра линейна корелация между стойностите на IC_{50} за двете съединения спрямо клетъчни линии: MCF-7, MDA-MB-231, H1299, HepG2 и HT-29. При сравняването на стойностите на SI за двете съединения спрямо клетъчните линии MDA-MB-231 и H1299 се вижда, че те са сходни, докато за клетъчната линия HT-29 SI на *cis*-**4н** е 3 пъти по-висок от този на Цисплатин.

Таблица 12. In vitro изследвания на антипролиферативната активност на нитрили **4** и амид **6**, съдържащи хидроксилна и метокси групи в Ar^2

Клетъчна линия	*trans*-**4н**	*cis*-**4н**	*cis*-**6н**
	IC_{50} [μM] ± SD (SI)	**IC_{50} [μM] ± SD (SI)**	**IC_{50} [μM] ± SD (SI)**
MCF-10A	79.3 ± 2.5 (1)	170 ± 12 (1)	429 ± 28 (1)
MCF-7	149 ± 12 (0.53)	185 ± 26 (0.92)	923 ± 37 (0.46)
MDA-MB-231	717 ± 73 (0.11)	16.0 ± 0.7 (10.5)	1989 ± 40 (0.22)
H1299	36.4 ± 2.0 (2.18)	25.4 ± 2.3 (6.68)	1876 ± 51 (0.23)
A549	32.2 ± 1.1 (2.46)	97.6 ± 13 (1.74)	136 ± 5.4 (3.16)
HeLa	1168 ± 42 (0.07)	224 ± 15 (0.75)	1180 ± 37 (0.36)
HepG2	44.6 ± 2.8 (1.78)	117 ± 4.8 (1.45)	117 ± 6.2 (3.67)
HT-29	28.1 ± 2.0 (2.82)	19.6 ± 1.8 (8.66)	64.3 ± 4.8 (6.67)
PC3	44.3 ± 5.4 (1.79)	115 ± 4.8 (1.47)	125 ± 7.6 (3.44)

Според данните, представени в Таблици 11 и 12, можем да заключим, че най-устойчиви към всички съединения са клетъчните линии MCF-7 и HeLa. Съединението *cis*-**4н** има добри стойности на IC_{50} и SI за клетъчни линии HT-29, H1299 и MDA-MB-231. Като се има предвид неговата обещаваща активност, *cis*-**4н** е кандидат с потенциал за използване като антитуморно средство. Според данните от Таблица 11, може да се заключи, че стойноста на IC_{50} на *trans*-**4л** е 3.3 пъти по-ниска от IC_{50} на Цисплатин, а индексът на селективност е 26 пъти по-висок от този на Цисплатин. Съединение *trans*-**4л** е потенциална антитуморна субстанция, спрямо клетъчната линия A549 (клетки от алвеоларен аденокарцином на белия дроб).

3. ОБОБЩЕНИЕ

1. Синтезирани са заместени 2-амино-5-оксонитрили със защитена аминогрупа, предшественици на дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили.
2. В меки киселинни условия е осъществена хидролитична циклизация на заместените 2-амино-5-оксонитрили, водеща до получаване на 3,5-дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили като диастереомерни смеси. Изолирани са индивидуалните диастереомери на тези съединения. Установено е, че реакциите на хидролитична циклизация протичат без епимеризация.
3. Осъществено е превръщане на 3,5-дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили в метилови естери на 3,5-дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилни киселини по реакцията на Pinner. Регистрирано е получаването на съответните карбоксамиди като странични продукти.
4. Редукцията на 3,5-дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили е проведена с $NaBH_4$ в среда от оцетна киселина за кратко реакционно време, при което се получават съответните производни на пролина – 3,5-диарилпиролидин-2-карбонитрили.
5. Метиловите 3,5-дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилати са редуцирани до съответните метилови 3,5-диарилпиролидин-2-карбоксилати при използване на $NaBH_3CN$.
6. Получена е 3,5-дифенилпиролидин-2-карбоксилната киселина – синтетичен аналог на пролина.
7. За охарактеризиране на новосинтезираните съединения са използвани ИЧ спектроскопия, едномерни и двумерни ЯМР техники, както и мас-спектрометрия с висока разделителна способност при електроспрей йонизация в положителен режим.
8. Изследвана е антипролиферативната активност на индивидуалните диастереомери на някои 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили (**4**), метилови 3,5-диарил-3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилати (**5**) и на карбокс-амида *cis*-**6н** срещу осем човешки туморни клетъчни линии. Като положителен контрол е използван Цисплатин.

9. При изследване на антипролиферативната активност е установено, че наличието на цианогрупа в позиция 2 на 3,4-дихидро-2*H*-пироловия пръстен е от съществено значение за биологичната активност на изследваните съединения.

4. ПРИНОСИ

1. Предложен е нов подход за синтез на заместени 2-амино-5-оксонитрили в условията на твърдо-течен междуфазов катализ с използване на CaO като база, при което съединенията са получени с високи добиви.
2. Разработен е метод за директно превръщане на 3,5-дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили в метилови естери на 3,5-дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбоксилни киселини по реакцията на Pinner. Такъв подход за превръщане на Δ^1-пиролинови нитрили в естери не е описан в литературата.
3. Осъществено е превръщане на заместени 2-амино-5-оксонитрили в 3,5-дизаместени пиролидинкарбонитрили посредством реакция на хидролитична циклизация и следваща редукция, без да се изолира междинно образуваните 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили.
4. Обобщените резултати от MS/MS-спектрите по отношение на фрагментацията на първичните йони на синтезираните съединения могат да се използват за доказване на структурите на подобни съединения.
5. Получени са резултати за биологичната, в частност антипролиферативната активност, на дизаместени 3,4-дихидро-2*H*-пирол-2-карбонитрили и естери, за които няма данни в научната литература по отношение на техните биологични ефекти.
6. Установено е, че нитрилът *cis*-**4н** има добри стойности на IC_{50} и индекс на селективност (SI > 6) за клетъчните линии HT-29, H1299 и MDA-MB-231. Това съединение е потенциален кандидат за използване като антитуморно средство.
7. За клетъчната линия A549 стойността на IC_{50} на съединението *trans*-**4л** е 3.3 пъти по-ниска от IC_{50} на Цисплатин, а индексът му на селективност е 26 пъти по-висок от този на Цисплатин. Съединение *trans*-**4л** е потенциална антитуморна субстанция спрямо клетъчната линия A549 (клетки от алвеоларен аденокарцином на белия дроб).

5. ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ И ПРОЕКТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Научни публикации по темата на дисертацията:

1) Vesela Mihaylova, Ivan Iliev, Anelia Vasileva, Elizabeth Mazzio, Bereket Mochona, Nelly Mateeva, Donka Tasheva, Synthesis and Evaluation of the Antiproliferative Activity of the Derivatives of 3,5-Diaryl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrole-2-carboxylic Acids, *Molecules* **2025**, *30*(7), 1602; https://doi.org/10.3390/molecules30071602

2) Donka N. Tasheva, Vesela M. Mihaylova, *rel*-(2*R*,3*S*)-2-((Diphenylmethylene)-amino)-5-oxo-5-phenyl-3-(thiophen-2-yl)pentanenitrile, *Molbank* **2024**, *2024*(3), M1881; https://doi.org/10.3390/M1881

Участия в научни форуми:

1) Климентови дни, Синтез и антитуморна активност на производни на Δ^1-пиролин-5-карбоксилни киселини, Весела. Михайлова, Иван Илиев, Донка Ташева, 2019, постер;

2) 185 години от рождението на Дмитрий Менделеев, 150 години Периодичен Закон, Синтез на производни на 3,5-диарилзаместени пиролидин-2-карбоксилни киселини с потенциална биологична активност, Весела Михайлова, Нели Матеева, Ивайло Иванов, Донка Ташева, 2019, секционен доклад;

3) Chemistry today for tomorrow, Simple synthesis of diaryl substituted pyrrolidine-2-carbonitriles from enones, Vesela Mihaylova, Nelly Mateeva, Ivaylo Ivanov, Donka Tasheva, 2019, poster;

4) XVII Национална конференция по химия за студенти и докторанти, Синтез на 3,5-диарилзаместени пиролидин-2-карбонитрили, Весела Михайлова, Донка Ташева, Нели Матеева, 2018, секционен доклад;

5) 255th ACS Natioanal Meeting, USA, Synthesis and characterization of novel 2,4-diaryl Δ^1-pyrroline-5-carbonitriles as potential cancer cells inhibitors, Vesela Mihaylova, Donka Tasheva, Ivaylo Ivanov, Nelly Mateeva, 2018, poster;

6) 255th ACS Natioanal Meeting, USA, Inhibition of Breast Cancer Cell Growth and Proliferation by Novel Synthetic Δ^1-Pyrrolline-5-Carbonitriles and Flavonoids, Cecilia Aikens, Vesela Mihaylova, Donka Tasheva, Elizabeth Mazzio, Bereket Mochona, Kinfe Ken Redda, Nelly Mateeva, 2018, poster;

7) 255th ACS Natioanal Meeting, USA, Anti-inflammatory Properties of Synthetic Chalcones and Δ^1-Pyrroline-5-carbonitriles Cecilia Aikens, Elizabeth Mazzio, Vesela Mihaylova, Donka Tasheva, Bereket Mochona, Nelly Mateeva, 2018, poster;

8) XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, Синтез на дизаместени Δ^1-пиролин-5-карбонитрили с потенциална биологична активност, Весела Михайлова, Донка Ташева, Нели Матеева, 2017, секционен доклад;

Участия в проекти:

1) КП-06-ПН-31/12 Селективни природни инхибитори на пост-пролин разграждащи пептидази от български лечебни растения като потенциални средства за превенция и терапия на онкологични заболявания; Финансираща институция: ФНИ-МОН; 2019-2024 г.

2) Синтез и антитуморна активност на производни на Δ^1-пиролин-5-карбоксилни киселини; Финансираща институция: ФНИ-СУ „Св. Климент Охридски“; 2019 г.;
3) Изследване взаимодействията на 2,4-дизаместени Δ^1-пиролин-5-карбонитрили с редуциращи агенти и с електронодефицитни алкени; Финансираща институция: ФНИ-СУ „Св. Климент Охридски“; 2018 г.;

4) Синтез на производни на заместени пиролин- и пиролидинкарбоксилни киселини с потенциална биологична активност; Финансираща институция: ФНИ-СУ „Св. Климент Охридски“; 2017 г.

6. ЛИТЕРАТУРА

[1] R. A. Carins, S. I. Harris, W. T. Mak, *Nat. Rev. Cancer 2011, 11, 85–95*.

[2] C. Gorrini, I. S. Harris, T. W. Mak, *Nat. Rev. Drug Discov. 2013, 12, 931–947*.

[3] G. M. Heiden Vander, Y. S. Lunt, L. T. Dayton, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2011, 76, 325–334*.

[4] J. J. Tanner, S.-M. Fendt, D. F. Becker, *Biochemistry 2018, 57, 3433–3444*.

[5] P. Geng, W. Qin, G. Xu, *Amino Acids 2021, 53, 1769–1777*.

[6] J.-j. Duan, Y.-f. Guo, J.-j. Chen, T.-q. Chen, J. Wang, S.-c. Yu, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 2024, 39, 2367129*.

[7] F. Cai, Y. Miao, C. Liu, T. Wu, S. Shen, X. Su, Y. Shi, *Oncol. Lett. 2018, 15, 731–740*.

[8] A. N. Bogner, K. M. Stiers, J. J. Tanner, *Amino Acids 2021, 53, 1817–1834*.

[9] S. P. Donald, , X.-Y. Sun, C.-A. A. Hu, J. Yu, J. M. Mei, D. Valle, J. M. Phang, *Cancer Res., 2001, 61, 1810–1815*.

[10] Y. Liu, G. L. Borchert, S. P. Donald, A. Surazynski, C.-A. Hu, C. J. Weydert, L. W. Oberley, J. M. Phang, *Carcinogenesis, 2005, 26, 1335–1342*.

[11] J. M. Phang, *Antioxid Redox Signal., 2019, 30, 635–649*.

[12] W. Liu, A. Le, C. Hancock, A. N. Lane, C. V. Dang, T. W.-M. Fan, J. M. Phang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2012, 109, 8983–8988*.

[13] I. Elia, D. Broekaert, S. Christen, R. Boon, E. Radaelli, M. F. Orth, C. Verfaillie, T. G. Grűnewald, S.-M. Fendt, *Nat. Commun., 2017, 8, 1–11*.

[14] Saif Al Aqbi, PhD Thesis, Department of Cancer Studies and Molecular Medicine University of Leicester, 2018.

[15] Y. Yan, L. Chang, T. Hongzhe, L. Wang, L. Wang, Y. Zhang, T. Yang, G. Li, W. Hu, K. Shah, G. Chen, Y. Guo, *J. Immunother. Cancer, 2018, 6:148*.

[16] M.-G. A. Shvekhgeimer, *Chem. Heterocycl. Compd. 2003, 39, 405–448*.

[17] N. Chandan, A. L. Thompson, M. G. Moloney, *Org. Biomol. Chem. 2012, 10, 7863–7868*.

[18] T. Ma, X. Fu, C. W. Kee, L. Zong, Y. Pan, K.-W. Huang, C.-H. Tan, *J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 2828–2831*.

[19] N. Halland, R. G. Hazell, K. A. Jørgensen, *J. Org. Chem. 2002, 67, 8331–8338*.

[20] P. Pandit, N. Chatterjee, D. K. Maiti, *Chem. Commun., 2011, 47, 1285–1287*.

[21] B. Cui, J. Ren, Z. Wang, *J. Org. Chem. 2014, 79, 790–796*.

[22] N. S. Medran, A. La-Venia, S. A. Testero, *RSC Adv. 2019, 9, 6804–6844*.

[23] X.-F. Bai, L. Li , Z. Xu, Z.-J. Zheng, C.-G. Xia, Y.-M. Cui, L.-W. Xu, *Chem. Eur. J. 2016, 22, 10399–10404*.

[24] H. Lee, H. Nam, S. Y. Lee, *J. Am. Chem. Soc. 2024, 146, 3065−3074*.

[25] O. Tsuge, K. Ueno, S. Kanemasa, K. Yorozu, *Bull. Chem. Soc. Jpn. 1987, 60, 3347–3358*.

[26] N. Meyer, T. Opatz, *Synlett 2004, 5, 787–790*.

[27] D. Tasheva, A. Petrova, S. Simova, *Synth. Commun. 2007, 37, 3971–3979*.

[28] J. Nie, M.-Q. Hua, H.-Y. Xiong, Y. Zheng, J.-A. Ma, *J. Org. Chem. 2012, 77, 4209–4216*.

[29] T. Konno, S. Watanabe, T. Takahashi, Y. Tokoro, S. Fukuzawa, *Org. Lett. 2013, 15, 4418–4421*.

[30] D. S. Timofeeva, A. R. Ofial, H. Mayr, *Tetrahedron 2019, 75, 459–463*.

[31] D. Tasheva, N. Petkova, V. Dryanska, *Synth. Commun. 2003, 3, 3661–3670*.

[32] N. S. Poonia, B. Yadav, C. Kumar, V. Bhagwat, *J. Org. Chem. 1977, 42, 2030–2031*.

[33] N. S. Poonia, K. Chhabra, C. Kumar, T. C. Sharma, V. W. Bhagwat, *J. Org. Chem. 1977, 42, 3311–3313*.

[34] N. A. Bukhari, M. Jasamai, I. Jantan, W. Ahmad, *Mini-Rev. Org. Chem. 2013, 10, 73–83*.

[35] P. Kulkarni, Curr. Microw. *Chem. 2015, 2, 144–149*.

[36] S. Kanemasa, O. Uchida, E. Wada, *J. Org. Chem. 1990, 55, 4411–4417*.

[37] A. van der Werf, R. M. Kellogg, *Tetrahedron Lett. 1991, 32, 3727–3730*.

[38] M. J. O'Donnell, R. L. Polt, *J. Org. Chem. 1982, 47, 2663–2666*.

[39] J. O. Opio, S. Labidalle, H. Galons, M. Miocque, A. Zaparucha, A. Loupy, *Synth. Commun. 1991, 21, 1743–1754*.

[40] D. Pfaff, G. Nemecek, J. Podlech, *Beilstein J. Org. Chem. 2013, 9, 1572–1577*.

[41] R. Roger, D. G. Neilson, *Chem. Rev. 1961, 61, 179–211*.

[42] E. N. Zil'berman, *Russ. Chem. Rev. 1962, 31, 615–633*.

[43] I. Bergner, C. Wiebe, N. Meyer, T. Opatz, *J. Org. Chem. 2009, 74, 8243–8253*.

[44] N. Meyer, T. Opatz, *Synlett 2003, 10, 1427–1430*.

[45] N. Meyer, F. Werner, T. Opatz, *Synthesis 2005, 6, 945-956*.

[46] K. Abiraj, B. Dinesh, G. R. Srinivasa, D. Channe Gowda, *J. Chem. Res. 2006, 2006, 534–535*.

[47] A. C. Kruegel, M. M. Gassaway, A. Kapoor, A. Váradi, S. Majumdar, M. Filizola, J. A. Javitch, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 21, 6754–6764*.

[48] S. Yoshida, M. Yamamoto, *Chem. Pharm. Bull. 1999, 47, 1154–1156*.

[49] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods 1983, 65, 55–63*.

[50] S. Dasari, P. B. Tchounwou, *Eur. J. Pharmacol. 2014, 740, 364–37*.

[51] A. M. Pereira, H. Cidade, M. E. Tiritan, *Molecules 2023, 28, 426*.