

Новые производные 6-азаурацила — амиды *as*-триазинкарбоновых кислот: синтез и их антимикробная активность

И. В. Алексеева, Л. И. Пальчиковская, С. Н. Харченко¹, Е. В. Башта¹,
М. О. Платонов, В. Г. Костина, Л. С. Усенко, Н. А. Лысенко, В. А. Малько¹

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹ Национальный аграрный университет Украины
Ул. Героев Оборона, 15, Киев, 03041, Украина

Используя основные положения концепции биоизостеризма синтезированы и исследованы три серии новых производных 6-азаурацила, отличающихся структурным мотивом спейсерного участка, связывающего гетероцикл с карбамидным фрагментом. Проведен скрининг полученных соединений по степени антимикробной активности на тестовых культурах бактерий, мицелиальных и дрожжеподобных грибов. Показано, что широкий спектр антимикробного действия обнаружен у производных 6-азаурацил-5-пропанкарбоновой и 6-азаурацил-5-тиоуксусной кислот.

Введение. Биоизостерические замены — это один из подходов, используемых в медицинской и биоорганической химии для рациональной модификации терапевтических средств в целях снижения их токсичности, повышения эффективности и, возможно, расширения спектра биологического действия.

6- и 5-азапиримидиновые основания являются классическими биоизостерами природных нуклеиновых оснований. Для них выполняется основное условие концепции биоизостеризма: подобие физико-химических свойств, предопределяемое как внешними (форма, пространственный объем молекулы), так и внутримолекулярными особенностями (распределение электронной плотности, конформационные и таутомерные переходы и т. д.) [1].

6-аза-аналоги (6-AzaU, 6-AzaT, 6-AzaC), полученные заменой СН-группы в пиримидиновом цикле на атом N, прекрасно иллюстрируют основное положение концепции — их способность к кон-

курентному взаимодействию (как субстрата или ингибитора) с теми же молекулярными мишенями, что и природные метаболиты. Для 5- и 6-азапиримидинов и их нуклеозидов установлен молекулярный механизм ингибиторного действия [2, 3].

Как известно, весьма разносторонними по биологическому действию (гербициды, фунгициды, инсектициды, кардиостатики) являются препараты, полученные на основе 6-азаурацила, модифицированного по положениям 2, 3 и 4 триазинового кольца [4—7]. Введение фармакофорных C5-заместителей (фенильного радикала, трет-бутильной, карбамидной и других группировок) во многих случаях способствует расширению спектра биологической активности гетероциклических оснований [4, 8].

Цель работы состояла в синтезе и изучении новых соединений 6-азаурацила, в структуре которых триазиновый гетероцикл связан с карбамидным фрагментом через спейсер. Исследовано влияние циклических фармакофорных групп, а также биоизостерических замен в спейсерном участке соединений на уровень и спектр биологической активности.

© И. В. АЛЕКСЕЕВА, Л. И. ПАЛЬЧИКОВСКАЯ, С. Н. ХАРЧЕНКО,
М. О. ПЛАТОНОВ, В. Г. КОСТИНА, Л. С. УСЕНКО,
Н. А. ЛЫСЕНКО, Е. В. БАШТА, В. А. МАЛЬКО, 2002

Материалы и методы. Соединения 1—3, их метиловые эфиры получены, как описано ранее [9—11]. Амиды монохлоруксусной кислоты приготовлены по стандартной методике [12] из хлорангидрида монохлоруксусной кислоты — реактив фирмы «Lancaster» (Англия). УФ спектры соединений сняты на приборе Specord-UVVIS (ФРГ) в этаноле, ПМР спектры записаны на спектрометре Varian VXR-300 (США) в дейтерированном диметилсульфоксиде. Контроль за ходом реакций и проверка чистоты синтезированных соединений проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Silufol UV-254 в системе растворителей — хлороформ:метанол, 9:1 (А), изопропанол:аммиак:вода, 7:1:2 (Б). Температуры плавления амидов определяли на столике Боззиуса (ФРГ).

Биологическую активность синтезированных соединений изучали против некоторых видов бактерий, дрожжеподобных и мицелиальных грибов, полученных из музея живых культур кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии факультета ветеринарной медицины НАУ Украины, а также выделенных в процессе наблюдения и лечения больных животных с признаками стафилодермии, диареи на фоне микозов. Использовали метод бумажных дисков и цилиндров [17, 18]. Концентрация веществ составляла 1%. В качестве контроля применяли коммерческий фунгицид «Клотримазол». Бактерицидную и фунгицидную активность веществ оценивали по отсутствию роста тест-культур. Повторность опытов — четырехкратная.

Синтез амидов с использованием эфира карбоновой кислоты (соединения 6—9, 17, 18). Высушенную в вакууме взвесь 2,5 ммоль эфира соединения 1 или 2а суспендировали в 2 мл (20 ммоль) амина и постепенно нагревали до температуры 140 °С. При этой температуре реакционную смесь выдерживали в течение 0,5—4 ч, периодически контролируя степень замещения эфира с помощью ТСХ. После окончания реакции смесь охлаждали, избыток амина удаляли в вакууме отгонкой с толуолом. Остаток кристаллизовали из подходящего растворителя. Характеристики полученных по этой методике соединений 6—9 приведены в табл. 1. Аналогично синтезировали амид 17 и гидразид 18, используя в первом случае раствор аммиака в метаноле, во втором — спиртовой раствор гидразин-гидрата. После выдерживания реакционной массы в течение соответственно 72 и 2 ч при комнатной температуре отфильтровывали достаточно чистые продукты.

Синтез амидов с использованием хлорангидрида карбоновой кислоты (соединения 10—14). К

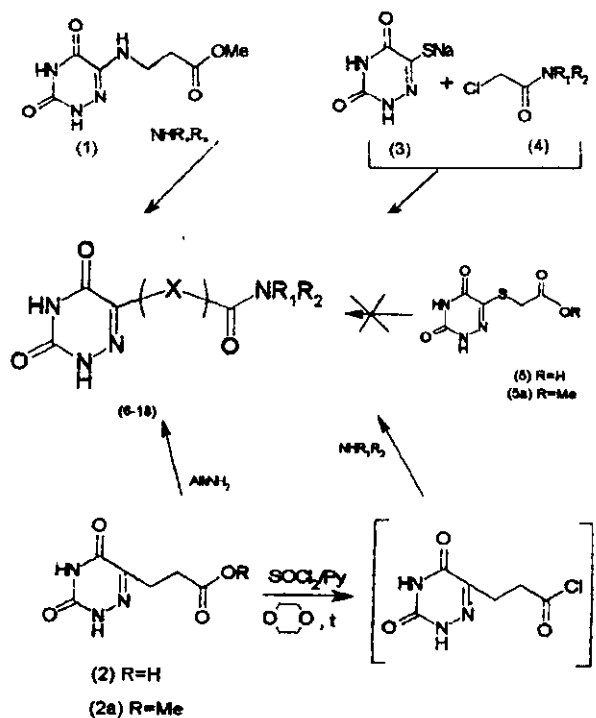





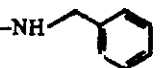



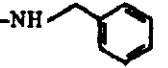


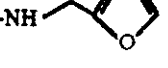
Схема синтеза амидов

суспензии кислоты 2 (1 ммоль) в 5—10 мл сухого диоксана прибавляли 1,5 ммоль хлористого тионила и 1,5 ммоль пиридина. Смесь взбалтывали при комнатной температуре в течение 15—20 мин до полного растворения кислоты. К образовавшемуся хлорангидриду добавляли 5,5 ммоль амина и оставляли на 12 ч. Затем удаляли растворитель и остатки амина отгонкой с толуолом. К остатку добавляли воду, образовавшийся осадок амида отфильтровывали и перекристаллизовывали из подходящего растворителя. Характеристики амидов 10—13 даны в табл. 1.

Синтез амидов (14—16) с помощью реакции конденсации 3 с 4. К раствору 20 ммоль натриевой соли соединения 3 в 5 мл воды добавляли водную эмульсию амида хлоруксусной кислоты (22 ммоль). Смесь перемешивали на магнитной мешалке при 40—50 °С в течение 2 ч. Выпавший осадок продукта реакции отделяли, затем промывали ледяной водой и кристаллизовали из воды или водного спирта. Выход 30—50%. Характеристики соединений приведены в табл. 1.

Результаты и обсуждение. Одним из удобных методов синтеза амидов является амидирование эфиров карбоновых кислот [12]. При кратковременном нагревании соединений 1 и 2а в диоксане с

Таблица 1
Некоторые характеристики синтезированных соединений

| Соединение | OX | NR1R2 | Выход, % | Тол., °С | ПМР, δ, м. д. | |
|------------|-----------------------------------|---|-------------|----------|--|--|
| | | | | | Химический сдвиг протонов | |
| | | | | | C5 заместителя | триазинового кольца |
| 6 | NH(CH ₂) ₂ |  | 50 | 108—110 | 6,333, т. (1H, NH-CH ₂) | 11,552, с. (1H, N1-H) 10,997, с. (1H, N3-H) |
| 7 | NH(CH ₂) ₂ |  | 45 | 202—204 | 6,344, т. (1H, NH-CH ₂) | 11,752, с. (1H, N1-H) 10,995, с. (1H, N3-H) |
| 8 | NH(CH ₂) ₂ |  | 50 | 262—264 | 6,098, т. (1H, NH-CH ₂) 8,023, т. (1H, CO-NH) | 10,945, уш. с. (2H, N1-H, N3-H) |
| 9 | NH(CH ₂) ₂ |  | 30 | 298—301 | 6,715 т. (1H, NH-CH ₂) 8,329 т. (1H, CO-NH) | 11,744, с. (1H, N1-H) 10,053, с. (1H, N3-H) |
| 10 | (CH ₂) ₂ |  | 59 | 182—185 | — | 11,887, с. (1H, N1-H, N3-H) |
| 11 | (CH ₂) ₂ |  | 59 | 215—219 | — | 12,001, уш. с. (2H, N1-H, N3-H) |
| 12 | (CH ₂) ₂ |  | 55 | 186—188 | 8,348, т. (1H, NH) | 12,048, с. (1H, N1-H) 11,872, с. (1H, N3-H) |
| 13 | (CH ₂) ₂ |  | 56 | 201—205 | 8,351, т. (1H, NH) | 12,118, с. (1H, N1-H) 11,954, с. (1H, N3-H) |
| 14 | SCH ₂ |  | 86 | 200—202 | — | 12,280, с. (1H, N1-H) 12,119, с. (1H, N3-H) |
| 15 | SCH ₂ |  | 71 | 250—254 | — | 12,262, с. (1H, N1-H) 12,109, с. (1H, N3-H) |
| 16 | SCH ₂ |  | 60 | 208—210 | 8,561, т. (1H, NH) | 12,304, с. (1H, N1-H) 12,119, с. (1H, N3-H) |
| 17 | SCH ₂ | NH ₂ | 78 | 270—271 | 7,602, 7,166 (2H, NH ₂) | 12,321, с. (1H, N1-H) 12,120, с. (1H, N3-H) |

гидразин-гидратом либо алифатическими аминами с высокими выходами проходит замещение спиртовой группы на остаток амина (схема). В случае менее нуклеофильных ароматических или вторичных аминов (например, пиперидина, морфолина) получить соответствующие амиды соединения 1 нам удалось, лишь проведя реакцию в жестких условиях, при значительном избытке определенного амина в отсутствие растворителя и при температуре 140 °С. Однако для реакции амидирования 2а морфолином, пиперидином и ароматическими аминами указанные условия оказались непригодными: методом ТСХ не было обнаружено продуктов замещения, а спектральный анализ (данные ПМР) подтвердил прошедшую деструкцию триазинового кольца. Аналогично 2а, метиловый эфир соединения 5 вступал в реакцию только с аммиаком и алкиламинами и не замещался вторичными аминами. В связи с этим наши дальнейшие исследования были направлены на выбор реагента и подбор условий для активации карбоксильной группы в соединениях 2 и 5, перевода ее в более реакционноспособное функциональное производное — хлорангидрид. Задача осложнялась тем, что необходимо было найти условия, исключающие по возможности замещение оксифункций гетероцикла на галоид [14, 15]. Для этого опробованы различные агенты и растворители и показано, что наиболее подходящим для соединения 2 оказалось использование хлористого тионила в системе диоксан—пиридин. Образующийся *in situ* хлорангидрид (без выделения) далее применяли для ацилирования соответствующих аминов. Выходы продуктов реакции (10—14) составляли 50—60 %. Подобранные условия мы попытались использовать и для получения амидов 6-азаурацил-тиоуксусной кислоты. Однако попытка получить хлорангидрид соединения 5 оказалась безуспешной: побочные процессы, затрагивающие реакционные центры гетероцикла, также приводили к полной деструкции соединения. Ввести карбамидный фрагмент в 3 нам удалось только с помощью так называемого «встречного синтеза», используя предварительно полученные амиды монохлоруксусной кислоты 4. Последние легко взаимодействуют с натриевой солью меркаптозамещенного триазина 3 с образованием ожидаемых продуктов 14—16.

Полученные амиды трех серий — бесцветные кристаллические вещества с высокими температурами плавления, их строение и состав подтверждены данными УФ и ПМР спектров.

Закономерности, проявляющиеся в электронных спектрах амидов, аналогичны основным закономерностям, наблюдаемым в спектрах эфиров со-

ответствующих триазинкарбоновых кислот [9, 16]. Максимумы УФ поглощения для 10—13, 18 четко выражены и лежат в области 260—263 нм (как и для 6-азаТ). В случае амидов 6—9 и 14—17, у которых гетероатом спейсера непосредственно связан с двойной связью триазинового кольца, полосы поглощения УФ спектров смещены [9] и регистрируются в интервале 307—310 нм. Данные спектров ПМР уточняют структуру полученных соединений. Отметим, что синглеты протонов при циклических атомах азота характеризуются высокими значениями химических сдвигов и лежат в области 11,0—12,0 м. д.

Резонансные сигналы амидных протонов в спектрах соединений 8, 9, 12—14, 16 находятся под значительным влиянием заместителя NR₂ и карбонильной группы, что выражается в их смещении в слабое поле на ~1,0 м. д. относительно сигналов протонов незамещенного амида 17. Дезэкранируясь, амидные протоны приобретают большую подвижность (усиливаются кислотные свойства соответствующих групп), что может, вероятно, найти отражение в проявлении биологического действия. В то же время положения сигналов протонов метиленовых групп спейсерного участка остаются идентичными таковым у исходных триазинкарбоновых кислот [9, 11, 16].

Одной из основных задач представленной работы было выяснение взаимозависимости структура—активность в ряду вышеописанных соединений. Наше исследование сконцентрировано на определении влияния двух структурных элементов — спейсерного участка и карбамидного фрагмента на уровень антимикробного действия амидов.

В связи с этим проведен скрининг трех серий соединений: амидов 6-азаурацил-5-аминопропионовой кислоты (6—9, серия I), 6-азаурацил-5-пропанкарбоновой кислоты (10—13 и 18, серия II) и 6-азаурацил-5-тиоуксусной кислоты (14—17, серия III) на тест-культурах некоторых видов бактерий, мицелиальных и дрожжеподобных грибов. Амидный фрагмент у вышеперечисленных кислот представлен остатками морфолина, пиперидина, бензиламина, фурфуриламина и гидразина.

Результаты исследования сведены в табл. 2, из которой видно, что довольно высокую антимикробную активность относительно исследованных тест-объектов проявляют производные второй и третьей серий. Препараты обладают достаточно широким спектром антибактериального действия, а также избирательной фунгицидной активностью. В то же время в группе препаратов первой серии заметной антибактериальной активности не выявлено. В ряде случаев отмечено достаточно выраженное ингиби-

Таблица 2
Антимикробная активность синтезированных амидов (метод бумажных дисков)

| Тест-культуры | Клотри-мазол (контроль) | Диаметр зоны угнетения роста, мм | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|----|----|--------------------------|----|----|
| | | Фуффуриламиды, соединение № | | | Пиперидиды, соединение № | | |
| | | 8 | 12 | 16 | 7 | 11 | 15 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P | — | — | 10 | 20 | — | — | 20 |
| <i>Staphylococcus epidermitis</i> | — | — | 10 | 16 | 8 | — | 10 |
| <i>Micrococcus lysodeicticus</i> | — | — | — | 10 | — | — | — |
| <i>Bacillus subtilis</i> | — | — | 10 | 10 | — | 10 | 10 |
| <i>Bacillus cereus</i> 1477 | — | — | 10 | 16 | — | — | 10 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | — | — | 10 | — | — | — | — |
| <i>Corynebacterium michiganense</i> | — | — | 10 | 16 | — | 10 | 10 |
| <i>Serratia marcescens</i> | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Candida albicans</i> | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Fabospora fragelii</i> | — | 20 | 10 | 10 | — | 10 | — |
| <i>Geotrichum candidum</i> | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Penicillium cyclopium</i> | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Fusarium culmorum</i> | — | — | 20 | 20 | — | — | 20 |
| <i>Alternaria alternata</i> | 10 | — | — | — | — | — | — |
| <i>Chaetomium</i> | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Trichothecium roseum</i> | 20 | — | — | — | — | — | — |

| Тест-культуры | Клотри-мазол (контроль) | Морфолиды, соединение № | | | Бензиламида, соединение № | | Гидразид, соединение № |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|----|----|---------------------------|----|------------------------|
| | | 6 | 10 | 14 | 9 | 13 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P | — | — | — | — | — | — | 10 |
| <i>Staphylococcus epidermitis</i> | — | — | — | — | — | — | 20 |
| <i>Micrococcus lysodeicticus</i> | — | — | — | — | 6 | — | 20 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | — | — | — | — | — | 10 | 16 |
| <i>Bacillus cereus</i> 1477 | — | — | — | — | — | 10 | 20 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Corynebacterium michiganense</i> | — | — | — | — | 10 | 10 | 16 |
| <i>Serratia marcescens</i> | — | — | — | — | — | — | 10 |
| <i>Candida albicans</i> | — | 20 | — | — | — | — | — |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | — | — | — | 10 | — | — | — |
| <i>Fabospora fragelii</i> | — | — | — | — | 8 | 10 | 10 |
| <i>Geotrichum candidum</i> | — | — | — | — | — | — | 20 |
| <i>Penicillium cyclopium</i> | — | 20 | 30 | — | — | — | — |
| <i>Fusarium culmorum</i> | — | — | — | 20 | 16 | — | 20 |
| <i>Alternaria alternata</i> | 10 | — | — | — | — | — | 8 |
| <i>Chaetomium</i> | — | — | — | — | — | — | 10 |
| <i>Trichothecium roseum</i> | 20 | — | — | — | — | 20 | 20 |

Примечание. ← — отсутствие антимикробного действия синтезированных соединений.

рующее действие в отношении дрожжей и дрожжеподобных грибов. Что касается отдельных соединений, то наиболее активными оказались гидразид триазинпропанкарбоновой кислоты (соединение 18), проявивший самый широкий спектр как антибактериального, так и фунгицидного действия, а также фурфуриламиды 12 и 16.

Анализ полученных данных показывает, что спейсерный участок из трех звеньев является наиболее выгодным для реализации активной структуры биоизостера. Замена одного метиленового звена на атом серы в производных третьей серии не является критической для активности из-за подобия физических свойств этих биоизостеров (электроотрицательность и ван-дер-ваальсовы радиусы их практически совпадают). Увеличение спейсерной цепи на одно звено за счет введения биоизостерической NH-группы (I серия), как показывают результаты скрининга, приводит к усилению селективности антимикробного действия.

Таким образом, структурный мотив рассмотренных элементов триазинкарбоновых кислот является актуальным, по нашему мнению, для дальнейшего дизайна биологически активных соединений.

I. V. Alexeeva, L. I. Palchikovskaya, S. N. Harchenko, E. V. Baschta, M. O. Platonov, V. G. Kostina, L. S. Usenko, N. A. Lysenko, V. A. Malko

New 6-azauracil derivatives — amides of as-triazine carbon acids: their synthesis and antimicrobial activity

Summary

Three series of new 6-azauracil derivatives, differing by structural motives of the spacer linking a heterocycle with carbamide fragments have been synthesized and researched on the basic principles of bioisosterism concept. The antimicrobial activity of these new compounds has been detected in test-cultures of bacteria, micelial and yeast-like fungi. The results obtained indicate that the 6-azauracil-5-propanic and 5-thioacetic acid derivatives can be modified to enhance significantly their antibacterial potency.

I. В. Алексеева, Л. Г. Пальчиковська, С. Н. Харченко, О. В. Башта, М. О. Платонов, В. Г. Костина, Л. С. Усенко, Н. А. Лисенко, В. А. Малько

Нові похідні 6-азаурацилу — аміди ас-триазинкарбонових кислот: синтез і їхня антимікробна активність

Резюме

Застосовуючи основні положення концепції біоізостеризму синтезовано та досліджено три серії нових похідних 6-азаурацилу, які відрізняються структурним мотивом спейсерної ділянки, що з'єднує гетероцикл з карбамідним фрагментом. Скринінг

одержаних сполук на тест-культурах бактерій, міцеліальних та дріжджоподібних грибів показав, що широкий спектр антимікробної дії проявляють похідні 6-азаурацилпропанкарбонової та тіооцтової кислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Patani G. A., La Voie E. I. Bioisosterism: A rational approach in drug design // Chem. Rev.—1996.—96.—P. 3147—3176.
2. Преображенская М. Н., Мельник С. Я. Аналоги компонентов нуклеиновых кислот — ингибиторы нуклеинового обмена.—М.: ВИНТИ, 1984.—С. 59—78 (Итоги науки и техники. Биоорг. химия; Т. 1.)
3. Skoda J. Mechanism of action and application of azapyrimidines // Progr. Nucl. Acid Res.—1963.—2.—P. 197—218.
4. Справочник по пестицидам / Под ред. Н. Н. Мельникова, К. В. Новожилова, С. Р. Белана и др.—М.: Химия, 1985.—352 с.
5. Pat. BDR N 2138031., CA. Herbicidal as-triazin-5-ones / W. Draber, K. Diskore, H. Timmer // Publ. 1978.
6. Nalepa K., Bekarek V., Slouka J. Reaction of some derivatives of 1,2,4-triazine with organomagnesium halides, hydrogen peroxide and thioceosol // J. Pract. Chem.—1972.—314, N 5—6.—P. 477—478.
7. Bennett G. B., Mason R. B., Alden J., Roach J. B. Synthesis and anti-inflammatory activity of trisubstituted pyrimidines and triazines // J. Med. Chem.—1978.—21.—P. 623—628.
8. Pat. USA N 4636508. 5-Pyrimidine-carboxyamides and treatment of leukemia therewith / A. D. Brewer, J. A. Minatelli // Publ. 1987.
9. Огняник С. С., Тарнавский С. С., Сикора Л. И., Алексеева И. В. Синтез и спектроскопическое исследование 3-тио-6-алкиламино-замещенных 1,2,4-триазинонов-5 // Укр. хим. журн.—1988.—54, № 11.—С. 1197—1199.
10. Воек М., Farkas J., Gut J. An improved synthesis of 6-azauracil and its 5-substituted derivatives // Coll. Czech. Chem. Commun.—1967.—32.—P. 1295—1298.
11. Cristescu C., Marcus J. Derivate des 3,5 dihydro-,1,2,4,-triazins (6-azauracils) mit mutmaßlicher cytotatischer Wirkung (I) // Pharmazie.—1961.—16.—P. 135—137.
12. Вейланд-Хильгемат. Методы эксперимента в органической химии.—М., Химия, 1969.—944 с.
13. Cristescu C. as-triazine derivatives with potential therapeutic action. X. 6-Carboxyhydrazide-as-triazines // Rev. roum. chim.—1970.—15, N 9.—P. 1409—1414.
14. The chemistry heterocyclic compounds / Ed. H. Neunhoeffer, P. Willey.—New York: Chichester Intersci., 1973.—Vol. 33.—1075 p.
15. Tayler E. C., Martin S. F. Synthesis of some 7-aryl-6-azapteridines from 1,2,4-triazine intermediates // J. Org. Chem.—1972.—37, N 24.—P. 3958—3960.
16. Алексеева И. В., Шаламай А. С. Туров А. В. Чернецкий В. П. 5-Аминозамещенные N-метил-6-азаурацилы // Укр. хим. журн.—1978.—43, № 10.—С. 1063—1069.
17. Бидай В. И. Экспериментальная микология.—Киев: Наук. думка, 1982.—395 с.
18. Харченко С. Н., Литвин В. П., Тарабара И. Н. Справочник по микозам и митоксикозам сельскохозяйственных животных.—Киев: Урожай, 1982.—168 с.

УДК 547.872+963.32:632.952
Надійшла до редакції 29.06.2000