

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ НАН УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ



Рік заснування – 1966

ЖУРНАЛ
ОРГАНІЧНОЇ ТА
ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ХІМІЇ



JOURNAL
OF ORGANIC AND
PHARMACEUTICAL CHEMISTRY



ЖУРНАЛ
ОРГАНИЧЕСКОЙ И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

2014 – том 12, выпуск 1(45)

Харків
НФаУ

Головні редактори В.І.Кальченко (Київ)
В.П.Черних (Харків)
Заступники головного редактора І.С.Гриценко (Харків)
М.В.Вовк (Київ)
Відповідальні секретарі Т.А.Костіна (Харків)
Т.І.Таранушина (Київ)

Редакційна колегія:

П.О.Безуглий (Харків), В.С.Броварець (Київ), Ж.Ф.Буйон (Руан, Франція),
В.А.Георгіянц (Харків), О.І.Гризодуб (Харків), А.М.Демченко (Київ),
В.Д.Дяченко (Луганськ), В.А.Загорій (Київ), А.Я.Ільченко (Київ),
С.М.Коваленко (Харків), В.М.Ковальов (Харків), В.О.Ковтуненко (Київ),
М.І.Короткіх (Донецьк), О.М.Костюк (Київ), В.П.Новіков (Львів),
М.Д.Обушак (Львів), В.Д.Орлов (Харків), В.Ю.Пашинник (Київ),
А.Д.Синиця (Київ), О.Б.Смолій (Київ), В.І.Станінець (Київ),
А.О.Толмачов (Київ), І.В.Українець (Харків), А.А.Фокін (Київ),
О.П.Швайка (Донецьк), Л.А.Шемчук (Харків), Ю.Л.Ягупольський (Київ)

Редакційна рада:

С.А.Андронаті (Одеса), І.С.Антипін (Казань), О.М.Біловол (Харків),
О.О.Варнек (Страсбург, Франція), Ю.М.Воловенко (Київ), С.М.Десенко (Харків),
Б.С.Зіменковський (Львів), Г.Л.Камалов (Одеса), А.Катрицькі (Гайнесвіл, США),
А.Катц (Берклі, США), В.П.Кухар (Київ), А.Хаас (Бохум, Німеччина),
В.П.Хиля (Київ), Ю.Г.Шермолевич (Київ), О.В.Шишкін (Харків)

У журналі розглянуті проблеми синтезу та аналізу органічних та елементоорганічних сполук, аналогів природних сполук і лікарських субстанцій, результати фізико-хімічних досліджень у вищезазначених напрямках.

Для працівників науково-дослідних установ, вищих навчальних закладів та фахівців хімічного, фармацевтичного, біологічного, медичного і сільськогосподарського профілю.

“Журнал органічної та фармацевтичної хімії” за рішенням ВАК України внесено до переліку видань, рекомендованих для публікації матеріалів дисертацій зі спеціальностей: органічна хімія, елементоорганічна хімія, фармацевтична хімія і фармакогнозія (хімічні науки — постанова ВАК №1-05/1 від 10.02.2010 р.; фармацевтичні науки — постанова ВАК №1-05/2 від 10.03.2010 р.).

Затверджено до друку Вченою радою Інституту органічної хімії НАН України, протокол №2 від 24.02.2014 р.

Затверджено до друку Вченою радою Національного фармацевтичного університету, протокол №7 від 13.02.2014 р.

Адреса для листування: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, Національний фармацевтичний університет, редакція “Журналу органічної та фармацевтичної хімії”, тел./факс (57) 706-30-63. E-mail: press@ukrfa.kharkov.ua

Передплатні індекси: для індивідуальних передплатників — 08383, для підприємств — 08384

Свідоцтво про державну реєстрацію серії КВ №7392 від 05.06.2003 р.

Підписано до друку 06.03.2014 р. Формат 60x84 1/8.

Папір офсетний. Друк ризо. Умовн. друк. арк. 9,3. Обліков.-вид. арк. 10,76. Тираж 130 прим.

Літературні редактори — О.Ю.Гурко, А.Л.Краснікова. Комп'ютерна верстка — О.М.Білинська.

Видавництво Національного фармацевтичного університету

“Журнал органічної та фармацевтичної хімії”. Том 12, випуск 1 (45), 2014

ISSN 2308-8303

© Національний фармацевтичний університет, 2014

УДК 547.744 + 544.473 + 544.122.3

(S)-(+)-1-(2-піролідинілметил)піролідин – ЕФЕКТИВНИЙ ОРГАНОКАТАЛІЗАТОР АСИМЕТРИЧНОГО СИНТЕЗУ

В.М.Ткачук, В.М.Шоба, В.А.Сукач, М.В.Вовк

Інститут органічної хімії НАН України
02660, м. Київ, вул. Мурманська, 5. E-mail: mvovk@ioch.kiev.ua

Ключові слова : асиметричний органокаталіз; 2-(S)-(+)-1-(2-піролідинілметил)піролідин; альдольна конденсація; реакції Міхаеля та Манніха

Вперше систематизовані та узагальнені літературні джерела, які відносяться до сфери застосування 2-(S)-(+)-1-(2-піролідинілметил)піролідину як ефективного органокаталізатора асиметричних реакцій. Визначена роль залишку третинного аміну в структурі даного каталізатора, яка полягає у створенні асиметричного оточення в перехідному стані ключової стадії формування нового хірального центру. Відзначена важливість кислот Бренстеда як промоторів (добавок), які протонують основний атом нітрогену, перетворюючи його на донорну систему. Детально розглянута каталізована 2-(S)-(+)-1-(2-піролідинілметил)піролідином альдольна конденсація, яка по праву є одним із найважливіших інструментів у синтезі різноманітних типів оптично активних органічних сполук. Продемонстровано потужний каталітичний потенціал (S)-(+)-1-(2-піролідинілметил)піролідину в асиметричній версії реакції Міхаеля, яка не тільки дозволяє утворювати одинарні C – C зв'язки, але й генерувати нові асиметричні центри в органічних молекулах. Значна увага в огляді зосереджена на використанні (S)-(+)-1-(2-піролідинілметил) піролідину в реалізації асиметричного варіанту реакції Манніха як зручного методу синтезу оптично активних β-амінокетонів та естерів, які є попередниками ряду важливих нітрогеномісних природних сполук.

(S)-(+)-1-(2-PYRROLIDINYLMETHYL)PYRROLIDINE – AN EFFECTIVE CATALYST OF ASYMMETRIC SYNTHESIS

V.M.Tkachuk, V.M.Shoba, V.A.Sukach, M.V.Vovk

Key words: asymmetric organocatalyst; (S)-(+)-1-(pyrrolidinylmethyl)-pyrrolidine; aldol condensation; Michael reaction, Mannich reaction

The literature sources concerning application of 1-(pyrrolidin-2-ylmethyl)pyrrolidine as an effective organocatalyst of asymmetric reactions have been reviewed and systematized. The role of the tertiary amine fragment in the structure of the catalyst has been emphasized; it makes an asymmetric arrangement in the transition state of the key step during the new C-C bond formation. The importance of Bronsted acid as a promoter (additive), which protonates the basic nitrogen atom transforming it to the N-H-donor system, has been noted. Aldol condensation catalyzed by 1-(pyrrolidinyl-2-ylmethyl)pyrrolidine that can be undoubtedly considered as one the most valuable tools in asymmetric synthesis and construction of various optically active organic frameworks has been reviewed in details. A powerful catalytic activity of 1-(pyrrolidinyl-2-ylmethyl)pyrrolidine in the Mannich reaction leading to a new C-C bond and chiral centre creation has been demonstrated. A significant attention in the review is devoted to application of 1-(pyrrolidin-2-ylmethyl)pyrrolidine in the asymmetric version of the Mannich reaction as a convenient approach for the synthesis of chiral β-amino ketones and β-amino esters being well known as useful building blocks and precursors for important nitrogen-containing natural products and heterocycles.

(S)-(+)-1-(2-ПІРРОЛІДИНИЛМЕТИЛ)ПІРРОЛІДИН – ЭФФЕКТИВНЫЙ КАТАЛИЗАТОР АСИМЕТРИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

В.Н.Ткачук, В.М.Шоба, В.А.Сукач, М.В.Вовк

Ключевые слова: асимметрический органокаталіз; 2-(S)-(+)-1-(2-пірролідинілметил)пірролідин; альдольна конденсація; реакції Міхаеля та Манніха

Впервые систематизированы и обобщены литературные источники, которые относятся к сфере применения 2-(S)-(+)-1-(2-пірролідинілметил)-пірролідина как эффективного органокаталізатора асимметрических реакций. Определена роль остатка третичного амина в структуре каталізатора, которая состоит в создании асимметрического окружения в переходном состоянии ключевой стадии формирования нового хірального центра. Отмечена важность кислот Бренстеда как промоторов (добавок), которые протонируют основной атом азота, превращая его в N-H-донорную систему. Подробно рассмотрена каталізованная 2-(S)-(+)-1-(2-пірролідинілметил) пірролідином альдольная конденсація, которая по праву является одним из наиболее важных инструментов в синтезе разнообразных типов оптически активных органических соединений. Продемонстрирован мощный каталітический потенциал 2-(S)-(+)-1-(2-пірролідинілметил)пірролідина в асимметрической версии реакции Міхаеля, которая не только позволяет образовывать одинарные C-C связи, но и генерировать новые асимметрические центры в органических молекулах. Значительное внимание сосредоточено на использовании 2-(S)-(+)-1-(2-пірролідинілметил)пірролідина в реализации асимметрического варианта реакции Манніха как удобного метода синтеза оптически активных β-амінокетонів и эфиров, которые являются предшественниками важных азотсодержащих природных соединений.

Асиметричний органокатализ – новий перспективний напрямок тонкого органічного синтезу, пов'язаний із використанням для прискорення перебігу асиметричних хімічних реакцій низькомолекулярних органічних сполук, які не містять у своєму складі елементів металів. Системні дослідження органокаталітичних реакцій розпочались приблизно 15 років тому, а сам термін «органокатализ» був запропонований МакМілланом у 2000 р. [1]. З того часу предметом вивчення стало понад 150 різноманітних типів реакцій, які ефективно каталізуються у присутності низькомолекулярних хіральних органічних сполук і дозволяють розробляти нові методики синтезу енантіомерно чистих продуктів. Перевага органокаталізу над класичним енантіоселективним металоорганічним катализом очевидна: він є більш зручним, економічно вигідним та екологічно безпечнішим методом. Разом з тим, одним із недоліків органокаталізу є потреба у відносно великій кількості катализатора (5-20%) та чутливість до структури субстратів.

Функціональна роль органокатализатора полягає як в активації електрофільного або нуклео-

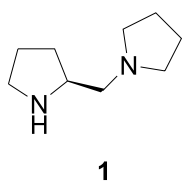


Схема 1

фільного субстрату, так і у створенні асиметричного середовища, відповідального за надання хіральності цільовим продуктам. За характером взаємодії із субстратом органокатализатори класифікують на ковалентні та нековалентні. В першому випадку спостерігається утворення ковалентного зв'язку між катализатором та субстратом, а в другому активація субстрату відбувається через формування водневих або іонних зв'язків. Типовими представниками ковалентних катализаторів є аміносполуки та карбени, а нековалентних – тіосечовини, органофосфорні кислоти та цинхонові алкалоїди.

Серед найвідоміших ковалентних хіральних органокатализаторів безперечним лідером за спектром застосування є амінокислота пролін та її похідні. Каталітичні реакції за їх участю стали предметом дослідження значної кількості оригінальних праць, декількох важливих оглядових статей [2-8] та монографії [9].

Разом з тим варто зазначити, що за останні 5 років значно зросло застосування як органокатализаторів оптично активних похідних піролідину. Для подальшого інтенсивного розвитку цієї області органокаталізу виникла об'єктивна потреба в узагальненні та систематизації значної кількості наявних літературних джерел.

Саме тому предметом поданого огляду є аналіз асиметричних органокаталітичних перетворень під дією найефективнішого катализатора із ряду 2-гетерилметилпіролідинів – 2-(S)-(+)-1-(2-пі-

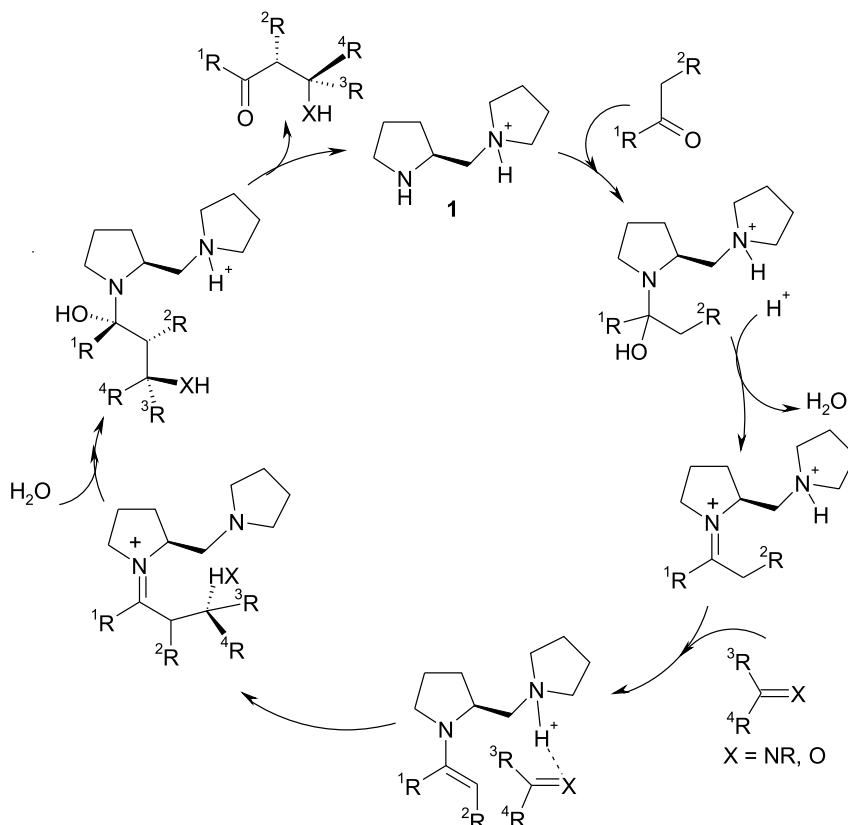


Схема 2

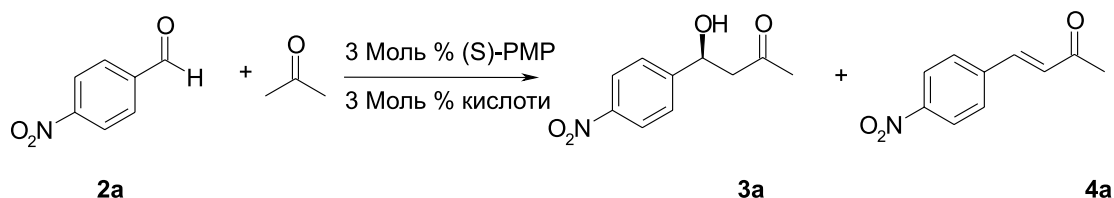


Схема 3

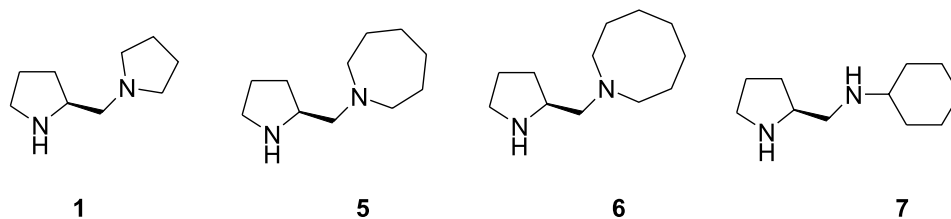


Схема 4

ролідинілметил)-піролідину [(S)-PMP] **1**. Він вперше був синтезований у 1973 р. [10] і на теперішній час є комерційно доступним продуктом.

Загальна схема 2 демонструє каталітичний цикл за участю (S)-PMP, ключовою стадією якого є формування енамінного інтермедіату. Функція залишку третинного аміну в структурі діаміну **1** полягає у створенні асиметричного оточення в перехідному стані ключової стадії утворення нового хірального центру. При цьому особливо важливою є роль кислоти Бренстеда як промотора (добавки), яка протонує основний атом нітрогену, перетворюючи його на донор водневого зв'язку.

1. Альдольна конденсація

Альдольна конденсація – це процес взаємодії двох карбонільних сполук з утворенням β-кетоспиртів, які можуть піддаватись дегідратації і утворювати α,β-ненасичені карбонільні сполуки. Можливість утворення асиметричного центру виділяє таку конденсацію як один з найважливіших інструментів у синтезі різноманітних типів оптично активних органічних сполук.

1.1. Альдольна конденсація аліфатичних кетонів з ароматичними альдегідами

Вперше у 2001-2002 рр. японськими дослідниками [11, 12] була вивчена каталітична активність низки хіральних діамінів у комбінації з різними протонними кислотами в асиметричному варіанті альдольної конденсації *n*-нітробензальдегіду **2a** з ацетоном, яка приводить до утворення β-кетоспирту **3a** та незначної домішки α,β-ненасиченої карбонільної сполуки **4a** (схема 3).

Серед апробованих сполук найвищу каталітичну здатність проявили діаміни **1, 5-7** (схема 4).

Було показано, що найкращі результати отримуються при співвідношенні кислота : діамін 1:1, а найефективнішою із різноманітних кислотних добавок **8-13** є 2,4-динітробензолсульфо кислота **11** (вихід **3a** = 63 %, *ee*=83 %) (табл. 1).

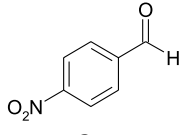
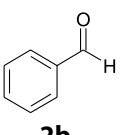
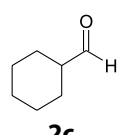
З метою порівняння активності каталітичних систем **1(5, 6, 7) : 11** = 1 : 1 також були проведені альдольні конденсації ацетону з бензальдегідом **2b** та циклогексилкарбальдегідом **2c**. Отримані результати (табл. 2) свідчать, що (S)-PMP є досить ефективним каталізатором у випадку *n*-нітробенз-

Таблиця 1

Кислота	TsOH·2H ₂ O 8	Tf ₃ CH·2H ₂ O 9	 10
Вихід 3a ,%	28	27	6
<i>ee</i> 3a ,%	72	84	18
Кислота	 11	 12	 13
Вихід 3a ,%	63	31	23
<i>ee</i> 3a ,%	83	61	61

Ts = 4-MeC₆H₄SO₂, Tf = CF₃SO₂

Таблиця 2

Каталітична система	 2a		 2b		 2c	
	Вихід 3a , %	<i>ee</i> 3a , %	Вихід 3b , %	<i>ee</i> 3b , %	Вихід 3c , %	<i>ee</i> 3c , %
1 : 11 = 1 : 1	61	83	6	80	Тільки 4c	
5 : 11 = 1 : 1	72	93	13	91		
6 : 11 = 1 : 1	50	84	7	76		
7 : 11 = 1 : 1	81	81	58	74	64	80

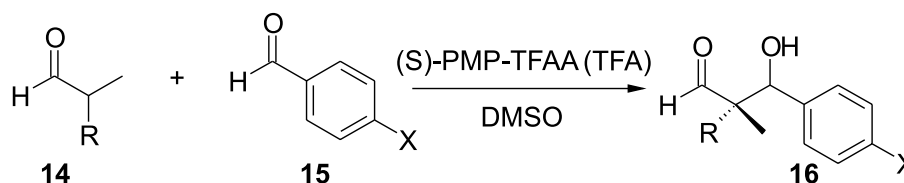


Схема 5

альдегіду **2a**, натомість вихід продуктів **3b** та **3c** у реакціях за його участю значно менший, а найкращу каталітичну здатність показав діамін **7**.

Результатом подальших досліджень [12] стала розробка нової каталітичної системи (S)-PMP-TfOH, яка сприяє діастереоселективній альдольній конденсації *n*-нітробензальдегіду **2a** з діетилкетонном, циклогексаном та циклопентаном з високими енантімерними надлишками (*ee*=84-96%). В той же час каталізована (S)-PMP альдольна конденсація бензальдегідів з кетонами у водному середовищі [13, 14] характеризується відсутністю діастереоселективності.

1.2. Альдольна конденсація аліфатичних та ароматичних альдегідів

Встановлено, що альдольна конденсація аліфатичних альдегідів **14** з *para*-заміщеними бензальдегідами **15** ефективно каталізується (S)-PMP в присутності добавок трифторооцтового ангідриду (TFAA) [15] або трифторооцтової кислоти (TFA) [16, 17]. Наведені у табл. 3 [15] вихід та енантімерний надлишок продуктів реакції **16** показу-

ють, що просторові замісники у структурі альдегіду **14** суттєво підвищують діастерео- та енантіоселективність реакції (схема 5).

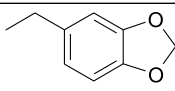
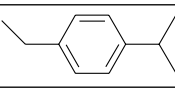
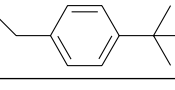
1.3. Внутрішньомолекулярна альдольна конденсація

У 2000 р. було описано каталізоване (S)-PMP асиметричне анелювання за Робінсом трикетону **17** з утворенням дикетону Віланда-Мішера **18** [18]. Нещодавно японські хіміки показали [19], що наявність кислотної добавки суттєво впливає на результат цієї реакції. Зокрема, в присутності TFAA з достатньо високим виходом та енантіоселективністю утворюється *R*-енантіомер **18** (вихід=53%, *ee*=81%), натомість за відсутності кислоти із незначним енантімерним надлишком переважає *S*-ізомер **18** (схема 6).

1.4. Гомоальдольна конденсація

Перша спроба авторів [20] здійснити органо-каталітичну гомоальдольну конденсацію етилпірувату **19** у присутності L-проліну закінчилась невдачею: субстрат реагував з каталізатором з утворенням відповідного азометин-іліду, який,

Таблиця 3

R	X	Вихід 16 , %	<i>ee</i> 16 , %	R	X	Вихід 16 , %	<i>син:анти</i>	<i>ee</i> 16 ^{**} , %
Me	NO ₂	93	35	Et	NO ₂	96	38:62	75/91
Me	NO ₂	94	95	Pr	NO ₂	92	34:66	66/89
Me	CN	95	92		NO ₂	91	23:77	53/90
Me	OMe	40	93		NO ₂	91	16:84	74/95
Me	H	32	96		NO ₂	97	15:85	53/90

* – реакція без добавки TFAA; ** – енантімерний надлишок *син*- та *анти*-ізомерів.

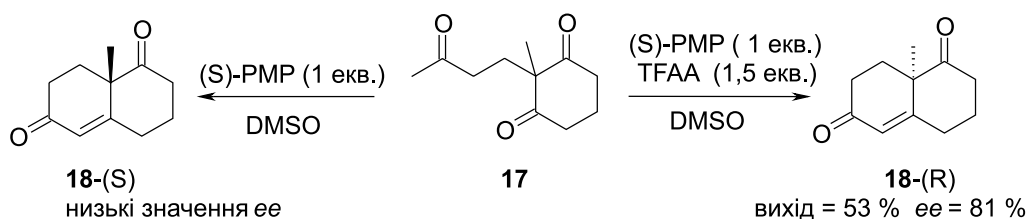


Схема 6

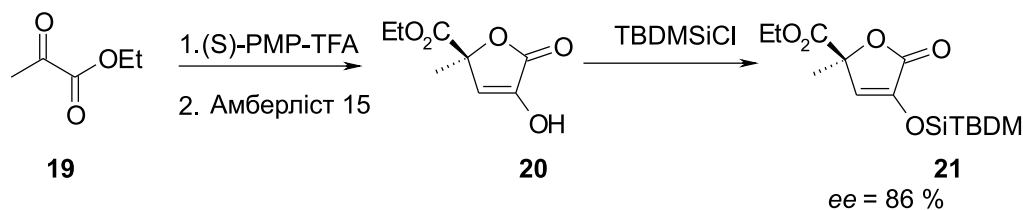


Схема 7

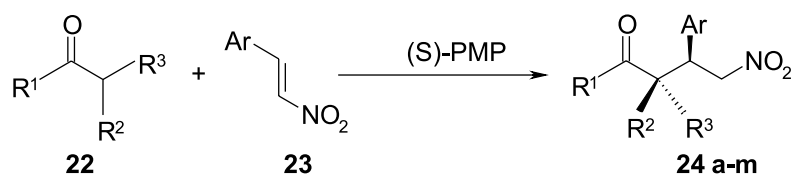


Схема 8

у свою чергу, вступає у реакцію 1,3-дипольного циклоприєднання зі ще однією молекулою піривату. Однак при використанні системи (S)-PMP-TFA з наступною обробкою реакційної суміші полімерною сульфокислотою Амберліст 15 та *трет*-бутилдиметилсилілхлоридом (TBDMSiCl) у присутності імідазолу як основи вдалось отримати з високим енантімерним надлишком продукт самоконденсації етилпіривату – *O*-силільовану ізотетронову кислоту **21** (схема 7).

2. Реакція Міхаеля

Асиметричний варіант реакції Міхаеля є важливим інструментом тонкого органічного синтезу, який дозволяє не тільки утворювати нові одинарні С-С зв'язки шляхом приєднання вуглецевих нуклеofilів до активованих подвійних С=C зв'язків, але й генерувати нові асиметричні центри в органічних молекулах. Впродовж останніх років опублікована значна кількість праць із використання (S)-PMP **1** в ролі каталізатора асиметричної реакції Міхаеля, які прокласифіковані нами у відповідності до типу субстрату.

2.1. Реакція Міхаеля за участю нітроолефінів та нітродієнів

Нітрогрупа достатньо сильно активує подвійний зв'язок, що в більшості випадків дозволяє провести органокаталітичну реакцію Міхаеля за участю нітроалкенів з досить високим виходом навіть без добавки кислоти [21-26]. Однак, у разі α,α -діалкілальдегідів **22** реакція перебігає тільки в присутності 20 моль % TFA (табл. 4, умова *в*) [22]. Загалом, модифікація ароматичного ядра в акцепторі Міхаеля **23** слабо впливає на вихід та

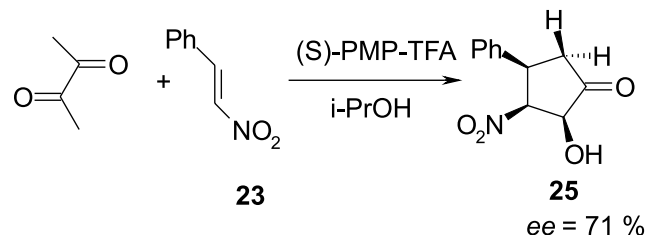


Схема 9

енантімерний надлишок продукту **24** (табл. 4, **24d**, **24e**, **24k-m**). Найкращі результати вдалось отримати у випадку α -кетосульфаміду (табл. 4, **24m**, *ee* = 97 %), що, очевидно, обумовлено підвищеною кислотністю α -атома водню (схема 8).

Вельми цікавим у синтетичному аспекті є каталізована (S)-PMP внутрішньомолекулярна тандемна реакція Міхаеля-Генрі між діацетилом та нітrostиролом **23**, яка приводить до енантімернозбагаченого 2-гідрокси-3-нітроциклопентанону **25** [27] (схема 9).

Іншим важливим типом акцепторів Міхаеля є нітродієн **26** та нітроєнін **27**. При дослідженні реакції альдегіду **14** із вказаними акцепторами в присутності (S)-PMP авторам [24] вдалось одержати продукти приєднання **28** та **29** із досить високим значенням *ee* (схема 10).

2.2. Реакція Міхаеля α,β -ненасичених карбонільних сполук

Барбас із співр. [21, 28] при вивченні реакції ацетону та циклічних кетонів **30** із бензальмалонатами **31** у присутності (S)-PMP при кімнатній температурі встановили, що найвища енантіоселективність спостерігається в разі *o*-CF₃-бензальмалонату (для продукту приєднання **32c** *ee*=70%).

Таблиця 4

Сполука	R ¹	R ²	R ³	Ar	Умови	Вихід 24 , %	син:анти	еє, %
24a ^[21]	Me	H	H	Ph	а	81	–	35
24b ^[21]	–(CH ₂) ₃ –		H	Ph	а	78	4:1	78:71*
24c ^[21]	–(CH ₂) ₄ –		H	Ph	а	21	98:2	73
24d ^[21]	–(CH ₂) ₄ –		H	2-CF ₃ -C ₆ H ₅	б	84	98:2	70
24e ^[21]	–(CH ₂) ₄ –		H	4-MeO-C ₆ H ₅	б	60	98:2	88
24f ^[21]	H	(CH ₃) ₂ CH	H	Ph	а	80	4:1	75
24g ^[22]	H	Me	Me	Ph	в	87	–	80
24h ^[22]	H	Et	Me	Ph	в	94	3:1	81:75*
24i ^[22]	H	Pr	Me	Ph	в	95	3:1	86:67*
24j ^[22]	H	4-(<i>i</i> -Pr)Bn	Me	Ph	в	75	1:1	65:65*
24k ^[23]	Me	NHTs	H	Ph	г	80	85:15	90
24l ^[23]	Me	NHTs	H	4-Me-C ₆ H ₅	г	85	86:14	93
24m ^[23]	Me	NHTs	H	3,4-(CH ₂ O) ₂ -C ₆ H ₄	г	86	83:17	97

а) 20 моль % **1**, THF, 20 °C

б) 20 моль % **1**, THF/ H₂O (9:1), 4 °C,

в) 30 моль % **1**, 20 моль% TFA, *i*-PrOH, 4 °C, 1-4 доби

г) 15 моль % **1**, CHCl₃, 20 °C, 14-36 год

* – енантімерний надлишок у випадку *син*- та *анти*-продукту.

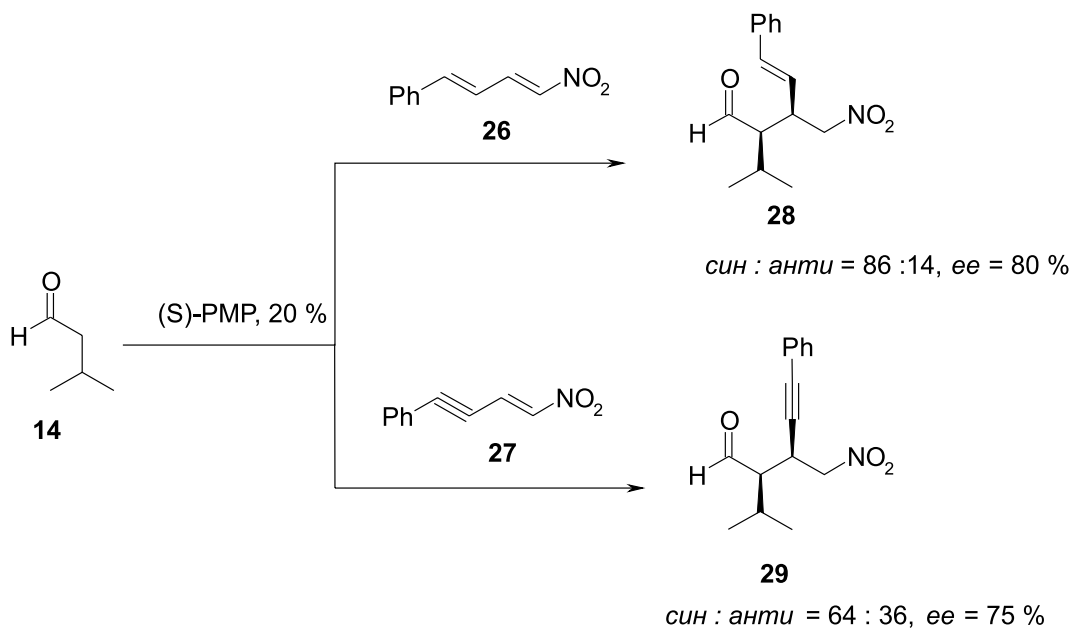
Зниження температури до -25 °C підвищує енантімерний надлишок до 91%, хоча і знижує вихід до 14% (схема 11).

Скринінг каталізаторів, аналогів (S)-PMP, у реакції Міхаеля [21, 28] показав, що найвищий енантімерний надлишок при приєднанні ацетону як до бензальмалонатів, так і до нітроолефінів досягається при використанні діамінів **33**, **34** і **35**, причому каталізатор **35** найкраще підходить для приєднання альдегідів (схема 12).

Автори [29, 30] детально дослідили приєднання ацетону до β-силілметилмалонату **36** у присутності (S)-PMP і показали, що в умовах, запропонованих Барбасом та співр. [21, 28], (28 °C, THF)

для продукту **37** вдається досягти лише 66% *еє* при дуже низькому виході – 10%. Заміна THF на N-метилпіролідон (NMP) привела до підвищення виходу сполуки **36** до 61% із одночасним зниженням енантімерного надлишку до 55%. Процес був оптимізований із використанням різних кислотних добавок, а найкращі результати були отримані в умовах дослідів VI (табл. 5, схема 13).

Важливим прикладом асиметричної реакції Міхаеля є органокаталітичний синтез 1,4-дигідропіридазинів **40** приєднанням арилацетальдегідів **39** до 1,2-діаза-1,3-дієнів **38** з подальшою внутрішньомолекулярною циклізацією [31]. В табл. 6 наведені порівняльні результати процесу з ви-



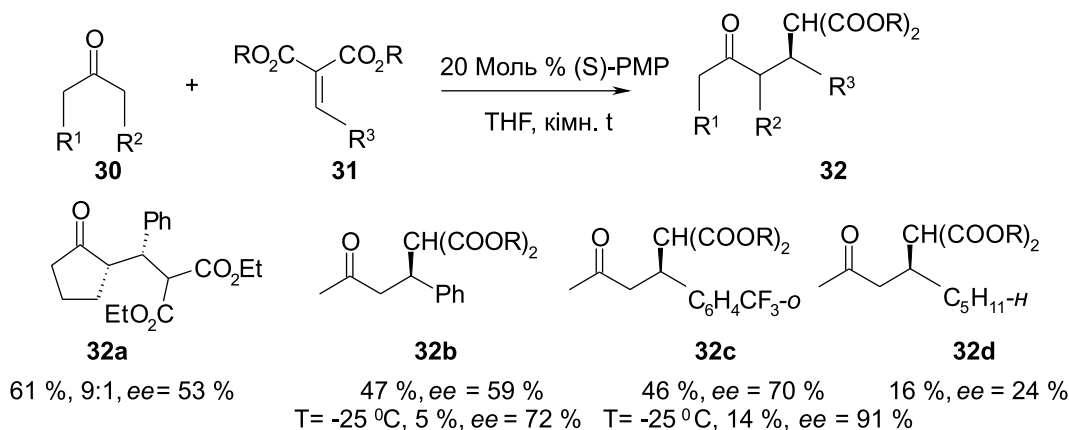


Схема 11

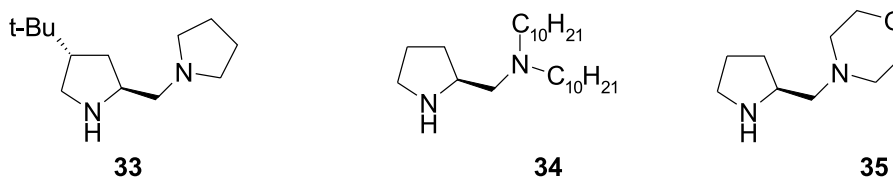


Схема 12

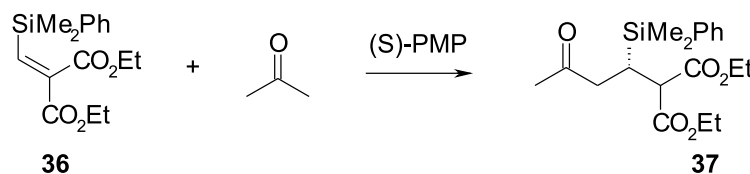


Схема 13

користанням L-проліну та (S)-PMP у ролі каталізаторів (схема 14).

2.3. Реакція Міхаеля за участю метиліден-гем-біфосфонатів

Реакція Міхаеля шестичленних циклічних кетонів **41** з метиліден-гем-біфосфонатом **42** була успішно використана в синтезі хіральних γ -кето-

біфосфонатів **43** (схема 15). Показано [32, 33], що найкращими умовами її перебігу є каталіз (S)-PMP з добавкою бензойної кислоти в хлористому метилієні (табл. 7). Варто зазначити, що ациклічні кетони в таких умовах взагалі не реагують, а циклопентанон, навпаки, виявився дуже реакційноздатним і приводить до утворення практично

Таблиця 5

Дослід, №	Каталізатор і добавка	Умови	Вихід 37 , %	ee 37 , %
I	20 моль % 1	THF, T=28°C, 6 діб	10	66
II	20 моль % 1	NMP, T=28°C, 3,5 доби	61	55
III	1 + 10 моль % AcOH	NMP, T=4°C, 5 діб	72	84
IV	1 + 10 моль % AcOH	NMP, T= -10°C, 7 діб	5	88
V	1 + 10 моль % PNBA	NMP, T=4°C, 5 діб	79	80
VI	1 + 10 моль % TFAA	NMP, T= -10°C, 7 діб	76	90
VII	1 + 10 моль % TFAA	Толуол, T= -10°C, 7 діб	88	82

PNBA – *p*-нітробензойна кислота

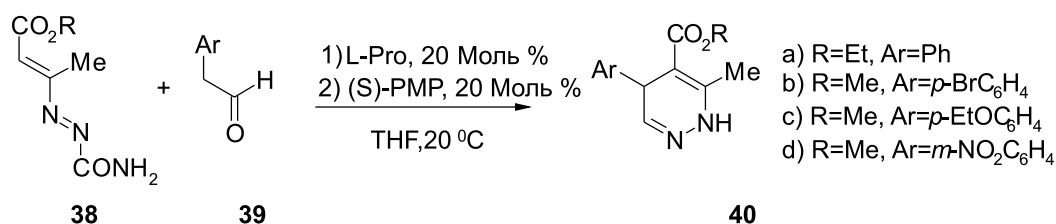


Схема 14

Таблиця 6

Продукт	Каталізатор L-Pro			Каталізатор (S)-PMP-TFAA		
	час (дні)	вихід, %	ee, %	час (дні)	вихід, %	ee, %
40а	4	35	39	4	40	75
40б	5	23	62	5	32	72
40в	10	18	66	10	15	28
40г	7	87	78	4	62	65

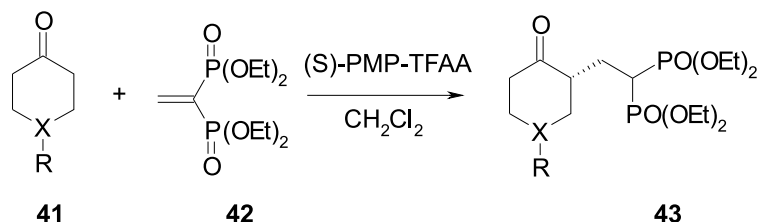


Схема 15

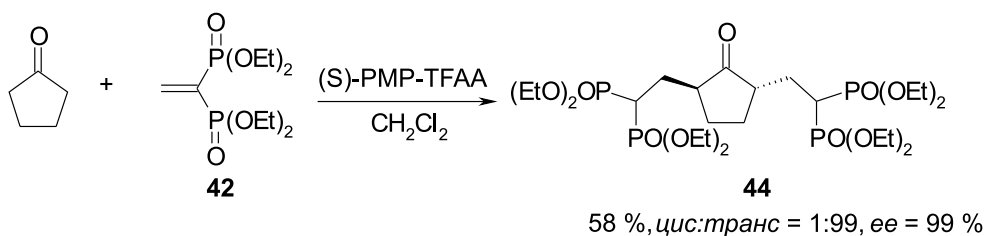


Схема 16

енантіомерно чистого дизаміщеного продукту **44** (схема 16).

2.4. Конденсація альдо-Міхаеля

З урахуванням того, що (S)-PMP активно каталізує як реакцію Міхаеля, так і альдо-конденсацію, шведські дослідники застосували комбінацію цих процесів для енантіоселективного

синтезу тетрагідротіоксантенону **47** [34] та тетрагідроксантенону **49** [35] (схеми 17, 18).

3. Реакція Манніха

Асиметричний варіант реакції Манніха є зручним методом синтезу оптично активних β-амінокетонів та естерів – попередників низки важли-

Таблиця 7

43	X=C, R=H	X=C, R=Ph	X=C, R=Me	X=C, R=t-Bu	X=N, R=Me
Вихід, %	61	78	86	92	58
<i>цис:транс</i>	-	8:92	18:82	88:78	-
ee, %	61	62:76	83:71	30:70	90

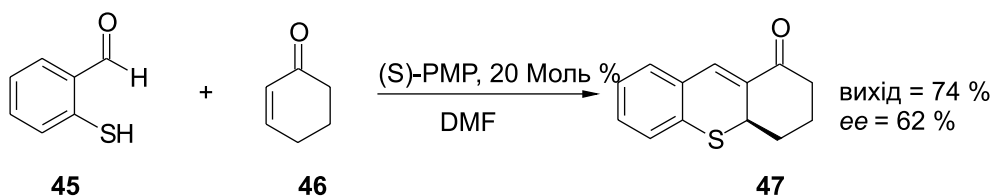


Схема 17

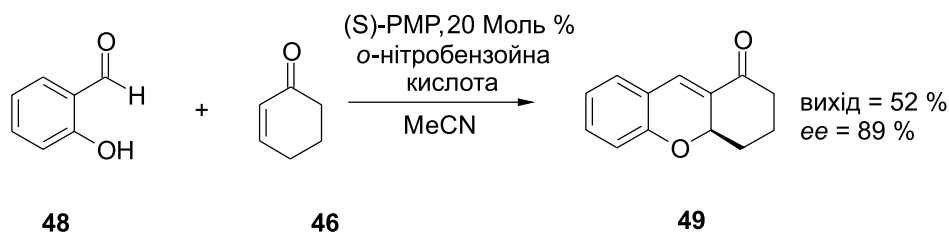


Схема 18

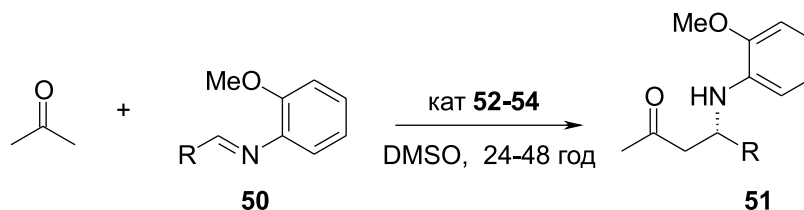


Схема 19

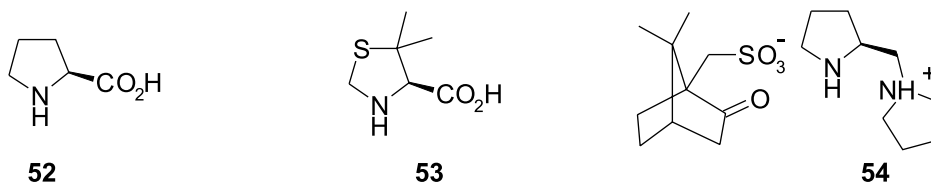


Схема 20

Таблиця 8

R	Каталізатор	Вихід 51 , %	ee, %	R	Каталізатор	Вихід 51 , %	ee, %
	53	45	16		53	48	60
	54	43	2		54	50	67
	52	50	40		52	42	86
	53	48	80		53	56	88
	54	40	55		54	32	25

вих нітрогеновмісних природних сполук. Перші відомості про застосування (S)-PMP для каталізу реакції Манніха були опубліковані Барбасом і співр. [36], які дослідили приєднання ацетону до альдмінів **50** (схема 19). Скринінг декількох типів амінокаталізаторів показав, що L-пролін **52** та тiazолідинкарбонова кислота **53** виявили кращі результати, ніж сіль (S)-PMP **54**. Як видно з табл. 8, у останньому випадку із помірним енантіомерним надлишком ($ee=67\%$) отримується тільки сполука **51** із *n*-ацетиламінофенільним замісником (схема 20).

Дещо пізніше з'явилися нові експериментальні дані стосовно використання (S)-PMP у реакції Манніха. Зокрема, Йоргенсену та співр. [37] вдалось приєднати ряд альдегідів **56** до формально циклічних кетімінів **55** у присутності (S)-PMP без використання кислотних добавок і отримати сполуки **57** із високим енантіомерним надлишком (табл. 9, схема 21).

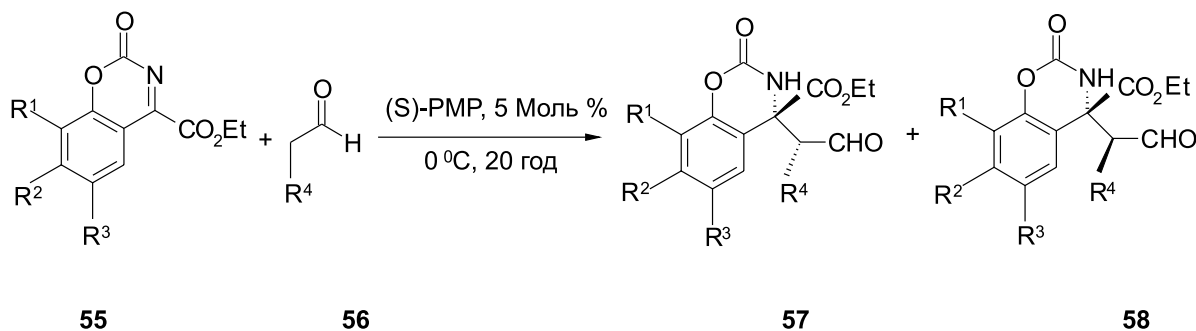


Схема 21

Базуючись на досвіді успішного використання (S)-PMP у попередній реакції, китайські дослідники перевірили його вплив на приєднання кетонів **60** до 4-трифторометилдигідрохіназолінів **59** [38] і встановили, що серед досліджених каталізаторів [(S)-PMP, L-пролін **52** та їх аналоги **62-65**] саме (S)-PMP показав найкращі результати ($ee = 51\%$). При цьому вихід продукту приєднання **61** становив тільки 38 % і його вдалось значно підвищити додаванням кислоти (схеми 22, 23).

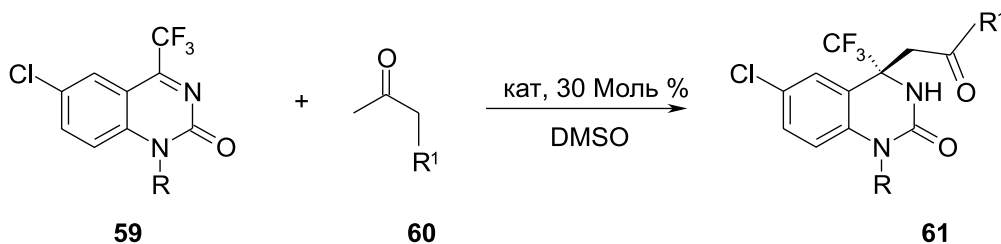
Підбір кислотних добавок і їх вплив на вихід продукту **61** ($R^1=H$) та енантіоселективність реакції наведено у табл. 10.

На значній кількості прикладів було показано, що найефективнішою каталітичною системою є (S)-PMP із добавкою дибензоїл L-тартратної кислоти, а також досліджені межі реакції в умовах її використання (табл. 11).

Перекристалізацією із етанолу енантіозбагачених продуктів **61** були виділені димерні раце-

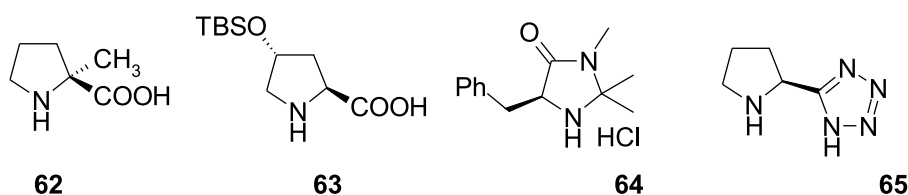
Таблиця 9

R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Розчинник	Вихід, %	57 : 58	ee 57, %
H	H	H	<i>i</i> -Pr	Et ₂ O	99	20 : 1	91
H	H	Me	<i>i</i> -Pr	Et ₂ O	98	6 : 1	89
H	H	OMe	<i>i</i> -Pr	Et ₂ O	95	9 : 1	86
H	H	F	<i>i</i> -Pr	Et ₂ O	97	19 : 1	83
H	OMe	H	<i>i</i> -Pr	Et ₂ O	90	20 : 1	87
- C ₄ H ₄ -		H	<i>i</i> -Pr	Et ₂ O	93	20 : 1	84
H	H	H	Me	CH ₂ Cl ₂	72	5 : 1	95
H	H	H	Allyl	CH ₂ Cl ₂	82	4 : 1	98



R = *n*-метоксибензил (PMB), 2,4,6-триметилбензил (TMB)

Схема 22



TBS = *tert*-бутилдиметилсиліл

Схема 23

матні кристали **66**, при цьому маточний розчин збагачувався одним із енантіомерів. Таким чином, у результаті асиметричного варіанту реакції Манніха та наступної перекристалізації вдалось одержати практично чисті енантіомери **61** (>99,9%) (схема 24).

Зручними циклічними моделями N-ацилімінного типу для дослідження асиметричної органокалітичної реакції Манніха є піримідинони із F₃C-групою в положенні 4, яка спричиняє значне збільшення електрофільності піримідинового циклу і тим самим полегшує нуклеофільну атаку по положеннях 4- або 6 [39]. Перші експери-

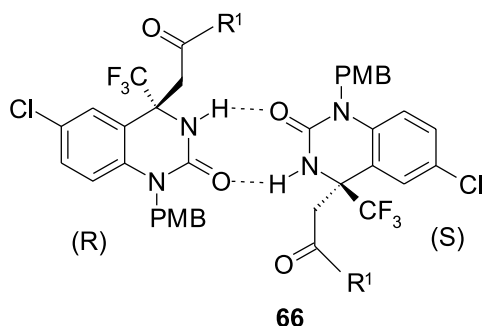


Схема 24

менти по взаємодії піримідин-2-онів **67** із ацетоном у присутності різноманітних каталізаторів та реакційних умов показали, що такий процес каталізується як L-проліном, так і (S)-PMP, хоча енантіоселективність у разі L-проліну була низькою, в той час як (S)-PMP забезпечував енантіомерний

Таблиця 10

(S)-PMP + кислота	Час, год	Вихід 61 , %	ee 61 , %
Без добавки кислоти	120	38	51
TFAA	12	91	18
HCl в діоксані	24	64	55
<i>p</i> -TsOH	48	76	17
L-тарtratна кислота	72	88	47
D-тарtratна кислота	72	89	49
Дибензоїл L-тарtratна кислота	12	95	54
Дибензоїл D-тарtratна кислота	12	89	49
Дибензоїл L-тарtratна кислота*	24	92	71

* У субстраті **59** R=TMB, у всіх інших випадках R=PMB.

Таблиця 11

R у 59	R ¹ у 60	Час, год	Вихід 61 , %	ee 61 , %	ee* 61 , %
PMB	цикло-C ₃ H ₅	72	94	57	99.3
TMB	цикло-C ₃ H ₅	96	95	75	>99.9
PMB	Et	48	95	69	99.1
TMB	Et	72	94	78	99.6
PMB	Pr	72	91	74	
PMB	<i>i</i> -Bu	120	75	76	99.5
TMB	<i>i</i> -Bu	192	51	66	
PMB	<i>n</i> -Гексил	72	92	78	>99.9
TMB	<i>n</i> -Гексил	96	87	79	

* після перекристалізації з етанолу

надлишок у 42%. Було знайдено, що оптичну чистоту продуктів приєднання **68** можна значно поліпшити додаванням каталітичних кількостей кислоти Бренстеда (табл. 12, схема 25) [40].

(S)-PMP-каталізоване приєднання ацетону до незаміщених по положенню 6 піримідин-2-онів **69** незалежно від часу, температури та кислотних добавок приводить до продуктів Манніха **70a-c** із значно вищою енантіоселективністю. Натомість при проведенні L-пролін-каталізованої реакції при низькій температурі впродовж короткого проміжку часу утворюються продукти приєднання за Міхаелем **71a-c** у рацемічній формі (табл. 13, схема 26).

Таблиця 12

Сполука	R	Кислота	ee, %
68a	Ph	MeCOOH	50
68a	Ph	PhCOOH	56
68a	Ph	<i>p</i> -TsOH	56
68a	Ph	L-винна	50
68a	Ph	D-винна	50
68a	Ph	Дибензоїлвинна	56
68b	4-BrC ₆ H ₄	PhCOOH	56
68c	3-MeOC ₆ H ₄	PhCOOH	60
68d	4-O ₂ NC ₆ H ₄	PhCOOH	62

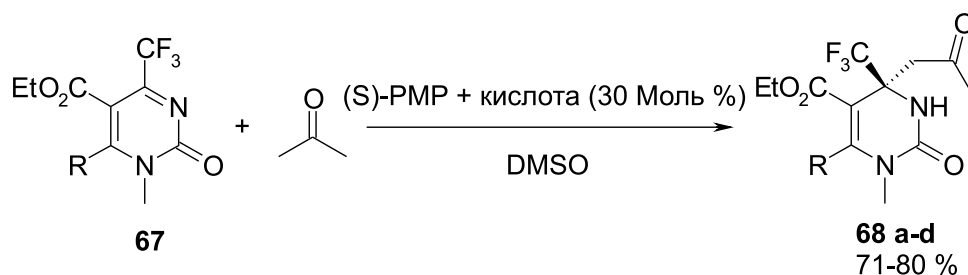


Схема 25

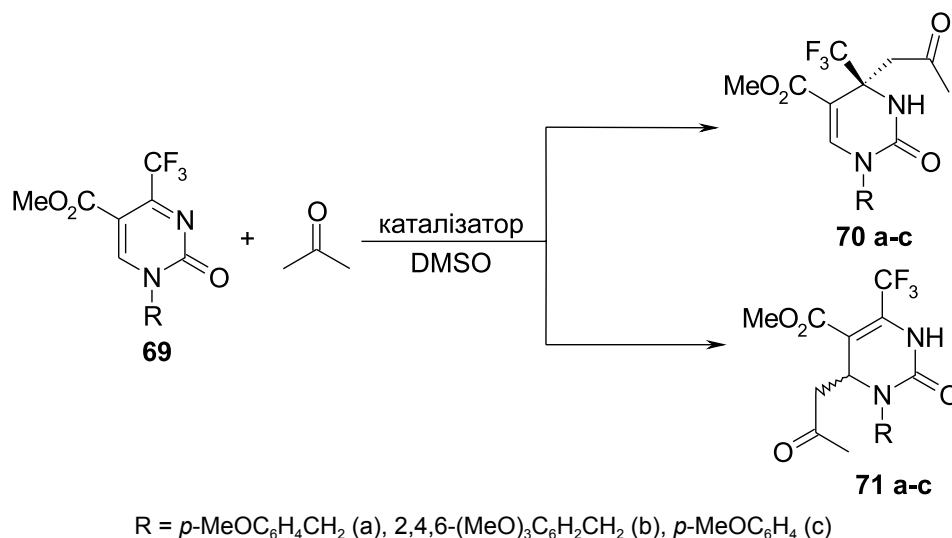


Схема 26

Таблиця 13

Сполука	Каталізатор	Час, год (температура)	Співвідношення 70 : 71	Вихід, %	ee, %
a	L-Pro	12 (11 °C)	11 : 89	71 (61)	рацемат
a	L-Pro	60	98 : 2	70 (82)	рацемат
a	(S)-PMP+PhCOOH	12 (11 °C)	95 : 5	70 (72)	30
a	(S)-PMP+PhCOOH	12 (11 °C)	90 : 10	70 (68)	52
a	(S)-PMP+PhCOOH	48	98 : 2	70 (69)	46
b	(S)-PMP+PhCOOH	48	98 : 2	70 (73)	66
c	L-Pro	8 (11 °C)	10 : 90	71 (80)	рацемат
c	(S)-PMP+PhCOOH	72	98 : 2	70 (77)	54

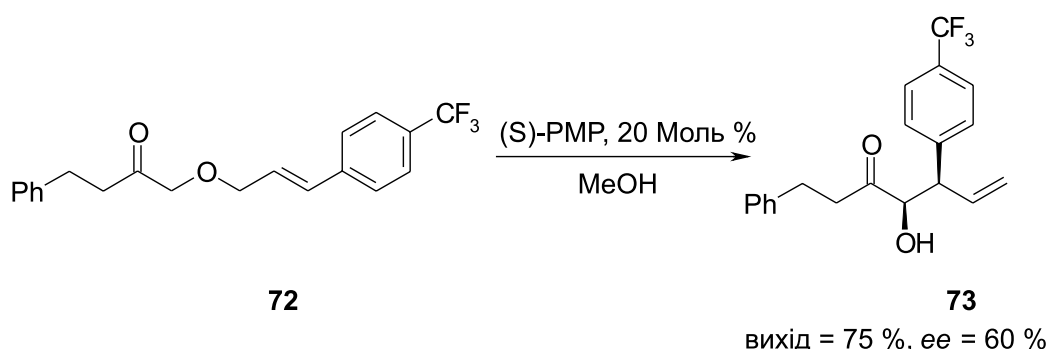


Схема 27

4. Інші типи реакцій

4.1. Перегрупування Віттіга

Автори [41] при вивченні [2,3]-сигматропного перегрупування Віттіга в присутності вторинних амінів встановили, що (S)-PMP каталізує перегрупування кетону **72** до α -гідрокетону **73** з високим виходом та помірним енантіомерним надлишком (схема 27).

4.2. Реакція Дільса-Альдера

Барбас і співр. [39] при дослідженні (S)-PMP-каталізованої реакції Дільса-Альдера α,β -ненасичених кетонів **75** з дієнофілами **74** отримали низку хіральних циклогексанонів **76a** і **76b** із високим діастереомерним надлишком (табл. 14, схема 28) [42].

У свою чергу, використання в подібній реакції нітrostиролів **23** та циклічних ненасичених кетонів **77** і каталітичної системи (S)-PMP-2,4-динітробензолсульфо кислота **78** приводить до циклоадуктів **79** із ee = 77-86 % [43] (схема 29).

4.3. Гідрогенування

Каталітична система (S)-PMP-хлорна кислота була успішно застосована для стереоселективно-

Таблиця 14

R ¹	R ²	Співвідношення 76a : 76b
Ph	2-тієніл	8.0 : 1
<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	2-тієніл	3.9 : 1
α -нафтил	2-тієніл	3.6 : 1
<i>o</i> -CF ₃ C ₆ H ₄	Ph	4.0 : 1
<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	Ph	2.0 : 1
Ph	2-фурил	4.0 : 1

го гідрогенування ряду кетонів Віленда-Мішера, Хайоша-Періша та їх аналогів **80** дигідропіримідинами **81** (естери Ганча), результатом якого став синтез заміщених хіральних біцикло[4.4.0]декан-1,6-діонів **82** [44] (схема 30).

4.4. Розкриття епоксидних циклів

Не всі реакції, які каталізуються (S)-PMP, реалізуються за каталітичною схемою 2. Відомо декілька прикладів використання N-Li аміду (S)-PMP для асиметричного депротонування, до яких слід віднести депротування та розкриття епоксидно-

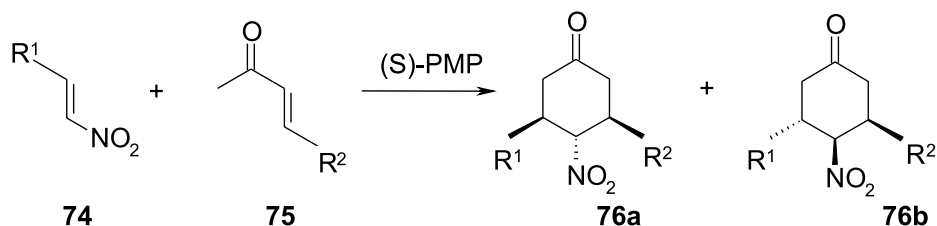


Схема 28

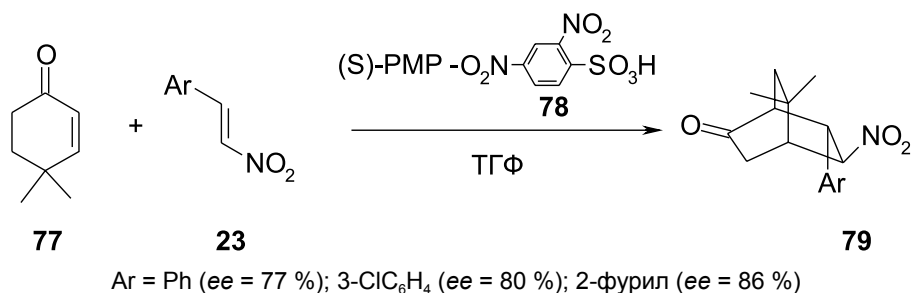


Схема 29

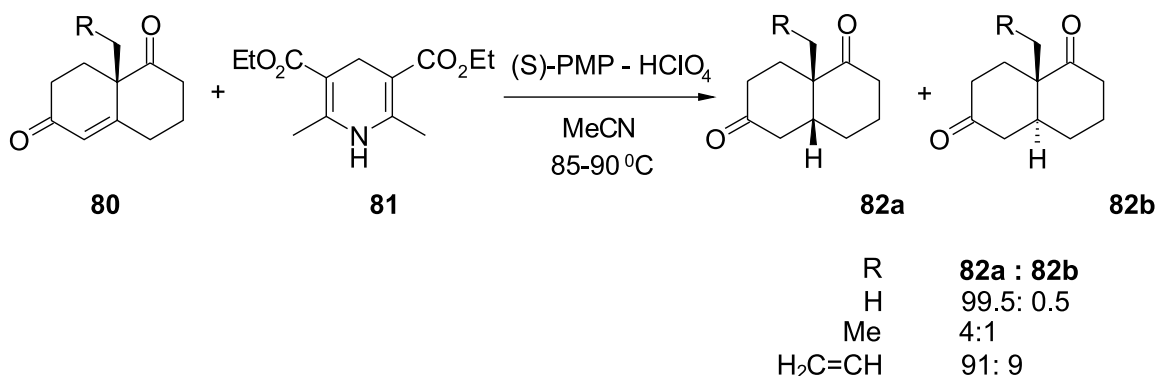


Схема 30

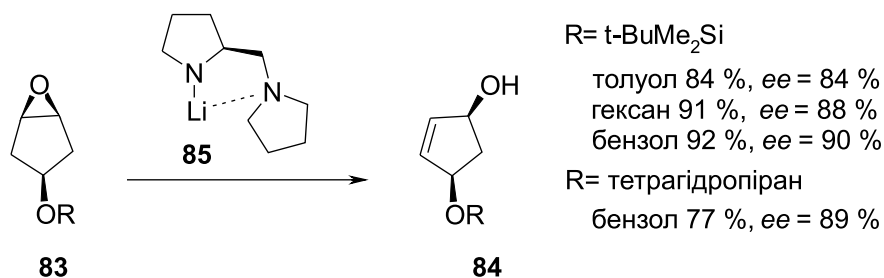


Схема 31

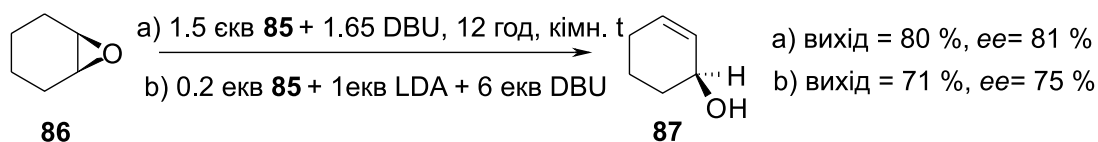


Схема 32

го циклу у сполуках типу **83** з утворенням α,β -ненасичених спиртів **84** з високим енантіомерним надлишком [45, 46]. Слід зазначити, що суттєвим недоліком такого перетворення є використання надлишку (~1.5 екв) аміду (S)-PMP **85** (схема 31).

Дещо пізніше було показано, що кількість аміду **85** можна зменшити до каталітичної (20 моль %) за рахунок додавання до реакційної суміші DBU та LDA [46, 47]. Таким чином, вдалось синтезувати спирт **87** з енантіомерним надлишком 75% (схема 32).

Література

1. Ahrendt K. A., Borths C. J., MacMillan D. W. J. *of the American Chemical Society*, 2000, Vol. 122, No.17, pp.4243-4244.
2. Mukherjee S., Yang J. W., Hoffmann S., List B. *Chemical Reviews*, 2007, Vol. 107, No.12, pp.5471-5569.
3. Meninno S., Lattanzi A. *Chemical Communications*, 2013, Vol. 49, No.37, pp.3821-3832.
4. Aleman J., Cabrera S. *Chemical Society Rev.*, 2013, Vol. 42, No.2, pp.774-793.
5. Cahard D., Xu X., Couve-Bonnaire S., Pannecoucke X. *Chemical Society Reviews*, 2010, Vol. 39, No.2, pp.558-568.
6. Yu X., Wang W. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2008, Vol. 6, No.12, pp.2037-2046.

Висновки

Аналіз літературних джерел наглядно засвідчує, що 2-(S)-(+)-1-(2-піролідинілметил)піролідин [(S)-PMP] є одним із найефективніших органокалізаторів асиметричних реакцій альдольної конденсації, Міхаеля, Манніха, Дільса-Альдера, перегрупування Віттіга тощо. Слід очікувати, що сфера його практичного використання постійно розширюватиметься.

7. Xu L. V., Lu Y. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2008, Vol. 6, No.12, pp.2047-2053.
8. Sulzer-Mosse S., Alexakis A. *Chemical Communications*, 2007, Vol. 14, No.30, pp.3123-3135.
9. Brazier J. B., Tomkinson N. C. O. In *Topics in Current Chemistry*, B. List (Ed.). – Springer, 2010, pp.281-348.
10. Sone T., Hiroi K., Yamada S. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 1973, Vol. 21, No.10, pp.2331-2335.
11. Saito S., Nakadai M., Yamamoto H. *Synlett*, 2001, Vol. 8, pp.1245-1248.
12. Nakadai M., Saito S., Yamamoto H. *Tetrahedron*, 2002, Vol. 58, No.41, pp.8167-8178.
13. Cordova A., Notz W., Barbas C. F. *Chemical Communication*, 2002, Vol. 24, pp.3024-3025.
14. Saito S., Yamamoto H. *Accounts of Chemical Research*, 2004, Vol. 37, No.8, pp.570-579.
15. Mase Nobuyuki, Tanaka Fujie, Barbas Carlos F. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, Vol. 43, No.18, pp.2420-2423.
16. Catalan-Munoz S., Muller C. A., Ley S. V. *Eur. J. of Org. Chem.*, 2010, Vol. 1, pp.183-190.
17. Albrecht L., Deredas D., Wojciechowski J. et al. *Synthesis*, 2012, Vol. 44, No.2, pp.247-252.
18. Bui Tommy, Barbas Carlos F. *Tetrahedron Lett.*, 2000, Vol. 41, No.36, pp.6951-6954.
19. Akahane Yuichi, Inomata Kohei, Endo Yasuyuki *Heterocycles*, 2011, Vol. 82, No.2, pp.1727-1737.
20. Dambruoso P., Massi A., Dondoni A. *Organic Lett.*, 2005, Vol. 7, No.21, pp.4657-4660.
21. Betancort Juan M., Sakthivel Kandasamy, Thayumanavan Rajeswari, Tanaka Fujie, Barbas Carlos F. *Synthesis*, 2004, Vol. 9, pp.1509-1521.
22. Mase Nobuyuki, Thayumanavan Rajeswari, Tanaka Fujie, Barbas Carlos F. *Organic Lett.*, 2004, Vol. 6, No.15, pp.2527-2530.
23. Belot Sebastien, Sulzer-Mosse Sarah, Kehrl Stefan, Alexakis Alexandre *Chemical Communication*, 2008, Vol. 39, pp.4694-4696.
24. Belot Sebastien, Quintard Adrien, Alexakis Alexandre, Krause Norbert, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 2010, Vol. 352, No.4, pp.667-695.
25. Ramachary Dhevalapally B., Sakthidevi Rajasekar *Organic and Biomolecular Chem.*, 2010, Vol. 8, No.19, pp.4259-4265.
26. Zhang Xinshuai, Zhang Shilei, Wang Wei *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, Vol. 49, No.8, pp.1481-1484.
27. Felluga F., Forzato C., Nitti P. et al. *Chirality*, 2012, Vol. 24, pp.1005-1012.
28. Betancort Juan M., Sakthivel Kandasamy, Thayumanavan Rajeswari, Barbas Carlos F. *Tetrahedron Lett.*, 2001, Vol. 42, No.27, pp.4441-4444.
29. Chowdhury Raghunath, Ghosh Sunil K. *Organic Lett.*, 2009, Vol. 11, No.15, pp.3270-3273.
30. Chowdhury Raghunath, Ghosh Sunil K. *Synthesis*, 2011, Vol. 12, pp.1936-1945.
31. Pitacco G., Felluga F., Forzato C., Nitti P., Valentin Ennio, Zangrando Ennio, Attanasi Orazio A., Lucia De Crescentini, Favi Gianfranco, Mantellini Fabio *Tetrahedron: Asymmetry*, 2010, Vol. 21, No.5, pp.617-622.
32. Barros Maria Teresa, Phillips Ana Maria Faisca *Eur. J. of Org. Chem.*, 2008, Vol. 15, pp.2525-2529.
33. Faisca Phillips Ana Maria, Barros Maria Teresa *Organic and Biomolecular Chem.*, 2012, Vol. 10, No.2, pp.404-412.
34. Rios Ramon, Sunden Henrik, Ibrahim Ismail, Zhao Gui-Ling, Cordova Armando *Tetrahedron Lett.*, 2006, Vol. 47, No.49, pp.8679-8682.
35. Rios Ramon, Sunden Henrik, Ibrahim Ismail, Cordova Armando *Tetrahedron Lett.*, 2007, Vol. 48, No.12, pp.2181-2184.
36. Wolfgang Notz, Kandasamy Sakthivel, Tommy Bui, Guofu Zhong and Carlos Barbas F. *Tetrahedron Lett.*, 2001, Vol. 42, No.2, pp.99-201.
37. Zhuang Wei, Saaby Steen, Jorgensen K. A. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, Vol. 43, No.34, pp.4476-4478.
38. Jiang Biao, Jia Jia Dong, Yu Gui Si, Xiao Long Zhao, Zuo Gang Huang, Xu Min *Advanced Synthesis and Catalysis*, 2008, Vol. 350, No.9, pp.1360-1366.
39. Sukach V. A., Tkachuk V. M., Rusanov E. B., Röschenthaler Gerd-Volker, Vovk M. V. *Tetrahedron*, 2012, Vol. 68, No.40, pp.8408-8415.
40. Sukach V. A., Tkachuk V. M., Shoba V. M., Pirozhenko V. V., Rusanov E. B., Chekotilo A. A., Röschenthaler G.-V., Vovk M. V. *Eur. J. of Org. Chem.*, 2014, doi: 10.1002/ejoc.201301542.
41. McNally Andrew, Evans Brian, Gaunt Matthew J. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, Vol. 45, No.13, pp.2116-2119.
42. Thayumanavan Rajeswari, Dhevalapally Buchiramachary, Sakthivel Kandasamy, Tanaka Fujie, Barbas Carlos F. *Tetrahedron Lett.*, 2002, Vol. 43, No.21, pp.3817-3820.
43. Sunden Henrik, Rios Ramon, Xu Yongmei, Eriksson Lars, Cordova Armando, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 2007, Vol. 349, No.17, pp.2549-2555.
44. Ramachary, Dhevalapally B., Sakthidevi Rajasekar *Organic and Biomolecular Chem.*, 2008, Vol. 6, No.14, pp.2488-2492.
45. Asami Masatoshi *Tetrahedron Lett.*, 1985, Vol. 26, No.47, pp.5803-5806.
46. Asami Masatoshi, Ishizaki Tatsuya, Inoue Seiichi *Tetrahedron: Asymmetry*, 1994, Vol. 5, No.5, pp.793-796.
47. Masatoshi Asami, Takashi Suga, Kiyoshi Honda, Seiichi Irroue *Tetrahedron Lett.*, 1997, Vol. 38, No.36, pp.6425-6428.

Надійшла до редакції 07.02.2014 р.

UDC 615.281.8:[615.31:547.856].057

SYNTHESIS AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF [(9-R¹-10-R²-3-R-2-OXO-2H-[1,2,4]-TRIAZINO[2,3-c]QUINAZOLIN-6-YL)THIO]ACETAMIDES DERIVATIVES WITH THE FRAGMENTS OF CARCASS AMINES

I.S.Nosulenko, O.Yu.Voskoboynik, G.G.Berest, S.L.Safronyuk*, S.I.Kovalenko, A.V.Katsev*, R.S.Sinyak, V.O.Palchikov**

Zaporizhzhia State Medical University,
26, Mayakovsky ave., 69035, Zaporizhzhia, Ukraine

* Crimean State Medical University

** Dnipropetrovsk National University named after Oles Honchar

Key words: 2-[(9-R¹-10-R²-3-R-2-[(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides; carcass amines; viruses Flu A&B strain; antiviral activity

Alkylation of potassium 9-R¹-10-R²-3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-thiolates by N-cycloalkyl-(cycloalkylaryl)-2-chloroacetamides and interaction of [(9-R¹-10-R²-3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetic acids imidazolides and chloranhydrides with carcass amines yielded the corresponding amides. The structures of the compounds synthesized have been confirmed by ¹H, ¹³C NMR, LC-MS and EI-MS analysis. The features of ¹H, ¹³C NMR, LC-MS and EI-MS spectra have been described, and characteristic signals have been identified. The compounds synthesized have been studied for their antiviral activity. The results of the antiviral assay have shown that some compounds exhibit a moderate and high activity against the strains studied. The correlation between the structure and the antiviral action has been also discussed. According to the data obtained the conclusion can be made that the combination of carcass amine moieties with the fragment of little known [(9-R¹-10-R²-3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetic acid results in compounds with a high antiviral activity. High indicators of the antiviral activity of compounds 3.2 and 3.14 against Influenza Type A H3N2 allow to suppose the expediency of further chemical modification of [1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl directed to obtaining new antiviral agents.

СИНТЕЗ ТА АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ [(9-R¹-10-R²-3-R-2-ОКСО-2H-[1,2,4]-ТРИАЗИНО[2,3-С]ХІНАЗОЛІН-6-ІЛ)ТІО]АЦЕТАМІДІВ З ФРАГМЕНТАМИ КАРКАСНИХ АМІНІВ

I.S.Носуленко, О.Ю.Воскобойнік, Г.Г.Берест, С.Л.Сафронюк, С.І.Коваленко, А.М.Кацев, Р.С.Синяк, В.О.Пальчиков

Ключові слова: 2-[(9-R¹-10-R²-3-R-2-[(3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)тіо]ацетаміди; каркасні аміни; вірус штаму Flu A&B; антивірусна активність

Алкилування калій 9-R¹-10-R²-3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-тіолатів N-циклоалкіл-(циклоалкіларил)-2-хлорацетамідами та взаємодія імідазолідів та хлорангідридів [(9-R¹-10-R²-3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)тіо]оцетових кислот з каркасними амінами призвели до утворення відповідних амідів. Структуру та чистоту синтезованих сполук встановлено за допомогою комплексу фізико-хімічних методів, зокрема ¹H, ¹³C-NMR, LC-MS та EI-MS аналізом. Особливості ¹H, ¹³C NMR, LC-MS та EI-MS спектрів були обговорені, також були ідентифіковані характеристичні сигнали. Синтезовані сполуки були досліджені на наявність антивірусної активності. Встановлено, що окремі представники синтезованих сполук виявляють помірну та високу антивірусну активність по відношенню до штамів, що досліджувались. Кореляція взаємозв'язку «будова-дія» була обговорена. Відповідно до одержаних даних ми зробили висновок, що комбінація залишку каркасних амінів з фрагментами мало відомих [(9-R¹-10-R²-3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)тіо]оцетових кислот дозволяє одержати сполуки зі значною антивірусною активністю. Високі індикатори антивірусної активності по відношенню до штаму Influenza Type A H3N2 сполук 3.2 та 3.14 дозволяють передбачити перспективність подальшої хімічної модифікації [1,2,4]триазино[2,3-с]хіназоліну з метою пошуку нових антивірусних агентів.

СИНТЕЗ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ [(9-R¹-10-R²-3-R-2-ОКСО-2H-[1,2,4]ТРИАЗИНО[2,3-С]ХИНАЗОЛИН-6-ИЛ)ТИО]АЦЕТАМИДОВ С ФРАГМЕНТАМИ КАРКАСНЫХ АМИНОВ

I.S.Носуленко, А.Ю.Воскобойник, Г.Г.Берест, С.Л.Сафронюк, С.И.Коваленко, А.М.Кацев, Р.С.Синяк, В.А.Пальчиков

Ключевые слова: 2-[(9-R¹-10-R²-3-R-2-[(3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)тіо]ацетаміди; каркасні аміни; вірус штаму Flu A&B; протівовірусна активність

Алкилирование калій 9-R¹-10-R²-3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-тіолатов N-циклоалкіл-(циклоалкіларил)-2-хлорацетамідами и взаимодействие имидазолидов и хлорангидридов [(9-R¹-10-R²-3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)тіо]уксусных кислот с каркасными аминами ведет к образованию амидов. Структуру и чистоту синтезованных соединений установлено комплексом физико-химических методов, в частности, ¹H-, ¹³C-NMR, LC-MS и EI-MS анализом. Также были описаны особенности ¹H-, ¹³C-NMR, LC-MS и EI-MS спектров и идентифицированы характеристические

сигналы. Синтезированные соединения были исследованы на наличие противовирусной активности. Установлено, что отдельные представители класса синтезированных соединений проявляют умеренную или высокую противовирусную активность по отношению к изучаемым штаммам. Обсуждена корреляция «структура-действие». Согласно полученным данным можно сделать вывод, что комбинация структуры каркасных аминов с фрагментом малоизвестных [(9- R^1 -10- R^2 -3- R -2-оксо-2H-[1,2,4]-триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусных кислот позволяет получить вещества с высокой противовирусной активностью. Высокие индикаторы противовирусной активности по отношению к штамму Influenza Type A H3N2 соединений 3.2 и 3.14 дают возможность прогнозировать перспективность дальнейшей химической модификации [1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолина, направленной на получение новых противовирусных агентов.

Despite the fact of the centuries-old contact of mankind with influenza and significant breakthrough in studying and treating it and the similar (parainfluenza and rhinovirus) diseases during last decades there are a lot of unresolved problems in this field. So, according to statistical data, upper respiratory tract infections take a first place among infectious diseases by the level of morbidity. Virus infections in a season epidemic period strike about 20% of the population and more than five hundred thousand people die, as a result of complications. For prevention and treatment of infectious diseases caused by viruses different classes of compounds are used. Among antiviral drugs it should be mentioned vaccines, interferon, inductors of interferon, abnormal nucleosides, adamantane thiosemicarbasones derivatives and virucidal agents [1, 2]. At the same time, appearance of new high pathogenic strains, problems in antiepidemic control and decrease of the immunodefence level cause the necessity of searching new highly effective antiviral agents, which can affect both the cause and pathogenesis of the disease.

Recent publication describe the strategies of antiviral drug creation based on chemical modification of aliphatic polycyclic systems (adamantane, norbornane, bicyclo[2.2.0]hexane, bicyclo[2.2.1]heptane, pentacycloundecane, etc.) by introduction of pharmacophore groups or their combinations with cyclic, aromatic or heterocyclic fragments [2-7]. Following the strategy mentioned we decided to combine the carcass amine fragment with the planar [1,2,4]-triazino[2,3-с]quinazoline system, and it, in our opinion, yielded the compounds with a high antiviral activity. Our expectations also encouraged by the proved anticancer

activity among substituted [1,2,4]-triazino[2,3-с]quinazolines [8, 9, 10].

So, our work was aimed at the synthesis of [9- R^1 -10- R^2 -3- R -2-оксо-2H-[1,2,4]-триазино[2,3-с]хиназолин-6-yl)thio]acetamides with the fragments of carcass amines and evaluation of their antivirus activity against viruses Flu A&B.

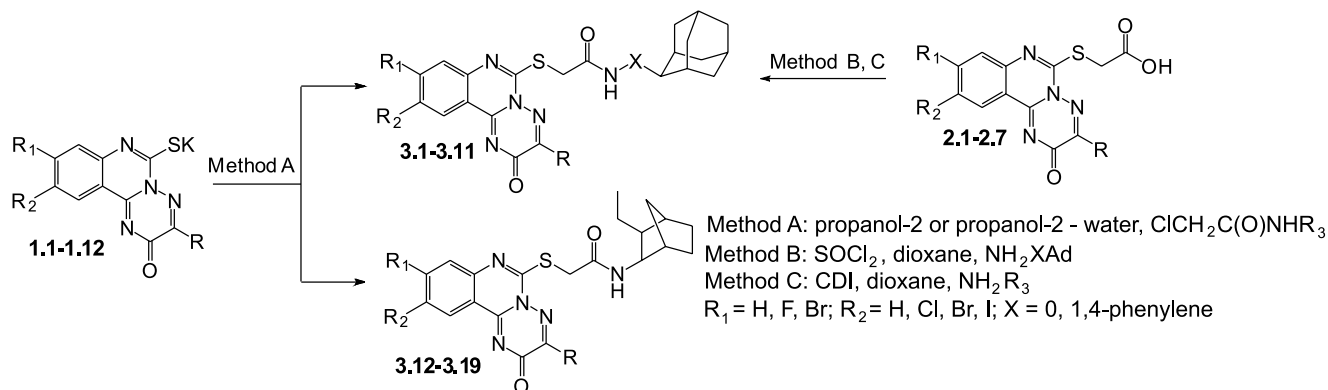
Results and Discussion

1. Chemistry

Synthesis of amides 3.1-3.18 was conducted by alkylation of potassium 9- R^1 -10- R^2 -3- R -2-оксо-2H-[1,2,4]-триазино-[2,3-с]-хиназолин-6-тиолатов (1.1-1.11) by the corresponding chloracetamides in propanol-2 or propanol-2 – water mixture (Method A). The corresponding amides 3.1-3.10 were also synthesized by aminolysis of chloranhydrides (Method B) or imidazolides (Method C) of acids 2.1-2.11. Our experiments showed that the reactivity of chloranhydrides and imidazolides generated *in situ* were enough for complete conversion of initial compounds into the corresponding amides. As specificity of methods B and C it is worth mentioning the necessity of using anhydrous solvents.

Purity of the compounds synthesized was determined by LC-MS (APCI) method, the structure was confirmed by elemental analysis, IR-, ^1H , ^{13}C and mass spectra.

LC-MS-spectra (APCI) of compounds 3.1-3.19 are characterized by positive ions [M+1] and [M+3], the last one shows the “isotope profile” of sulfur [11]. Mass-spectra (EI) of compound 3.9 and 3.12 are characterized by the absence of molecular ions as a result of their low stability. The primary fragmentation



Scheme. Synthesis of N-(1-adamantyl)-, N-(4-(1-adamantyl)phenyl)-, N-(3-ethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-2-[(9- R^1 -10- R^2 -3- R -2-оксо-2H-[1,2,4]-триазино[2,3-с]хиназолин-6-yl)thio]acetamides (3.1-3.19).

Table 1

Physicochemical properties of the compounds synthesized

Comp.	R	R ₁	R ₂	M.p., °C	Yields, %			Formula
					A	B	C	
3.1	CH ₃	H	H	160-162	89.2	48.3	64.3	C ₂₃ H ₂₅ N ₅ O ₂ S
3.2	C ₆ H ₅	H	H	214-216	91.3	56.3	77.4	C ₂₈ H ₂₇ N ₅ O ₂ S
3.3	4-CH ₃ C ₆ H ₄	H	H	218-220	94.2	72.6		C ₂₉ H ₂₉ N ₅ O ₂ S
3.4	4-FC ₆ H ₄	H	H	257-259	78.5		80.2	C ₂₈ H ₂₆ FN ₅ O ₂ S
3.5	C ₆ H ₅	F	H	245-247	80.4		76.5	C ₂₈ H ₂₆ FN ₅ O ₂ S
3.6	4-FC ₆ H ₄	F	H	282-284	32.4		73.9	C ₂₈ H ₂₅ F ₂ N ₅ O ₂ S
3.7	4-FC ₆ H ₄	H	Cl	294-296	67.3	64.8		C ₂₈ H ₂₅ ClFN ₅ O ₂ S
3.8	CH ₃	H	H	225-227	97.3	72.0	81.2	C ₂₉ H ₂₉ N ₅ O ₂ S
3.9	C ₆ H ₅	H	H	314-318	94.5	78.4		C ₃₄ H ₃₁ N ₅ O ₂ S
3.10	4-CH ₃ C ₆ H ₄	H	H	266-268	99.9		84.3	C ₃₅ H ₃₃ N ₅ O ₂ S
3.11	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	H	H	259-262	93.2	64.7		C ₃₅ H ₃₃ N ₅ O ₃ S
3.12	CH ₃	H	H	217-219	84.6	36.9	81.3	C ₂₂ H ₂₅ N ₅ O ₂ S
3.13	4-CH ₃ C ₆ H ₄	H	H	248-250	87.3	67.3		C ₂₈ H ₂₉ N ₅ O ₂ S
3.14	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	H	H	230-233	89.6		73.8	C ₂₈ H ₂₉ N ₅ O ₃ S
3.15	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	F	H	272-274	88.24	73.2		C ₂₈ H ₂₈ FN ₅ O ₃ S
3.16	4-FC ₆ H ₄	F	H	264-266	42.72		68.2	C ₂₇ H ₂₅ F ₂ N ₅ O ₂ S
3.17	4-FC ₆ H ₄	Br	H	284-286	78.79	73.9		C ₂₇ H ₂₅ BrFN ₅ O ₂ S
3.18	4-FC ₆ H ₄	H	Br	264-266	66.67		73.5	C ₂₇ H ₂₅ BrFN ₅ O ₂ S
3.19	4-FC ₆ H ₄	H	I	272-274	80.41		84.2	C ₂₇ H ₂₅ FIN ₅ O ₂ S

of a molecular ion is caused by cleavage of the amide bond ($m/z=347$ and 285) and degradation of *as*-triazinoquinazoline system on C(2) – C(3) and N(4) – N(5) (F_3 $m/z=244$) bonds, which have the highest intensity in spectra. Hereafter F_3 eliminates parts of CO, SCH₂, CNO, which is typical for this class of heterocyclic compounds [11]. Fragment ions caused by the presence of the adamantane moiety are also observed in mass-spectra of compound **3.9** [12].

Two proton singlet of -SCH₂ group, which chemical shift depends on the electronodonor effect of the cycloalkyl fragment, is characteristic for amides **3.1-3.19**. Thus, for amides **3.1-3.7** and **3.12-3.19** this signal is observed at 4.00-3.93 ppm, whereas for amide **3.8-3.11** it is located at low field (4.25-4.21 ppm); this fact may be explained by introduction of the phenyl fragment between the amide group and the adamantane moiety. The chemical shift of a singlet signal caused by – C(O)NH-group also depends on the nature of a substituent. Thus, for amides with the adamantane fragment **3.1-3.7** the signal is observed at 7.88-7.68 ppm, for amides with 3-ethylbicycloheptyle fragment **3.12-3.19** it is at 8.18-8.05 ppm. At the same time in ¹H NMR – spectra of compounds, which contain 4-(1-adamantyl)phenyl fragment the signal of amide proton is observed at 10.40-10.36 ppm, it is characteristic for anilides [13]. In ¹H NMR-spectra of amides **3.1-3.11** in the high field two six-proton signals caused by protons at secondary carbon atoms

are observed at 1.73-1.62 ppm (H-4', 6', 10') and 1.98-1.84 ppm (H-2', 8', 9'). Three proton singlet at 2.05-2.01 ppm (H-3', 5', 7') characterize protons located at tertiary carbon atoms of the adamantane fragment [13]. More intricate multiplicity is observed in ¹H NMR-spectra of amides **3.12-3.19**. Axial and equatorial protons of these compounds are caused the appearance of signal series at 1.51-0.92 ppm, 2.16-2.09 ppm, 2.67-2.60 ppm and 3.55-3.39 ppm [12]. All signals of the triazinoquinazoline system are also present in ¹H NMR-spectra of the compounds synthesized. The location and multiplicity of these signals are caused by the nature of the substituent in position 9 and 10.

¹³C NMR-spectra of amides **3.1**, **3.3**, **3.12** correspond to the structure proposed and confirm *S*-regioselectivity of the reaction. The carbon atom of -SCH₂ group is observed at 36.79-35.78 ppm, signals of the secondary carbon atoms are at 36.49 ppm (4', 6', 10') and 41.43 ppm (2', 8', 9'), signals of the tertiary ones (3', 5', 7') – at 29,30-29.23 ppm [12]. Signals of aliphatic carbons of 3-ethylbicyclo[2.2.1]heptane moiety (**3.12**) are located in the high field and correspond to the structure of the compounds synthesized. Signals caused by deshielded carbons in position 2, 6 and amide carbon are also present in the low field of ¹³C NMR-spectra of compounds **3.1**, **3.3**, **3.12**. The signals mentioned are observed at 155.20-155.16, 161.02-160.13 and 166.39-166.17 ppm, respectively.

Table 2

Results of the antiviral activity (Flu A H3N2) for the compounds studied

Comp.	Conc. Range (µg/mL)	Assay	Virus	EC ₅₀	EC ₉₀	CC ₅₀	SI ₅₀	SI ₉₀
3.1	0.1-100	PV	Flu A H3N2	32	–	32	1	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	3.0	–	3.6	1.2	–
3.2	0.1-100	PV	Flu A H3N2	3.2	–	>100	>31	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	4.1	–	>100	>24	–
	0.032-100	SV	Flu A H3N2	6.5	–	>100	>15	–
	0.032-100	SNR	Flu A H3N2	12	–	>100	>8.3	–
	0.032-100	TNR	Flu A H3N2	12	–	>100	>8.3	–
	0.032-100	TVYR/NR	Flu A H3N2	–	45	>100	–	>2.2
3.3	0.1-100	PV	Flu A H3N2	32	–	>100	>3.1	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	27	–	>100	>3.7	–
3.8	0.1-100	PV	Flu A H3N2	15	–	28	1.9	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	25	–	33	1.3	–
3.9	0.1-100	PV	Flu A H3N2	32	–	32	1	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	31	–	>100	>3.2	–
3.10	0.1-100	PV	Flu A H3N2	60	–	>100	>1.7	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	65	–	>100	>1.5	–
3.11	0.1-100	PV	Flu A H3N2	>19	–	19	0	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	31	–	78	2.5	–
3.12	0.1-100	PV	Flu A H3N2	32	–	32	1	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	33	–	>100	>3	–
3.13	0.1-100	PV	Flu A H3N2	32	–	>100	>3.1	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	33	–	85	2.6	–
3.14	0.1-100	PV	Flu A H3N2	4.2	–	>100	>24	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	3.1	–	43	14	–
	0.032-100	SV	Flu A H3N2	18	–	52	2.9	–
	0.032-100	SNR	Flu A H3N2	25	–	88	3.5	–
Ribavirin	0.1-100	PV	Flu A H3N2	12	–	>100	>8.3	–
	0.1-100	PNR	Flu A H3N2	11	–	>100	>9.1	–
	0.032-100	SV	Flu A H3N2	5.5	–	>100	>18	–
	0.032-100	SNR	Flu A H3N2	7.1	–	>100	>14	–
	0.032-100	TNR	Flu A H3N2	7.1	–	>100	>14	–
	0.032-100	TVYR/NR	Flu A H3N2	–	2.3	>100	–	>43

* The table presents the results of the antiviral activity compounds against strains for which the selectivity index $SI_{50} \geq 1$.

2. Evaluation of the antiviral activity

The antiviral activity of substances **3.1-3.19** was determined against respiratory viruses using standard AACF screening assay protocols [16-17]. The research was conducted on the most virulent and pathogenic strains for human Flu A H1N1, Flu A H5N1, Flu A H3N2 and less genetically various strain Flu B.

The results of preliminary tests for PV (inhibition of the viral cytopathic effect) and PNR (increase in NR dye uptake) showed that amides **3.1-3.7** with the adamantane moiety were effective against *Influenza Type A H3N2* (Tab. 2). Thus, N-(1-adamantyl)-2-[(3-methyl-2-oxo-2H-[1,2,4]-triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamide (**3.1**) in these tests exhibited

a moderate antiviral activity (EC_{50} 32 and 3 µg/ml, respectively) and was inferior comparing to Ribavirin (EC_{50} 12 and 11 µg/ml, respectively). The chemical modification of a molecule by introduction of the phenyl fragment in position 3 of 1,2,4-triazino[2,3-c]quinazoline system (compound **3.2**) led to increase of the antiviral activity. Thus, compound **3.2** possessed the lowest virus-inhibiting concentration (EC_{50} =3.1 and 4.2 µg/ml, respectively) in the tests mentioned and the high selectivity index (SI_{50} >31). Substitution of the phenyl fragment by 4-methylphenyl (**3.3**), 4-fluorophenyl (**3.4**) moieties and introduction of fluorine in position 9 (**3.6**) or chlorine (**3.7**) in position 10 did not lead to increase of the activity (SI_{50} >1).

Table 3

Results of the antiviral activity (Flu A H5N1) for the compounds studied

Comp.	Conc. Range (µg/mL)	Assay	Virus	EC ₅₀	EC ₉₀	CC ₅₀	SI ₅₀	SI ₉₀
3.2	0.1-100	PV	Flu A H5N1	3.6	–	>100	>18	–
	0.1-100	PNR	Flu A H5N1	3.3	–	>100	>30	–
	0.032-100	PV	Flu A H5N1	4.3	–	>100	>47	–
	0.032-100	PNR	Flu A H5N1	9.7	–	>100	>21	–
	0.064-200	SV	Flu A H5N1	4.1	–	>100	>49	–
	0.064-200	SNR	Flu A H5N1	5.5	–	>100	>36	–
	0.064-200	TNR	Flu A H5N1	5.5	–	>100	>36	–
	0.064-200	TVYR/NR	Flu A H5N1	–	18	>100	–	>11
Ribavirin	0.1-100	PV	Flu A H5N1	3.2	–	>100	>31	–
	0.1-100	PNR	Flu A H5N1	3.2	–	>100	>31	–
	0.032-100	PV	Flu A H5N1	6.5	–	>100	>15	–
	0.032-100	PNR	Flu A H5N1	5.7	–	>100	>18	–
	0.064-200	SV	Flu A H5N1	0.68	–	>100	>150	–
	0.064-200	SNR	Flu A H5N1	1.7	–	>100	>59	–
	0.064-200	TNR	Flu A H5N1	1.7	–	>100	>59	–
	0.064-200	TVYR/NR	Flu A H5N1	–	2.8	>100	–	>36

Additional tests (SV, SNR and TNR) and VYR-test (decrease in the virus yield assay) for compound **3.2** showed that Ribavirin in this case was more effective anticancer agent. Thus, EC₉₀ for Ribavirin was 2.3 µg/ml (SI₉₀>43), while EC₉₀ level for most active compound **3.2** was 45 µg/ml (SI>2.2, Tab. 2). In the given tests compound **3.14** (SI₅₀>2.9-3.5) was also less effective comparing to Ribavirin (SI₅₀>18).

Aimed to intensify the antiviral activity among the compounds synthesized we also introduced a phenyl "spacer" between the amide group and adamantane (compounds **3.8-3.11**). Unfortunately, this optimization disappointed us; N-[4-(1-adamantyl)phenyl]-2-[3-methyl-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl]thio]acetamides (**3.8-3.11**) showed only a moderate antiviral action (SI₅₀ > 1-3.7, Tab. 2). Replacing adamantane (**3.1-3.7**) and 4-(1-adamantyl)phenyl (**3.8-3.11**) moieties with 3-ethylbicyclo[2.2.1]heptane fragment (**3.12-3.19**) allowed to prepare highly effective compounds (Tab. 2). So, compound **3.14** in PV and PNR-tests exhibited a high antiviral action (EC₅₀ 4.2 and 3.1 µg/ml, respectively, and SI₅₀>24). The following SV and SNR-test showed that compound **3.14** exceeded by EC₅₀ level (EC₅₀ = 18-25 µg/ml, SI₅₀=3.5) was inferior to the activity of Ribavirin (EC₅₀ = 5.5-7.1 µg/ml, SI₅₀>18).

Compound **3.2** was also assayed for its activity on other strains of Flu A viruses. The preliminary screening conducted (PV) on Flu A H₅N₁ strain showed that compound **3.2** possessed the virus inhibitory concentration (EC₅₀ 3.6 µg/ml) at the same level as Ribavirin (EC₅₀ 3.2 µg/ml, Tab. 3). The additional VYR-test confirmed a high antiviral activity of compound **3.2** (EC₉₀ 18 µg/ml; SI₉₀>11), but according to

EC₉₀ value, the virus inhibitory activity of the compound mentioned was lower comparing to Ribavirin (EC₉₀ 2.8 µg/ml; SI₉₀>36).

The similar results were observed in the process of assay for the virus inhibitory activity of compound **3.2** against Flu A H1N1 strain (Tab. 4). Thus, compound **3.2** in VYR-test demonstrated the virus inhibitory effective concentration (EC₉₀) of 18 µg/ml (SI₉₀>2.6), while the concentration of Ribavirin was 4.9 µg/ml (SI₉₀>36).

The preliminary screening (PV- and PNR-test) conducted for **3.1-3.19** against Flu B showed that the moderate antiviral activity were observed for compound **3.1** (SI₅₀>1.2), **3.11** (SI₅₀>1.3) and **3.13** (SI₅₀>1.3). Chemical modification did not lead to increase of the antiviral action, all other compounds were inactive (SI₅₀>1) against Flu B and substantially inferior to Ribavirin (SI₅₀>34).

So, the conclusion has been made that combination of carcass amine moieties with fragments of insufficiently known [9-R¹-10-R²-3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]-triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl]thio]acetic acid results in the compound with a significant antiviral action. High indicators of the antiviral action of **3.2** and **3.14** against *Influenza Type A H3N2* allow to suppose the expediency of further chemical modification of [1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline aimed at the rational search of antiviral agents.

Experimental Part

1. Chemistry

Melting points were determined in open capillary tubes and were uncorrected. Elemental analyses (C, H, N) performed at the ELEMENTAR vario EL

Table 4

Results of the antiviral activity (Flu A H1N1) for the compounds studied

Comp.	Conc. Range ($\mu\text{g/mL}$)	Assay	Virus	EC ₅₀	EC ₉₀	CC ₅₀	SI ₅₀	SI ₉₀
3.2	0.1-100	PV	Flu A H1N1	3.2	–	>100	>31	–
	0.1-100	PNR	Flu A H1N1	3	–	>100	>33	–
	0.032-100	PV	Flu A H1N1	25	–	>100	>4	–
	0.032-100	PNR	Flu A H1N1	6.8	–	32	4.7	–
	0.064-200	SV	Flu A H1N1	8.5	–	>100	>24	–
	0.064-200	SNR	Flu A H1N1	5.7	–	>200	>35	–
	0.064-200	TNR	Flu A H1N1	5.7	–	>200	>35	–
	0.064-200	TVYR/NR	Flu A H1N1	–	77	>200	–	>2.6
Ribavirin	0.1-100	PV	Flu A H1N1	3.2	–	>100	>31	–
	0.1-100	PNR	Flu A H1N1	4.9	–	>100	>20	–
	0.032-100	PV	Flu A H1N1	5.7	–	>100	>18	–
	0.032-100	PNR	Flu A H1N1	5.9	–	>100	>17	–
	0.064-200	SV	Flu A H1N1	6.2	–	>100	>16	–
	0.064-200	SNR	Flu A H1N1	6.2	–	>100	>16	–
	0.064-200	TNR	Flu A H1N1	6.2	–	>100	>16	–
	0.064-200	TVYR/NR	Flu A H1N1	–	4.9	>100	–	>20

Cube analyzer (USA) were within $\pm 0.3\%$ from the theoretical values. IR spectra ($4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$) were recorded on a Bruker ALPHA FT-IR spectrometer (Bruker Bioscience, Germany) using a module for measuring attenuated total reflection (ATR). ^1H NMR spectra (400 MHz) and ^{13}C NMR spectra (100 MHz): were recorded on a Varian-Mercury 400 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) spectrometer with TMS as an internal standard in DMSO- d_6 solution. LC-MS were recorded using the chromatography / mass spectromet-

ric system consisting of an "Agilent 1100 Series" high performance liquid chromatograph (Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipped with a diode-matrix and "Agilent LC/MSD SL" mass-selective detector (atmospheric pressure chemical ionization – APCI). Electron impact mass spectra (EI-MS) were recorded on a Varian 1200 L instrument at 70 eV (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA).

Substances **1.1-1.12** and **2.1-2.7** were synthesized according to the reported procedures [16, 17].

Table 5

Results of the antiviral activity (Flu B) for the compounds studied

Comp.	Conc. Range ($\mu\text{g/mL}$)	Assay	Virus	EC ₅₀	EC ₉₀	CC ₅₀	SI ₅₀
3.1	0.1-100	PV	Flu B	3.2	–	3.2	1
	0.1-100	PNR	Flu B	3	–	3.7	1.2
3.9	0.1-100	PV	Flu B	32	–	32	1
3.11	0.1-100	PV	Flu B	>24	–	24	0
	0.1-100	PNR	Flu B	28	–	35	1.3
3.12	0.1-100	PV	Flu B	>18	–	18	0
	0.1-100	PNR	Flu B	17	–	17	1
	0.1-100	PNR	Flu B	>33	–	33	0
3.13	0.1-100	PV	Flu B	32	–	32	1
	0.1-100	PNR	Flu B	23	–	27	1.3
3.14	0.1-100	PV	Flu B	32	–	32	1
	0.1-100	PNR	Flu B	30	–	34	1.1
Ribavirin	0.32-320	PV	Flu B	10	–	>320	>32
	0.32-320	PNR	Flu B	9.3	–	>320	>34

* The table presents the results of the antiviral activity of compounds against strains for which the selectivity index $\text{SI} \geq 1$

Other starting materials and solvents were obtained from commercially available sources and used without additional purification.

General procedure for synthesis of N-(1-adamantyl)-, N-(4-(1-adamantyl)phenyl)-, (3-ethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-2-[(9-R¹-10-R²-3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]-triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (3.1-3.18)

Method A. N-cycloalkyl-(cycloaralkyl)-2-chloroacetamides (0.011 mol) were added to the suspension of potassium salt of 9-R¹-10-R²-3-R-6-thio-6,7-dihydro-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-2-ones (**1.1-1.11**) (0.01 mol) in 20 ml of propanol-2, water-propanol-2 (1:2) and refluxed for 60-90 min. The mixture was cooled and poured in water. The precipitate was filtered, dried and recrystallized from dioxane-water (1:1).

Method B. Thionyl chloride (1.2 g, 0.011 mol) was added to the solution of proper acid (**2.1-2.5**) (0.01 mol) in 10 mL of anhydrous dioxane with subsequent adding of 2-3 drops of DMF. The mixture was heated on the water bath at 60-80°C till complete elimination of hydrochloric acid. Then proper amine (0.01 mol) was added to the resulting mixture with stirring and refluxing for 2-3 h. The mixture was poured into water, neutralized to pH 6-7 by acetic acid. The precipitate was filtered, dried and recrystallized from dioxane-water (1:1).

Method C. N,N'-carbonyldiimidazole (1.95 g, 0.011 mol) was added to the solution of proper acid (**2.1-2.4, 2.6, 2.9**) (0.01 mol) in 10 mL of anhydrous dioxane or DMF and heated on the water bath at 60-80°C for 1 h with a calcium chloride tube. The proper amine (0.01 mol) was added with stirring to the resulting mixture and refluxed for 5-6 h. The mixture was poured in water, neutralized to pH 6-7 by acetic acid. The precipitate was filtered, dried and recrystallized from dioxane-water (1:1).

N-(Adamantyl-1)-2-[(3-methyl-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (3.1). IR (cm⁻¹): 3516, 3358, 3259, 3077, 2907, 2849, 1676, 1663, 1585, 1558, 1505, 1470, 1425, 1388, 1360, 1344, 1306, 1286, 1265, 1210, 1165, 1139, 1103, 1045, 998, 956, 885, 862, 813, 773, 687, 633, 608; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.62 (s, 6H, H-4', 6', 10' Ad), 1.96 (s, 6H, H-2', 8', 9' Ad), 2.01 (s, 3H, H-3', 5', 7' Ad), 2.39 (s, 3H, 3-CH₃), 3.94 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.67 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-10), 7.74 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-8), 7.84 (s, 1H, -NH), 7.98 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-9), 8.46 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-11); ¹³C-NMR (100 MHz) δ: 18.18 (CH₃), 29.23 (3', 5', 7' Ad), 36.49 (4', 6', 10' Ad), 36.68 (-SCH₂), 41.43 (2', 8', 9' Ad), 51.72 (1' Ad), 118.55 (11a), 126.05 (8), 126.65 (10), 127.88 (11), 136.03 (9), 144.24 (11b), 151.94 (3), 154.94 (7a), 155.16 (6), 161.02 (2), 166.17 (CONH); LC-MS, m/z = 436 [M+1], 438 [M+3]; Anal. calcd. for C₂₃H₂₅N₅O₂S: C, 63.43; H, 5.79; N, 16.08; S, 7.36; Found: C, 63.42; H, 5.79; N, 16.08; S, 7.34.

N-(Adamantyl-1)-2-[(3-phenyl-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (3.2). IR (cm⁻¹): 3287, 3067, 2904, 2848, 1674, 1644, 1590, 1555, 1509, 1487, 1469, 1455, 1359, 1337, 1310, 1286, 1269, 1242, 1183, 1161, 1136, 1102, 1020, 988, 939, 878, 844, 811, 782, 773, 753, 688, 668, 653, 615; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.63 (s, 6H, H-4', 6', 10' Ad), 1.97 (s, 6H, H-2', 8', 9' Ad), 2.01 (s, 3H, H-3', 5', 7' Ad), 3.99 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.64-7.57 (m, 3H, H-3', 4', 5' 3-Ph), 7.69 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-10), 7.76 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-8), 7.88 (s, 1H, -NH), 8.01 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-9), 8.28 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H-2', 6' 3-Ph), 8.49 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-11); LC-MS, m/z = 498 [M+1], 500 [M+3]; Anal. calcd. for C₂₈H₂₇N₅O₂S: C, 67.58; H, 5.47; N, 14.07; S, 6.44; Found: C, 67.58; H, 5.47; N, 14.09; S, 6.46.

N-(Adamantyl-1)-2-[(3-(4-methylphenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (3.3). IR (cm⁻¹): 3318, 3065, 3037, 2972, 2905, 2849, 1682, 1658, 1588, 1562, 1538, 1496, 1470, 1453, 1399, 1377, 1359, 1339, 1321, 1304, 1285, 1269, 1240, 1182, 1164, 1154, 1139, 1119, 1089, 1045, 989, 939, 876, 831, 810, 784, 770, 710, 701, 685, 653, 641, 625; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.63 (s, 6H, H-4', 6', 10' Ad), 1.98 (s, 6H, H-2', 8', 9' Ad), 2.01 (s, 3H, H-3', 5', 7' Ad), 2.42 (s, 3H, 3-(4-CH₃Ph)), 3.99 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.39 (d, 2H, H-3', 5' 3-(4-CH₃Ph)), 7.68 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-10), 7.82-7.74 (m, 2H, H-8, -NH), 7.98 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-9), 8.24 (d, 2H, H-2', 6' 3-(4-CH₃Ph)), 8.48 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-11); ¹³C-NMR (100 MHz): δ: 21.66 (CH₃), 29.30 (3', 5', 7' Ad), 36.49 (4', 6', 10' Ad), 36.79 (-SCH₂), 41.43 (2', 8', 9' Ad), 51.74 (1' Ad), 118.25 (11a), 126.09 (8), 126.73 (10), 127.93 (11), 129.32 (1' Ph), 129.53 (2', 6' Ph), 129.78 (3', 5' Ph), 135.99 (9), 142.20 (4' Ph), 144.20 (3), 149.29 (11b), 150.80 (7a), 155.20 (6), 160.13 (2), 166.17 (CONH); LC-MS, m/z = 512 [M + 1], 514 [M + 3]; Anal. calcd. for C₂₉H₂₉N₅O₂S: C, 68.08; H, 5.71; N, 13.69; S, 6.27; Found: C, 69.00; H, 5.71; N, 13.70; S, 6.27.

N-(Adamantyl-1)-2-[(3-(4-fluorophenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (3.4). IR (cm⁻¹): 3358, 2905, 2888, 2846, 1745, 1675, 1660, 1587, 1562, 1547, 1511, 1492, 1465, 1408, 1357, 1338, 1317, 1297, 1267, 1230, 1183, 1171, 1157, 1135, 1099, 1072, 1015, 992, 940, 894, 840, 813, 803, 769, 714, 704, 694, 676, 669, 637, 619; ¹H NMR δ: 1.67 (br.s., 6H, H-4, 4', 6, 6', 10, 10' Ad), 1.99 (br.s., 6H, H-2, 2', 8, 8', 9, 9' Ad), 2.06 (br.s., 3H, H-3, 5, 7 Ad), 3.94 (s, 2H, S-CH₂-), 7.32 (t, J = 7.7 Hz, 2H, 3-Ph H-3', 5'), 7.67 (m, 2H, -NH, H-10), 7.76 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-8), 7.94 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-9), 8.53 (d, J = 5.5 Hz, 2H, 3-Ph H-2', 6'), 8.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-11); LC-MS, m/z = 516 [M + 1], 518 [M + 3]; Anal. calcd. for C₂₈H₂₆FN₅O₂S: C, 65.22; H, 5.08; F, 3.68; N, 13.58; S, 6.22; Found: C, 65.20; H, 5.08; F, 3.68; N, 13.55; S, 6.25.

N-(Adamantyl-1)-2-[(9-fluoro-2-oxo-3-phenyl-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.5**). IR (cm⁻¹): 3309, 3080, 2905, 2850, 1673, 1649, 1591, 1566, 1556, 1512, 1479, 1443, 1346, 1317, 1283, 1259, 1213, 1193, 1165, 1129, 1102, 988, 971, 927, 881, 860, 841, 811, 753, 704, 686, 653, 625; ¹H NMR δ: 1.67 (br.s., 6H, H-4, 4', 6, 6', 10, 10' Ad); 1.98 (br.s., 6H, H-2, 2', 8, 8', 9, 9' Ad), 2.06 (br.s., 3H, H-3, 5, 7 Ad), 3.93 (s, 2H, S-CH₂-), 7.82-7.21 (m, 6H, H-8, 10, 3-Ph H-3', 4', 5', -NH), 8.33 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, 3-Ph H-2', 6'), 8.61 (dd, *J* = 7.7, 5.9 Hz, 1H, H-11); LC-MS, *m/z* = 516 [M + 1], 518 [M + 3]; Anal. calcd. for C₂₈H₂₆FN₅O₂S: C, 65.22; H, 5.08; F, 3.68; N, 13.58; S, 6.22; Found: C, 65.23; H, 5.08; F, 3.68; N, 13.59; S, 6.20

N-(Adamantyl-1)-2-[[9-fluoro-3-(4-fluorophenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl]thio]acetamides (**3.6**). IR (cm⁻¹): 3271, 3069, 2903, 2850, 1673, 1657, 1620, 1598., 1585, 1570, 1555, 1510, 1501, 1483, 1471, 1445, 1413, 1368, 1344, 1324, 1298, 1279, 1262, 1242, 1227, 1175, 1159, 1128, 1100, 1093, 1070, 10456, 1015, 994, 973, 960, 930, 909, 869, 859, 822, 799, 761, 730, 714, 696, 678, 655, 637, 620; ¹H NMR δ: 1.67 (br.s., 6H, H-4, 4', 6, 6', 10, 10' Ad), 1.98 (br.s., 6H, H-2, 2', 8, 8', 9, 9' Ad), 2.06 (br.s., 3H, H-3, 5, 7 Ad), 3.94 (s, 2H, S-CH₂-), 7.34 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, 3-Ph H-3', 5'), 7.56-7.41 (m, 2H, H-8, H-10), 7.69 (br.s, 1H, -NH), 8.51-8.32 (m, 2H, 3-Ph H-2', 6'), 8.65-8.52 (m, 1H, H-11); LC-MS, *m/z* = 534 [M + 1], 536 [M + 3]; Anal. calcd. for C₂₈H₂₅F₂N₅O₂S: C, 63.03; H, 4.72; F, 7.12; N, 13.12; S, 6.01; Found: C, 63.06; H, 4.72; F, 7.12; N, 13.11; S, 6.00.

N-(Adamantyl-1)-2-[[10-chloro-3-(4-fluorophenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl]thio]acetamides (**3.7**). IR (cm⁻¹): 3271, 3052, 2902, 2849, 16734, 1657, 1585, 1550, 1539, 1509, 1497, 1467, 1411, 1368, 1360, 1336, 1324, 1310, 1281, 1256, 1232, 1213, 1164, 1136, 1120, 1104, 1089, 1046, 1013, 990, 954, 908, 894, 857, 830, 821, 800, 769, 744, 731, 708, 691, 671, 638, 623; ¹H NMR δ: 1.67 (br.s., 6H, H-4, 4', 6, 6', 10, 10' Ad), 1.98 (br.s., 6H, H-2, 2', 8, 8', 9, 9' Ad), 2.03 (br.s., 3H, H-3, 5, 7 Ad), 3.93 (s, 2H, S-CH₂-), 7.33 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, 3-Ph H-3', 5'), 7.68 (s, 1H, -NH), 7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-9), 7.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-8), 8.45 (m, 3H, H-11, 3-Ph H-2', 6'); LC-MS, *m/z* = 551 [M + 1], 553 [M + 3]; Anal. calcd. for C₂₈H₂₅ClFN₅O₂S: C, 61.14; H, 4.58; Cl, 6.45; F, 3.45; N, 12.73; S, 5.83; Found: C, 61.17; H, 4.58; Cl, 6.45; F, 3.45; N, 12.72; S, 5.81.

N-[4-(1-Adamantyl)phenyl]-2-[(3-methyl-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.8**). IR (cm⁻¹): 3251, 3184, 2897, 2845, 1655, 1583, 1558, 1503, 1466, 1449, 1433, 1405, 1393, 1361, 1332, 1315, 1286, 1259, 1220, 1206, 1190, 1163, 1131, 1101, 1046, 1016, 969, 955, 832, 807, 772, 715, 699, 685, 630, 607; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.73 (s, 6H, H-4', 6', 10' Ad), 1.84 (s, 6H, H-2', 8', 9' Ad),

2.05 (s, 3H, H-3', 5', 7' Ad), 2.39 (s, 3H, 3-CH₃-), 4.21 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5' -NHC₆H₄-Ad), 7.55 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6' -NHC₆H₄-Ad), 7.66 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-10), 7.70 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-8), 7.95 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-9), 8.45 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-11), 10.36 (s, 1H, -NH); LC-MS, *m/z* = 512 [M+1], 514 [M+3]; Anal. calcd. for C₂₉H₂₉N₅O₂S: C, 68.08; H, 5.71; N, 13.69; S, 6.27; Found: C, 68.10; H, 5.71; N, 13.70; S, 6.29.

N-[4-(1-Adamantyl)phenyl]-2-[(3-phenyl-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.9**). IR (cm⁻¹): 3349, 3047, 2982, 2899, 2849, 1678, 1657, 1596, 1587, 1564, 1546, 1519, 1498, 1486, 1470, 1444, 1407, 1380, 1341, 1331, 1311, 1287, 1263, 1246, 1237, 1187, 1171, 1138, 1100, 1076, 1033, 1017, 1002, 988, 963, 941, 895, 877, 848, 836, 810, 779, 768, 751, 706, 687, 665, 654, 636; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.73 (s, 6H, H-4', 6', 10' Ad), 1.84 (s, 6H, H-2', 8', 9' Ad), 2.05 (s, 3H, H-3', 5', 7' Ad), 4.25 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.31 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5' -NHC₆H₄-Ad), 7.56 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6' -NHC₆H₄-Ad), 7.77-7.59 (m, 5H, H-3', 4', 5' 3-Ph, H-8, 10), 7.98 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-9), 8.30 (d, 2H, *J* = 7.3, H-2', 6' 3-Ph), 8.49 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-11), 10.40 (s, 1H, -NH); EI-MS, *m/z* (I_{rel}, %) = 396 (6.3), 395 (5.7), 348 (16.9), 347 (73.5), 346 (49.1), 345 (16.1), 339 (7.2), 316 (5.4), 307 (8.7), 302 (15.9), 301 (64.8), 269 (16.0), 268 (5.2), 258 (5.1), 254 (13.8), 253 (57.9), 252 (10.8), 246 (7.0), 245 (16.1), 244 (99.9), 243 (26.4), 240 (5.4), 228 (5.8), 227 (49.5), 226 (8.0), 218 (25.8), 217 (29.8), 216 (58.8), 213 (8.9), 212 (7.1), 211 (7.0), 210 (16.6), 197 (9.5), 196 (55.8), 195 (5.6), 189 (5.4), 188 (9.0), 186 (7.2), 185 (20.9), 184 (11.2), 183 (7.0), 182 (8.6), 180 (6.1), 179 (8.3), 178 (43.2), 170 (42.5), 161 (5.0), 160 (5.6), 159 (17.8), 158 (9.6), 157 (9.0), 156 (20.0), 155 (8.7), 154 (9.4), 153 (12.0), 152 (9.6), 148 (21.9), 145 (8.0), 144 (7.8), 143 (16.9), 142 (7.5), 141 (6.0), 135 (22.4), 134 (8.4), 133 (24.1), 132 (32.9), 131 (12.6), 130 (16.0), 129 (22.9), 128 (18.2), 127 (12.5), 119 (10.4), 118 (21.9), 117 (22.4), 116 (18.3), 115 (12.5), 106 (5.3), 105 (7.2), 104 (14.4), 103 (80.9), 101 (12.8), 95 (7.0), 94 (27.6), 93 (34.4), 92 (12.9), 90 (12.7), 89 (10.5), 86 (13.8), 79 (26.3), 77 (10.2), 75 (5.4), 67 (16.5), 66 (7.4), 65 (21.6), 64 (14.3), 63 (15.4), 56 (14.9), 55 (19.1), 53 (6.1), 47 (9.2), 43 (15.2), 41 (21.1) LC-MS, *m/z* = 574 [M+1], 575 [M+2], 576 [M+3]; Anal. calcd. for C₃₄H₃₁N₅O₂S: C, 71.18; H, 5.45; N, 12.21; S, 5.59; Found: C, 71.19; H, 5.45; N, 12.23; S, 5.61.

N-[4-(1-Adamantyl)phenyl]-2-[(3-(4-methylphenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.10**). IR (cm⁻¹): 3344, 2982, 2915, 2898, 2882, 2849, 1675, 1655, 1584, 1562, 1542, 1517, 1490, 1469, 1451, 1406, 1368, 1340, 1329, 1308, 1285, 1264, 1237, 1189, 1139, 1125, 1106, 1071, 1036, 1017, 989, 961, 942, 893, 875, 834, 807, 779, 768, 708, 686, 665, 643, 624; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.73 (s, 6H, H-4', 6', 10' Ad), 1.84 (s, 6H, H-2', 8',

9' Ad), 2.05 (s, 3H, H-3', 5', 7' Ad), 2.42 (s, 3H, 3-(4-CH₃Ph)), 4.25 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.31 (d, 2H, *J* = 8.5, H-3', 5' -NHC₆H₄-Ad), 7.41 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, H-3', 5' 3-(4-CH₃Ph)), 7.56 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6' -NHC₆H₄-Ad), 7.68 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-10), 7.74 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-8), 7.99 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-9), 8.25 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, H-2', 6' 3-(4-CH₃Ph)), 8.49 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-11), 10.39 (s, 1H, -NH); LC-MS, *m/z* = 588 [M+1], 590 [M+3]; Anal. calcd. for C₃₅H₃₃N₅O₂S: C, 71.53; H, 5.66; N, 11.92; S, 5.46; Found: C, 71.53; H, 5.66; N, 11.92; S, 5.44.

N-[4-(1-Adamantyl)phenyl]-2-[(3-(4-methoxyphenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.11**). IR (cm⁻¹): 3346, 2982, 2898, 2849, 1678, 1654, 1597, 1563, 1538, 1518, 1504, 1490, 1469, 1452, 1406, 1370, 1341, 1315, 1304, 1255, 1244, 1177, 1140, 1117, 1050, 1036, 1016, 989, 942, 879, 843, 808, 780, 769, 722, 701, 687, 665, 643, 621; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.73 (s, 6H, H-4', 6', 10' Ad), 1.84 (s, 6H, H-2', 8', 9' Ad), 2.05 (s, 3H, H-3', 5', 7' Ad), 3.88 (s, 3H, 3-(4-CH₃OPh)), 4.25 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.17 (d, 2H, *J* = 8.3, H-3', 5' 3-(4-CH₃OPh)), 7.31 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5' -NHC₆H₄-Ad), 7.56 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6' -NHC₆H₄-Ad), 7.68 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-10), 7.74 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-8), 7.97 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-9), 8.39 (d, 2H, *J* = 8.3, H-2', 6' 3-(4-CH₃OPh)), 8.49 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-11), 10.40 (s, 1H, -NH); LC-MS, *m/z* = 604 [M+1], 607 [M+3]; Anal. calcd. for C₃₅H₃₃N₅O₃S: C, 69.63; H, 5.51; N, 11.60; S, 5.31; Found: C, 69.64; H, 5.51; N, 11.61; S, 5.32.

N-(3-Ethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)-2-[(3-methyl-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.12**). IR (cm⁻¹): 3287, 2944, 2866, 1667, 1636, 1584, 1558, 1538, 1509, 1469, 1454, 1418, 1386, 1360, 1337, 1287, 1261, 1208, 1173, 1133, 1102, 1045, 955, 880, 856, 768, 698, 685, 630, 607; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.48-0.94 (m, 11H, 3-CH₃CH₂-, 3-CH₃CH₂-, 5, 5', 6, 6', 7, 7' bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.16-2.09 (m, 2H, H-3, 4 bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.38 (s, 3H, 3-CH₃), 2.66 (m, 1H, H-1 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.50-3.39 (m, 1H, H-2 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.96 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.66 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-10), 7.73 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-8), 7.97 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-9), 8.05 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, -NHC(O)-), 8.46 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-11); ¹³C-NMR (100 MHz) δ: 18.17 (CH₃), 18.79 (CH₃CH₂), 20.70 (6'), 28.87 (CH₃CH₂), 30.33 (5'), 35.78 (-SCH₂), 36.33 (7'), 36.85 (1'), 38.95 (4'), 48.51 (3'), 49.37 (2'), 118.50 (11a), 125.99 (8), 126.70 (10), 127.90 (11), 135.91 (9), 144.21 (3), 151.92 (11b), 154.74 (7a), 155.16 (6), 160.98 (2), 166.39 (CONH); EI-MS, *m/z* (I_{rel}, %) = 303 (7.2), 302 (45.1), 285 (31.8), 246 (7.9), 245 (24.1), 244 (100.0), 143 (16.3), 218 (5.6), 217 (17.7), 216 (51.5), 188 (4.9), 179 (6.3), 170 (7.9), 148 (12.6), 143 (7.7), 129 (7.0), 123 (5.9), 122 (9.0), 95 (24.4), 93 (14.0), 91 (5.3), 90 (8.6), 81 (11.8), 67 (20.2), 57 (8.7), 56 (9.4), 55 (12.9); LC-MS, *m/z* = 424 [M+1], 426 [M+3]; Anal. calcd. for C₂₂H₂₅N₅O₂S:

C, 62.39; H, 5.95; N, 16.54; S, 7.57; Found: C, 62.40; H, 5.95; N, 16.54; S, 7.58.

N-(3-Ethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)-2-[(3-(4-methylphenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.13**). IR (cm⁻¹): 3285, 3078, 2950, 2868, 1668, 1633, 1589, 1562, 1549, 1501, 1468, 1454, 1391, 1372, 1335, 1308, 1270, 1239, 1183, 1135, 1104, 1019, 991, 939, 830, 782, 770, 712, 699, 684, 641, 626; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.51-0.94 (m, 11H, 3-CH₃CH₂-, 3-CH₃CH₂-, 5, 5', 6, 6', 7, 7' bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.16-2.09 (m, 2H, H-3, 4 bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.42 (s, 3H, 3-(4-CH₃Ph)), 2.67 (m, 1H, H-1 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.60-3.41 (m, 1H, H-2 bicyclo[2.2.1]heptyl), 4.00 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.41 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-3, H-5 4-CH₃Ph), 7.68 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-10), 7.76 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-8), 7.98 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-9), 8.07 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, -NHC(O)-), 8.24 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-2, H-6 4-CH₃Ph), 8.48 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-11); LC-MS, *m/z* = 500 [M+1], 502 [M+3]; Anal. calcd. for C₂₈H₂₉N₅O₂S: C, 67.31; H, 5.85; N, 14.02; S, 6.42; Found: C, 67.31; H, 5.85; N, 14.02; S, 6.42.

N-(3-Ethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)-2-[(3-(4-methoxyphenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.14**). IR (cm⁻¹): 3274, 3067, 2945, 2866, 1668, 1643, 1590, 1563, 1545, 1500, 1469, 1454, 1421, 1372, 1340, 1317, 1306, 1288, 1272, 1259, 1238, 1174, 1137, 1105, 1049, 1016, 989, 965, 940, 878, 840, 810, 766, 723, 700, 684, 641, 622; ¹H-NMR (400 MHz) δ: 1.47-0.92 (m, 11H, 3-CH₃CH₂-, 3-CH₃CH₂-, 5, 5', 6, 6', 7, 7' bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.16-2.11 (m, 2H, H-3, 4 bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.60 (m, 1H, H-1 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.55-3.43 (m, 1H, H-2' bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.87 (s, 3H, 3-(4-CH₃OPh)), 4.00 (s, 2H, -S-CH₂-), 7.16 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, H-3, H-5 4-CH₃OPh), 7.68 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-10), 7.76 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-8), 7.98 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-9), 8.08 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, -NHC(O)-), 8.37 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, H-2, H-6 4-CH₃OPh), 8.48 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-11); LC-MS, *m/z* = 516 [M+1], 518 [M+3]; Anal. calcd. for C₂₈H₂₉N₅O₃S: C, 65.22; H, 5.67; N, 13.58; S, 6.22; Found: C, 65.24; H, 5.67; N, 13.56; S, 6.20.

N-(3-Ethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-2-[(9-fluoro-3-(4-methoxyphenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.15**). IR (cm⁻¹): 3289, 3072, 2954, 2869, 1667, 1634, 1591, 1564, 1546, 1502, 1477, 1455, 1443, 1422, 1392, 1350, 1323, 1285, 1259, 1217, 1176, 1164, 1131, 1104, 1071, 1023, 992, 974, 926, 872, 841, 808, 779, 766, 723, 694, 681, 641, 619; ¹H NMR δ: 1.74-0.64 (m, 11H, 3-CH₃CH₂-, 3-CH₃CH₂-, 5, 5', 6, 6', 7, 7' bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.12 (m, 1H, H-3 bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.18 (m, 1H, H-4 bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.69 (m, 1H, H-1 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.46 (s, 1H, H-2 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.91 (s, 3H, O-CH₃), 3.94 (s, 2H, S-CH₂-), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 3-Ph H-3', 5'), 7.51-7.42 (m, 1H, H-10), 8.17 (s, 1H, H-8), 8.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 3-Ph H-2', 6'), 8.66-8.52 (m, 1H, H-11); LC-MS, *m/z* = 534

[M + 1], 536 [M + 3]; Anal. calcd. for C₂₈H₂₈FN₅O₃S: C, 63.02; H, 5.29; F, 3.56; N, 13.12; S, 6.01; Found: C, 63.05; H, 5.29; F, 3.56; N, 13.10; S, 6.03.

N-(3-Ethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)-2-[[9-fluoro-3-(4-fluorophenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl]thio]acetamides (**3.16**). IR (cm⁻¹): 3270, 3073, 2954, 2871, 1672, 1644, 1586, 1555, 1510, 1498, 1483, 1445, 1412, 1375, 1347, 1321, 1297, 1279, 1262, 1229, 1159, 1132, 1101, 1070, 1015, 995, 973, 929, 869, 858, 847, 823, 761, 715, 696, 679, 657, 637, 621; ¹H NMR δ: 1.66-0.64 (m, 14H, 3-CH₃CH₂-, 3-CH₃CH₂-, H-1, 3, 4, 5, 5', 6, 6', 7, 7' bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.67-3.40 (m, 1H, H-2 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.95 (s, 2H, S-CH₂-), 7.33 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H, 3-Ph H-3', 5'), 7.57-7.42 (m, 2H, H-8, 10), 8.18 (s, 1H, NH), 8.52-8.39 (m, 2H, 3-Ph H-2', 6'), 8.61 (dd, *J* = 10.6, 5.4 Hz, 1H, H-11); LC-MS, *m/z* = 522 [M + 1], 524 [M + 3]; Anal. calcd. for C₂₇H₂₅F₂N₅O₂S: C, 62.17; H, 4.83; F, 7.28; N, 13.43; S, 6.15; Found: C, 62.19; H, 4.83; F, 7.28; N, 13.45; S, 6.14.

N-(3-Ethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-2-[(9-bromo-3-(4-fluorophenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.17**). IR (cm⁻¹): 3275, 3072, 2949, 2868, 1670, 1639, 1583, 1556, 1498, 1458, 1424, 1411, 1392, 1373, 1339, 1312, 1296, 1270, 1237, 1179, 1161, 1149, 1103, 1075, 1060, 991, 968, 939, 895, 845, 820, 765, 715, 681, 647, 615; ¹H NMR δ: 1.66-0.78 (m, 12H, 3-CH₃CH₂-, 3-CH₃CH₂-, H-3, 5, 5', 6, 6', 7, 7' bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.25-2.03 (m, 2H, H-1, 4 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.61-3.42 (m, 1H, H-2 bicyclo[2.2.1]heptyl), 4.04-3.81 (m, 2H, S-CH₂-), 7.32 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, 3-Ph H-3', 5'), 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-10), 8.07-7.82 (m, 2H, H-8, NH), 8.53-8.34 (m, 3H, H-11, 3-Ph H-2', 6'); LC-MS, *m/z* = 582 [M + 0], 586 [M + 4]; Anal. calcd. for C₂₇H₂₅BrFN₅O₂S: C, 55.67; H, 4.33; Br, 13.72; F, 3.26; N, 12.02; S, 5.50; Found: C, 55.69; H, 4.33; Br, 13.72; F, 3.26; N, 12.00; S, 5.53.

N-(3-Ethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-2-(10-bromo-3-(4-fluorophenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides (**3.18**). IR (cm⁻¹): 3278, 2952, 2868, 1668, 1644, 1588, 1556, 1496, 1466, 1412, 1377, 1336, 1283, 1261, 1236, 1218, 1175, 1161, 1139, 1121, 1103, 1077, 1064, 1015, 991, 952, 896, 845, 773, 730, 717, 691, 669, 656, 635, 624; ¹H NMR δ: 1.67-0.59 (m, 12H, 3-CH₃CH₂-, 3-CH₃CH₂-, H-3, 5, 5', 6, 6', 7, 7' bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.29-1.98 (m, 2H, H-1, 4 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.61-3.32 (m, 1H, H-2 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.96 (s, 2H, S-CH₂-), 7.34 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H, 3-Ph H-3', 5'), 7.70 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-9), 8.11-7.96 (m, 2H, H-8, NH), 8.43 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, 3-Ph H-2', 6'), 8.58 (s, 1H, H-11); LC-MS, *m/z* = 582 [M + 0], 586 [M + 4]; Anal. calcd. for C₂₇H₂₅BrFN₅O₂S: C, 55.67; H, 4.33; Br, 13.72; F, 3.26; N, 12.02; S, 5.50; Found: C, 55.69; H, 4.33; Br, 13.72; F, 3.26; N, 12.00; S, 5.51.

N-(3-Ethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)-2-[[10-iodo-3-(4-fluorophenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazo-

lin-6-yl]thio]acetamides (**3.19**). IR (cm⁻¹): 3274, 3080, 2946, 2866, 1667, 1641, 1585, 1555, 1495, 1462, 1410, 1374, 1331, 1280, 1261, 1234, 1216, 1158, 1138, 1101, 1074, 1013, 988, 946, 843, 771, 717, 688, 646, 633, 622; ¹H NMR δ: 1.58-0.82 (m, 12H, 3-CH₃CH₂-, 3-CH₃CH₂-, H-3, 5, 5', 6, 6', 7, 7' bicyclo[2.2.1]heptyl), 2.28-2.00 (m, 2H, H-1, 4 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.63-3.33 (m, 1H, H-2 bicyclo[2.2.1]heptyl), 3.95 (s, 2H, S-CH₂-), 7.33 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H, 3-Ph H-3', 5'), 7.55 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H-8), 8.08 (m, 1H, NH), 8.18 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-9), 8.46 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, 3-Ph H-2', 6'), 8.79 (s, 1H, H-11); LC-MS, *m/z* = 630 [M + 1], 632 [M + 3]; Anal. calcd. for C₂₇H₂₅FIN₅O₂S: C, 51.52; H, 4.00; F, 3.02; I, 20.16; N, 11.13; S, 5.09; Found: C, 51.55; H, 4.00; F, 3.02; I, 20.16; N, 11.10; S, 5.08.

2. Methods for assay of the antiviral activity

A. Rapid Screening Assay

The primary antiviral assay was performed at a respiratory viruses panel (Flu A H1N1/California/07/2009/MDCK, Flu A H3N2/Perth/16/2009/MDCK, Flu A H5N1/Vietnam/1203/2004H/MDCK, Flu B/Florida/4/2006/MDCK) with the protocol of the NIAID's Antimicrobial Acquisition and Coordination [27-29]. This drug was ribavirin for Flu A H1N1, Flu A H3N2, Flu A H5N1, Flu B.

Results for each compound tested were reported as the virus-inhibitory concentration, 50% endpoint (EC₅₀ μg/ml), or 90% effective concentration (EC₉₀ μg/ml) and the cell-inhibitory concentration, 50% endpoint (CC₅₀ μg/ml) were determined. The total selectivity index (SI₅₀) was calculated as a ratio of (EC₅₀)/(CC₅₀). The SI₅₀ of 3 or greater indicates that confirmatory testing is needed.

2.1. Inhibition of the Viral Cytopathic Effect (CPE)

This test, run in 96 well flat-bottomed microplates, was used for the initial antiviral evaluation of compounds. In this CPE inhibition test, four log₁₀ dilutions of each test compound (e.g. 1000, 100, 10, 1 Eg/ml) were added to 3 cups containing the cell monolayer; within 5 min. At the next step the virus was added and the plate was sealed and incubated at 37 °C. The CPE read microscopically when untreated infected controls developed a 3 to 4+ CPE (approximately 72 to 120 h). The known positive control drug was evaluated in parallel with test drugs in each test.

2.2. Increase in Neutral Red (NR) Dye Uptake

This test was run to validate the CPE inhibition seen in the initial test, and utilized the same 96-well microplates after the CPE had been read. When neutral red was added to the medium, cells that were not damaged by virus took up a greater amount of dye displayed on a computerized microplate autoreader. The EC₅₀ was determined from this dye uptake.

2.3. Decrease in the Virus Yield Assay (VYR-test)

Compounds considered active by CPE inhibition and by NR dye uptake were re-tested on reduction

of the virus yield by assaying frozen and thawed eluates from each cup for a virus titer by serial dilution onto monolayers of susceptible cells. Development of CPE in these cells is indication of the presence of an infectious virus. Similarly as in the initial tests, a known active drug were run in parallel as a positive control. The 90% effective concentration (EC_{90}), being the drug concentration inhibiting the virus yield by $1 \log_{10}$, was determined from these data.

2.4. Methods for assay of cytotoxicity

In the CPE inhibition tests, two wells of uninfected cells treated with each concentration of the test compounds was run in parallel with the infected, treated wells. At the time CPE was determined microscopically. The toxicity control cells were also examined microscopically for any changes in cell appearance compared to normal control cells run in the same plate. These changes may be enlargement, granularity, cells with ragged edges, filmy appearance, rounding, detach-

ment from the surface of the well, or other changes. These changes were given a designation of T (100% toxic), PVH (partially toxic-very heavy-80%), PH (partially toxic-heavy-60%), P (partially toxic-40%), Ps (partially toxic-slight-20%), or 0 (no toxicity-0%), conforming to the degree of cytotoxicity seen. The 50% cell inhibitory (cytotoxic) concentration (IC_{50}) was determined by regression analysis of these data.

Conclusions

A new class of potent antiviral agents, namely of [9- R^1 -10- R^2 -3- R -2-oxo-2H-[1,2,4]-triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl]thio]acetamides derivatives with the fragments of carcass amines has been developed. High indicators of the antiviral action of **3.2** and **3.14** against Influenza Type A H3N2 allow to suppose the expediency of further chemical modification of [1,2,4]triazino [2,3-c]quinazoline aimed at the rational search of antiviral agents.

References

1. <http://www.drugbank.ca/>
2. Morozov I. S., Petrov V. I., Sergeev S. A. *Farmakologiya adamantanov – Pharmacology of adamantines*, Volgograd, 2001, 320 p.
3. Geldenhuis W. J., Malan S. F., Bloomquist J. R., Marchand A. P., Van der Schyf C. J. *Med. Res. Rev.*, 2005, Vol. 25, pp.21-48. doi: 10.1002/med.20013
4. Pat. US 20130231391 A1 Adamantane derivatives possessing anti-viral and anti-microbial activity, B.Vithal Shetty; Vymed Corporation (USA), Application Date: 15.02.2013, Publication Date: 05.08.2013.
5. Leonova M. V., Golovin E. V., Shiriaev A. K., Savinova O. V., Klimochkin Yu. V., Skomorohov M. Yu. Kuznetsov S. A. "Aminoderivatives of adamantane with antiviral activity against influenza viruses", Pat. of Russian Federation №2401263.
6. Buagergen R., Burry B., Burry M., Kazella P., Erber J. M., Ler P., Nizato P., Raymon P., Verner J. "Benzene derivatives, methods of their preparation and pharmaceutical composition with their content", Pat. of Russian Federation №2248964, Application Date: 08.06.2000, Publication Date: 10.09.2003.
7. Bernardon J.-M. "Bicyclic aromatic compounds and based on them composition", Pat. of Russian Federation №2188190, Application Date 30.03.1999, Publication Date 27.02.2002.
8. Berest G. G., Voskoboynik O. Yu., Kovalenko S. I., Nosulenko I. S., Antypenko L. M., Antypenko O. M., Shvets V. M., Katsev A. M. *Sci. Pharm.*, 2012, Vol. 80, pp.37-65. doi:10.3797/scipharm.1111-15
9. Kovalenko S. I., Nosulenko I. S., Voskoboynik A. Yu., Berest G. G., Antypenko L. M., Antypenko A. N., Katsev A. M. *Sci. Pharm.*, 2012, Vol. 80, pp.837-865 doi: 10.3797/scipharm.1208-07
10. Kovalenko S. I., Nosulenko I. S., Voskoboynik A. Yu., Berest G. G., Antypenko L. M., Antypenko A. N., Katsev A. M. *Med. Chem. Res.*, 2013, Vol. 22(6), pp.2610-2632. doi: 10.1007/s00044-012-0257-x
11. Vulfson N. S., Zaikin V. G., Mikaia A. I. *Mass-spektroskopia organicheskikh soedinenii (Mass-spectrometry of organic compounds)*. Moscow, 312 p.
12. Bagrii E. I. *Osobnosti stroenia i svoystv adamantanov (The characteristics of structure and properties of adamantanes)* Moscow, 1989, 264 p.
13. Breitmaier E. *Structure Elucidation by NMR In Organic Chemistry: A Practical Guide*, Wiley & Sons, Ltd, 2002, 258 p.
14. <http://www.niaid.nih.gov>
15. Sidwell R. W., Smeed D. F. *In vitro and in vivo assay systems for study of influenza virus inhibitors*. *Antiviral Research*, 2000, Vol. 48, pp.1-16 doi: 10.1016/S0166-3542(00)00125-X
16. Berest G. G., Voskoboynik A. Y., Kovalenko S. I., Antypenko A. M., Nosulenko I. S., Katsev A. M., Shandrovskaia A. S. *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, Vol. 46, pp.6066-6074 doi: 10.1016/j.ejmech.2011.10.022
17. Berest G. G., Voskoboynik O. Yu., Nosulenko I. S., Rak I. E., Sinyak R. S., Kovalenko S. I. *Klinicheskaya farmaciia, farmakoterapiia i medichna standartizaciia. – Clinical pharmacy, pharmacotherapy and medical standardization*, 2011, Vol. 1-2(10-11), pp.197-205.

Надійшла до редакції 07.02.2014 р.

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАЛЕЖНОСТІ «ХІМІЧНА СТРУКТУРА – АНТИГІПОКСИЧНА ДІЯ» В РЯДУ ПОХІДНИХ ІНДОЛУ ТА 2-ОКСІНДОЛУ, ЯКІ МІСТЯТЬ ЕТИЛАМІНОВИЙ ФРАГМЕНТ

Р.Г.Редькін, В.П.Черних, Л.А.Шемчук, Н.А.Цубанова, С.Ю.Штриголь

Національний фармацевтичний університет

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: ruslan_red@ukr.net

Ключові слова: 2-оксіндоли; спіроциклічні системи; антигіпоксанти; мелатонін; молекулярні дескриптори; кількісний зв'язок структура-властивості; регресійний аналіз

Стаття присвячена дослідженню антигіпоксичної дії раніше синтезованих нами сполук, похідних індолу та 2-оксіндолу, які містять фармакоформний етиламіновий фрагмент, характерний для мелатоніну, та вивченню залежності зв'язку «хімічна структура – антигіпоксична дія» за даними *in vivo* та *in silico*. Скринінгові дослідження були проведені на моделях гострої нормобаричної та гемічної гіпоксії у білих мишей-самців. Досліджені субстанції вводили у дозі 0,50 мг/кг, аналогічній препарату порівняння мелатоніну. Другий препарат порівняння за антигіпоксичним ефектом мексидол вводили у дозі 42 мг/кг. Максимальну антигіпоксичну дію чинила сполука R-77 – 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндол] (101% на моделі гемічної гіпоксії та 176% на моделі нормобаричної). За величиною ефекту нова сполука достовірно перевершувала препарат порівняння мелатонін (антигіпоксична активність 67,6% та 109% відповідно) та децю переважала мексидол (антигіпоксична активність 94,3% та 161%). Для кожної із 30 сполук обраховано набір важливих молекулярних дескрипторів (miLogP, TPSA, MV). Найбільш активними за проявом антигіпоксичної активності є досліджені сполуки, які мають розрахунковий показник ліпофільності (miLogP) приблизно від 1,2 до 2,5, обрахований топологічний дескриптор площі полярних поверхонь молекул (TPSA) від 85 до 125 та оптимальний молекулярний об'єм (MV) від 250 до 320. Встановлено поєднання трьох фармакофорів, а саме 2-оксіндолу, дигідропірано[3,2-с]хромену та нітрильної групи як біозостера карбоксильної функції з одночасним уведенням метильної групи у 5-положенні базового ядра молекули R-77. Отримані результати свідчать про доцільність подальшого поглибленого фармакологічного вивчення спіроциклічних оксіндольних похідних з метою пошуку вискоелективних речовин з антигіпоксичною дією.

THE INVESTIGATION OF THE "CHEMICAL STRUCTURE – ANTIHYPOXIC ACTION" DEPENDENCE IN A SERIES OF INDOLE AND 2-OXINDOLE DERIVATIVES CONTAINING THE ETHYLAMINE FRAGMENT

R.Gr.Redkin, V.P.Chernykh, L.A.Shemchuk, N.A.Tsubanova, S.Yu.Shtrygol

Key words: 2-oxindole; spirocyclic system antihypoxants; melatonin; molecular descriptors; "structure-property" quantitative relationship; regression analysis

The article describes the study of the antihypoxic action of the compounds previously synthesized, namely indole and 2-oxindole derivatives, containing an ethylamine fragment being characteristic of melatonin, and the "chemical structure – antihypoxic action" dependence based on *in vivo* and *in silico* data. The screening has been conducted on the models of acute normobaric and hemic hypoxia in white male mice. The substances under research were administered in the dose of 0.50 mg/kg that was similar to the reference drug melatonin. The second antihypoxic reference drug mexidol was administered in the dose of 42 mg / kg. The compound R-77 (4,3'-spiro[(2-amino-3-cyano-4,5-dihydro-pyrano[3,2-c]chromen-5-on)-5-methyl-2'-oxindole]) caused a maximum effect (of about 101% on the hemic hypoxia model, and 176% on the normobaric hypoxia model). By its effect size the new compound is significantly superior to the reference drug melatonin (the antihypoxic activity is 67.6% and 109%) and somewhat dominates mexidol (the antihypoxic activity is 94.3 % and 161%). A set of essential molecular descriptors (miLogP, TPSA, MV) has been calculated for each of the 30 compounds. The compounds having lipophilicity (miLogP) estimated approximately from 1.2 to 2.5, the calculated topological descriptor of the polar surface molecules area (TPSA) from 85 to 125 and the optimal molecular volume (MV) 250 to 320 have shown the highest antihypoxic activity. The results obtained demonstrate the expediency of a further detailed pharmacological study of spirocyclic oxindole derivatives for the purpose of searching for highly efficient substances with the antihypoxic action.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ «ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА – АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ» В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛА И 2-ОКСИНДОЛА, СОДЕРЖАЩИХ ЭТИЛАМИНОВЫЙ ФРАГМЕНТ

Р.Г.Редькин, В.П.Черных, Л.А.Шемчук, Н.А.Цубанова, С.Ю.Штриголь

Ключевые слова: 2-оксіндоли; спіроциклічні системи; антигіпоксанти; мелатонін; молекулярні дескриптори; кількісний зв'язок структура – властивості; регресійний аналіз

Стаття присвячена дослідженню антигіпоксичного дії раніше синтезованих нами сполук, похідних індола та 2-оксіндола, які містять фармакоформний етиламіновий фрагмент, характерний для мелатоніну, та вивченню залежності зв'язку «хімічна структура – антигіпоксичне дія» по даними *in vivo* та *in silico*. Скринінгові дослідження були проведені на моделях гострої нормобаричної та гемічної гіпоксії у білих мишей-самців. Досліджені субстанції вводили в дозі 0,50 мг / кг, аналогічній препарату порівняння мелатоніну. Другий препарат порівняння по антигіпоксичному ефекту мексидол вводили в дозі 42 мг/кг. Максимальне антигіпоксичне

действие оказало соединение R-77 – 4,3'-спиро[(2-амино-3-циано-4,5-дигидро-пирано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндол] (101 % на модели гемической гипоксии и 176% на модели нормобарической гипоксии). По величине эффекта новое соединение достоверно превосходит препарат сравнения мелатонин (антигипоксическая активность 67,6% и 109%) и несколько превышает мексидол (антигипоксическая активность 94,3% и 161%). Для каждого из 30 соединений рассчитан набор важных молекулярных дескрипторов (LogP, TPSA, MV). Наиболее высокую антигипоксическую активность проявили соединения, имеющие расчетный показатель липофильности (miLogP) примерно от 1,2 до 2,5, расчетный топологический дескриптор площади полярных поверхностей молекул (TPSA) от 85 до 125 и оптимальный молекулярный объем (MV) – от 250 до 320. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего углубленного фармакологического изучения спироциклических оксіндольных производных с целью поиска высокоэффективных веществ с антигипоксическим действием.

Дослідження біологічної активності органічних сполук є одним з найбільш актуальних напрямів сучасної біологічної, фармацевтичної, медичної та комп'ютерної хімії [1].

Проте вивчення таких комплексних властивостей пов'язане з низкою проблем, вирішення яких залежить від інтенсивних теоретичних та експериментальних робіт в області біохімії, молекулярної біології, геноміки, комп'ютерного моделювання, органічного синтезу, медицини та фармакології [2]. Найбільше практичне значення такі дослідження мають для розробки нових лікарських субстанцій, які переважно є синтетичними молекулами [3].

Мета даної роботи полягала у дослідженні антигіпоксичної дії 29 раніше синтезованих нами сполук похідних індолу [4, 5] та 2-оксіндолу [6, 7, 8], які містять фармакофорний етиламіновий фрагмент, характерний для мелатоніну, та у визначенні за допомогою регресійного аналізу кількісного зв'язку «хімічна структура – антигіпоксична дія» за даними *in vivo* та величин молекулярних дескрипторів, отриманих *in silico*.

До структурних аналогів мелатоніну (MT) відносяться сполуки, отримані безпосередньою модифікацією молекули MT, та безіндольні аналоги MT, але всі ці сполуки обов'язково містять так званий індоліл-алкіламіновий фармакофор. Саме за цим критерієм обрані нами 30 сполук-об'єктів

досліджень можна віднести до структурних аналогів MT (рис. 1) [9].

Спіроциклическі системи, які містять 3,3-індолінове ядро, лежать в основі будови великого пласту природних біологічно активних сполук. 2-Оксіндольні системи, спіроз'єднані з карбоциклическими, гетероциклическими, лактонними при C3 або C2 атомі 2-оксіндолінового ядра, є перспективними об'єктами для синтезу та спрямованого пошуку нових біологічно активних сполук [10].

До вибірки сполук потрапили наступні структури:

- конденсовані 4,3'-спіро[(2-аміно-3-*R*-4*H*-пірано)-2'-оксіндоли] з ядрами піразолу та дигідропірано[3,2-с]хромен-5-ону (сполуки R-2 – R-5, R-10 – R-25, R-76 – R-90);
- 4-(індол-3-іл) похідні 2-аміно-4*H*-пірану та 2-аміно-4,6,7,8-тетрагідро-1*H*-хінолін-5-ону, що містять структурно закріпленій аміноалкільний фармакофор (сполуки R-6, R-7);
- похідні *L*-триптофану та 2-[2-(1*H*-індол-3-іл)-2-оксоацетиламіно]-бензойної кислоти, що містять залишки антранілової та щавлевої кислот (сполуки R-64 – R-66).

Обрані нами для аналізу розрахункові параметри молекул (дескриптори) відносяться до класичних в області КЗСВ (кількісний зв'язок структура-властивості)-аналізу та входять до набору так званих найважливіших дескрипторів, визна-

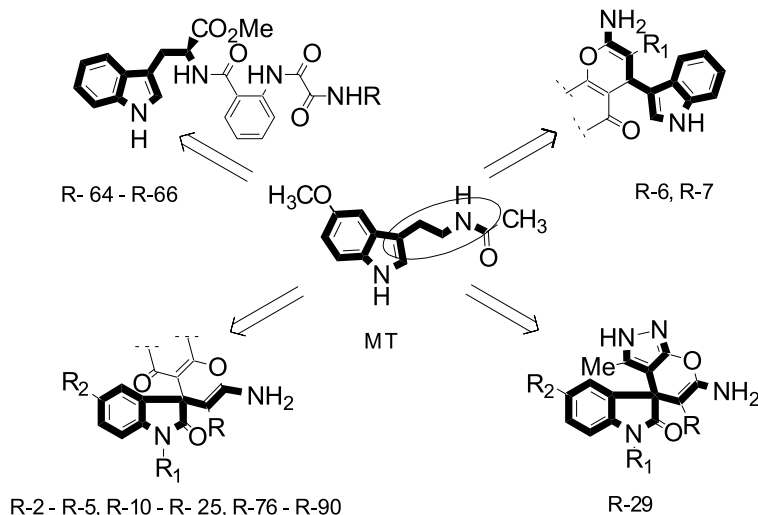


Рис. 1. Структурний зв'язок між молекулою MT та молекулами досліджених сполук (жирним виділено індоліл-етиламіновий фармакофор).

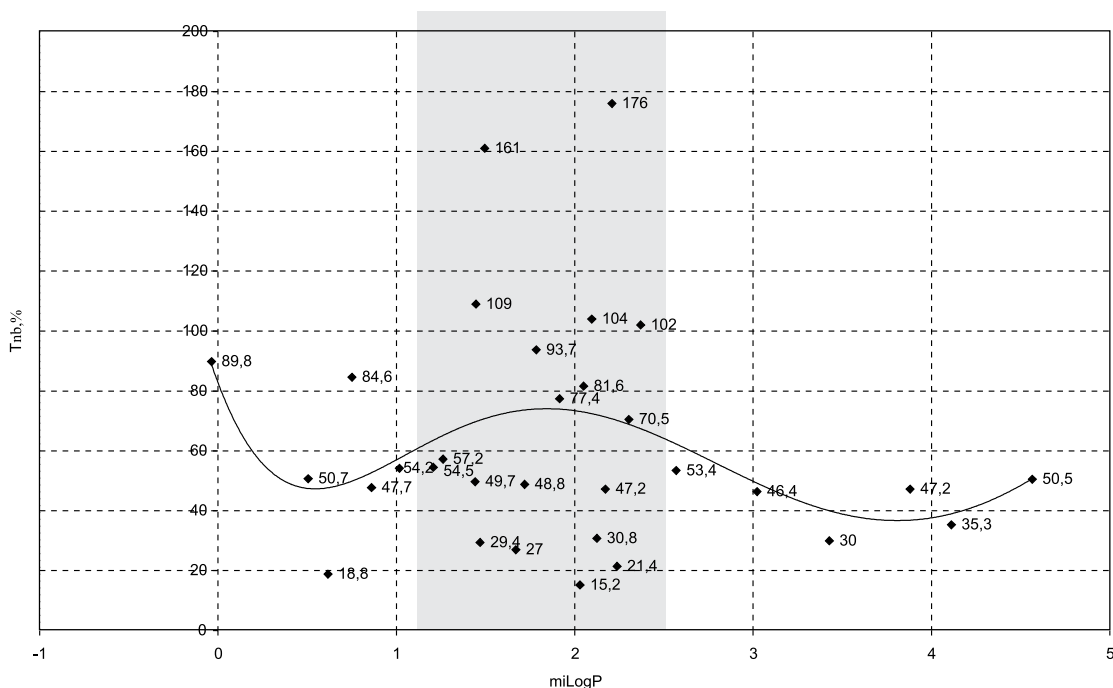


Рис. 2. Взаємозв'язок між ліпофільністю (LogP) і антигіпоксичною активністю (T_{nb} , %) на оделі нормобаричної гіпоксії для даної вибірки досліджених сполук.

чених з 500 методом АГК (аналізу головних компонент, який в англійській літературі позначається як *Principal component analysis*, PCA) [1, 11]. Вони пов'язані з такими важливими властивостями молекули, як розмір, ліпофільність, конформаційна рухливість, здатність до утворення водневих зв'язків. Зазначені або подібні з ними параметри широко використовуються для різноманітних КЗСВ моделей, наприклад, для ранньої оцінки фармакологічних властивостей сполук, а також для передбачення схожості з лікарськими речовинами або специфічної активності [12]. Важливими перевагами такого підходу є простота і висока швидкість їх обчислення, а також доступність програм для розрахунку.

Як видно з даних для досліджених сполук у таблиці, всі досліджувані сполуки відповідають правилам Ліпінського для потенційних лікоподібних молекул.

Зокрема, молекулярна маса практично всіх структур не перевищує 500 а.е.м., показник ліпофільності (LogP), що характеризує розподіл сполуки в системі октанол-вода, розрахований за допомогою програмного комплексу Molinspiration, доступного on-line [13], і знаходиться для наведених сполук в прийнятному діапазоні. Крім того, за допомогою того ж продукту визначено TPSA (загальну площу полярних поверхонь молекули), яка розраховується на основі методики, опублікованої Ertl *et al.* [14] у вигляді суми внесків атомів O- та N- т. ін., у складі функціональних груп полярних фрагментів. Було показано, що TPSA є

дуже ефективним дескриптором, який дозволяє передбачити абсорбцію лікарського засобу, у тому числі у ШКТ, біодоступність і проникність крізь гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) [15].

У роботі Spadoni *et al.* [16] було показано зворотну кореляцію між ліпофільністю та антиоксидантною активністю в ряду 2-алкілндольних аналогів мелатоніну, тому ми дослідили подібну залежність, яку представлено на графіках (рис. 2, 3). В результаті застосування нелінійного регресійного аналізу встановлено, що залежність між ліпофільністю (miLogP) та антигіпоксичною активністю для даних сполук можна описати як поліноміальну регресію шостого ступеня:

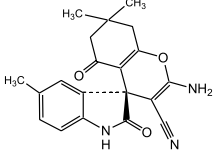
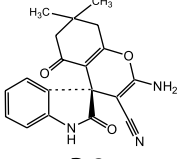
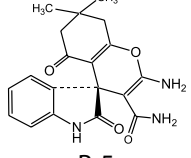
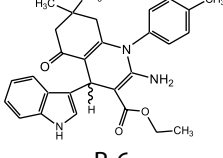
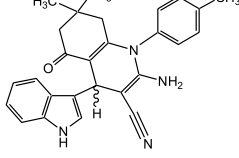
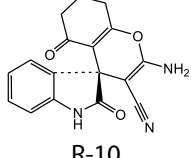
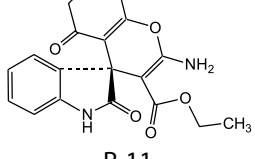
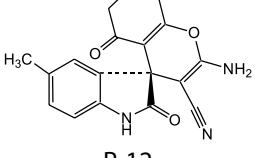
$$T_{nb}, \% = 0,1777miLogP^6 - 3,9283miLogP^5 + 33,304miLogP^4 - 131,32miLogP^3 + 235,36miLogP^2 - 159,41miLogP + 82,788, \\ R^2 = 0,1111^1 \text{ (на моделі нормобаричної гіпоксії);} \\ T_{hem}, \% = 0,4736 miLogP^6 - 7,1226 miLogP^5 + 42,507miLogP^4 - 125,94 miLogP^3 + 182,34 miLogP^2 - 99,766 miLogP + 37,202, \\ R^2 = 0,124 \text{ (на моделі гемічної гіпоксії)}$$

Таким чином, зв'язок між ліпофільністю та антигіпоксичною активністю для даної вибірки сполук є досить складним та подекуди неоднозначним. Очевидно, що при подальшому відборі сполук-кандидатів для скринінгу *in vivo* доцільно обирати сполуки даного класу з ліпофільністю в більш вузькому інтервалі значень близько 1,5-2,7, адже на цю область припадають пікові значення ан-

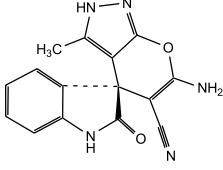
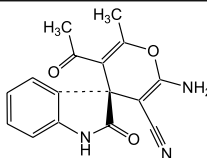
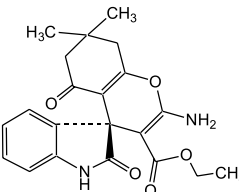
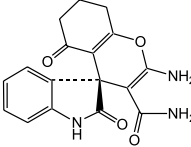
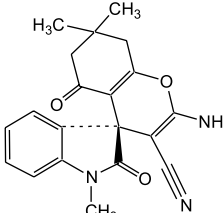
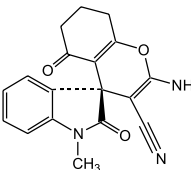
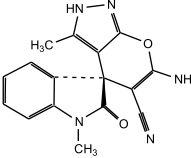
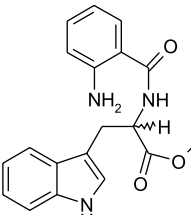
¹ R^2 – величина достовірності апроксимації

Таблиця

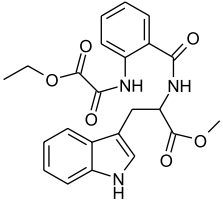
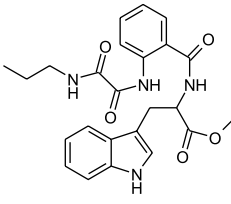
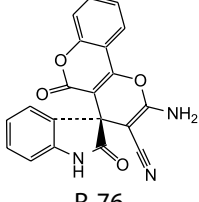
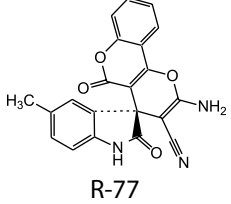
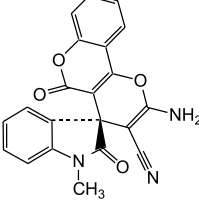
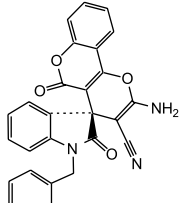
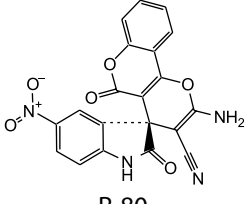
Активність досліджуваних сполук на моделях нормобаричної та гемічної гіпоксії *in vivo*
та деякі отримані *in silico* молекулярні дескриптори

Сполука, шифр	Mm	T _{nbr} , %	T _{hemr} , %	miLogP	TPSA	MV
1	2	3	4	5	6	7
Мексидол	255,269	161	94,3	1,495	33,120	137,829
Мелатонін	232,278	109	67,6	1,446	54,123	220,117
 R-2	349,393	104	42,7	2,095	105,218	310,148
 R-3	335,366	27	13,4	1,67	105,218	293,587
 R-5	353,381	18,8	11,6	0,617	124,520	306,999
 R-6	469,589	50,5	25,9	4,565	88,428	438,584
 R-7	422,535	35,3	20,3	4,112	85,915	394,113
 R-10	307,312	54,2	31,9	1,017	105,218	260,763
 R-11	354,366	29,4	12,4	1,47	107,731	305,234
 R-12	321,339	49,7	27,6	1,442	105,218	277,324

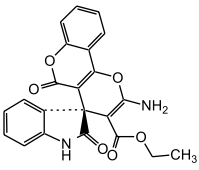
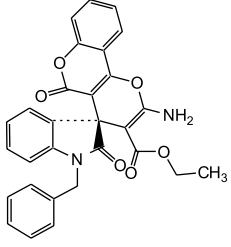
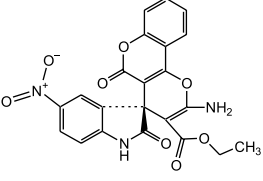
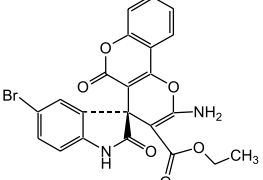
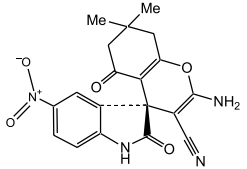
Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7
 <p>R-18</p>	293,287	50,7	19,1	0,506	116,830	243,598
 <p>R-22</p>	295,300	47,7	18,9	0,861	105,218	254,321
 <p>R-25</p>	382,420	30,8	20,6	2,124	107,731	338,058
 <p>R-26</p>	325,327	89,8	41,6	-0,036	124,520	274,176
 <p>R-27</p>	349,393	77,4	33,2	1,915	96,429	310,529
 <p>R-28</p>	321,339	57,2	26,1	1,262	96,429	277,705
 <p>R-29</p>	307,314	84,6	39,2	0,751	108,041	260,540
 <p>R-64</p>	337,382	102	55,7	2,37	97,217	305,263

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7
 <p>R-65</p>	437,456	70,5	48,4	2,303	126,597	386,691
 <p>R-66</p>	450,499	81,6	48,9	2,05	129,390	406,910
 <p>R-76</p>	357,32	93,7	52,9	1,784	118,358	290,751
 <p>R-77</p>	371,350	176	101	2,208	118,358	307,312
 <p>R-78</p>	371,350	15,2	17,6	2,029	109,569	307,693
 <p>R-79</p>	447,44	30	25,9	3,427	109,569	379,343
 <p>R-80</p>	402,32	48,8	25,4	1,719	164,182	314,085

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7
 <p>R-84</p>	404,37	21,4	24,3	2,237	120,871	335,222
 <p>R-85</p>	494,49	47,2	30,6	3,88	112,082	423,814
 <p>R-86</p>	449,37	47,2	31,9	2,172	166,695	358,556
 <p>R-87</p>	483,27	46,4	33,9	3,022	120,871	353,108
 <p>R-90</p>	380,350	54,5	32,2	1,207	151,042	323,150

Примітки: M_m – молекулярна маса; T_{nb} – тривалість життя тварин у % відносно контролю (інтакту) на моделі нормобаричної гіпоксії; T_{hem} – тривалість життя тварин у % відносно контролю (інтакту) на моделі гемічної гіпоксії; $miLogP$ – показник константи розподілу октанол-вода, розрахований за методом Molinspiration ($miLogP2.2$ – November 2005); $TPSA$ – топологічний дескриптор площі полярних поверхонь молекул; MV (Molecular Volume) – молекулярний об'єм.

тигіпоксичної активності даної вибірки сполук. Очевидно, що як при зменшенні, так і при збільшенні ліпофільності молекул даного класу виживаність тварин може варіювати.

Взаємозв'язок між дескриптором площі полярних поверхонь молекул ($TPSA$) та антигіпоксичною активністю для даних сполук найбільш точно можна описати, як поліноміальну регресію третього ступеня (рис. 4, 5):

$$T_{nb}, \% = -0,0002TPSA^3 + 0,0796TPSA^2 - 8,9401TPSA + 383,26, R^2 = 0,2903$$

$$T_{hem}, \% = -0,0002TPSA^3 + 0,0569TPSA^2 - 6,2607TPSA + 251,41, R^2 = 0,3693$$

Взаємозв'язок між молекулярним об'ємом молекул та антигіпоксичною активністю у випадку обох моделей виглядає досить подібно й найбільш точно його можна описати як поліноміальну регресію другого ступеня (рис. 6):

$$T_{nb}, \% = 0,0019MV^2 - 1,4286MV + 315,56, R^2 = 0,2731$$

$$T_{gem}, \% = 0,0013MV^2 - 0,906MV + 187,56, R^2 = 0,2582$$

Оптимальними для прояву найбільших значень антигіпоксичної активності є молекули з MV в інтервалі значень від 250 до 320. Причому в ін-

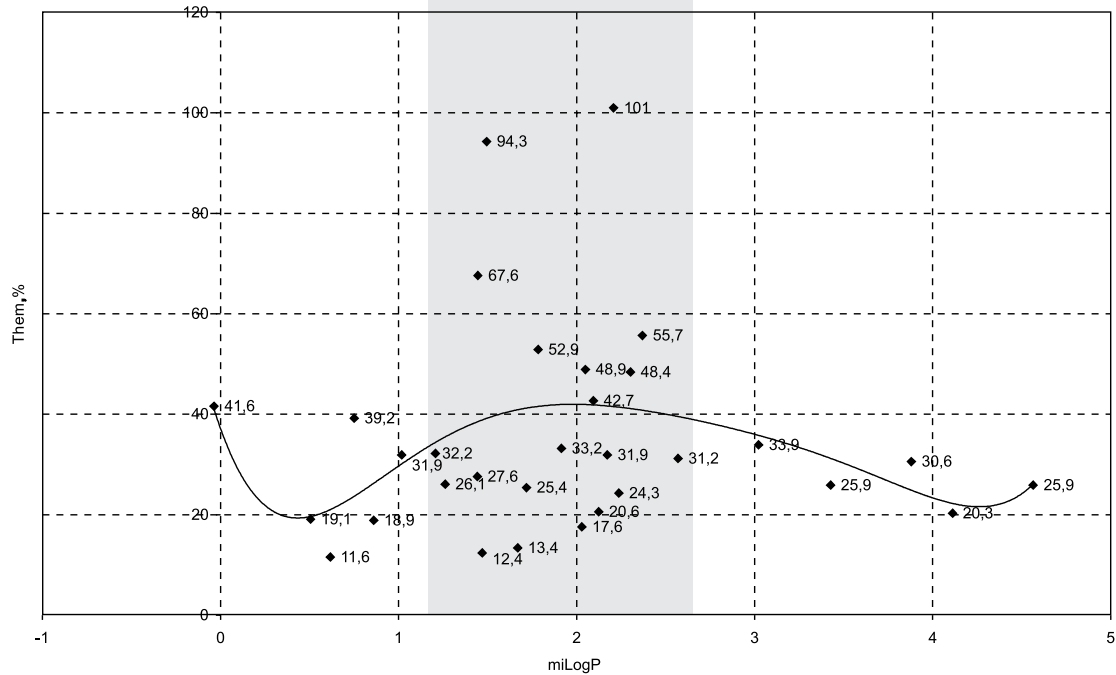


Рис. 3. Взаємозв'язок між ліпофільністю (LogP) і антигіпоксичною активністю (T_{hem} , %) на моделі гемічної гіпоксії для даної вибірки досліджених сполук.

тервалі 250-350 спостерігається зворотно-пропорційний зв'язок між виживаністю тварин на моделях нормобаричної та гемічної гіпоксії.

Таким чином найбільш активними за проявом антигіпоксичної активності є досліджені сполуки, які мають розрахунковий показник ліпофільності приблизно від 1,2 до 2,5, розрахований топологічний дескриптор площі полярних поверхонь молекул (TPSA) від 85 до 125 та оптимальний молекулярний об'єм (MV) від 250 до 320. Саме

в цих інтервалах досліджені сполуки найбільш вірогідно проявляють найвищу антигіпоксичну активність.

При аналізі взаємозв'язку між структурою зазначених сполук та їх активністю слід застосувати комплексний підхід та зважати як на ліпофільність сполук, TPSA та MV, так і на особливості будови молекул. Так, на прикладі декількох структур (рис. 7) показані структурні відмінності та їх вплив на прояв активності, зокрема, 5-метиль-

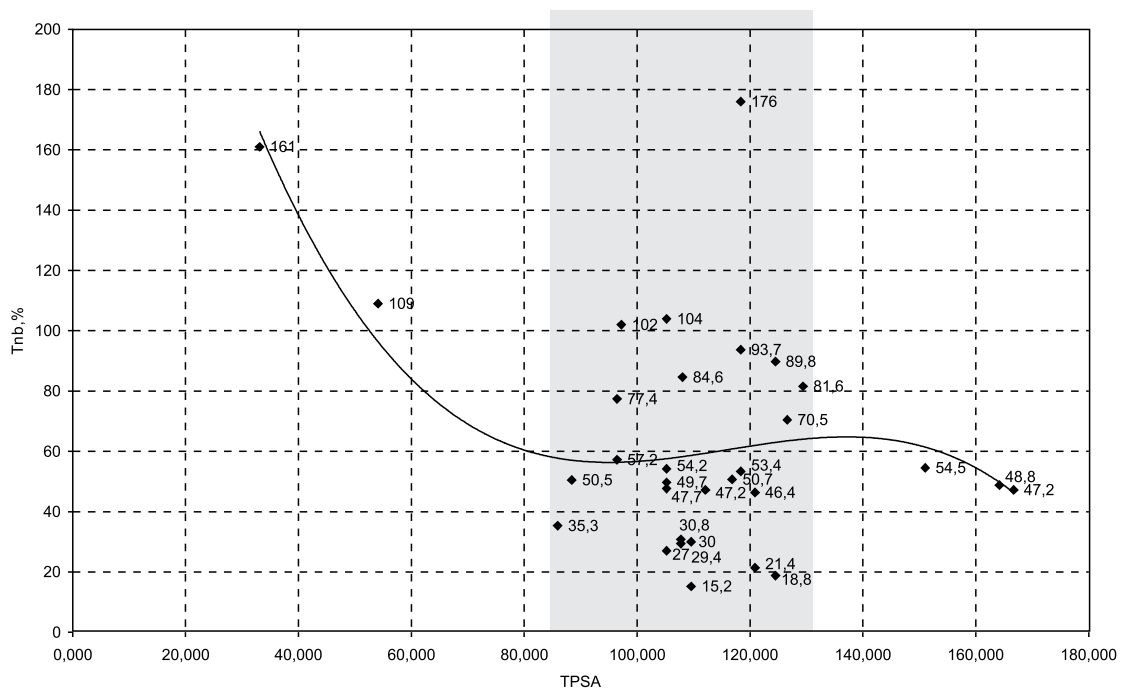


Рис. 4. Взаємозв'язок між площею полярних поверхонь молекул (TPSA) і антигіпоксичною активністю на моделі нормобаричної гіпоксії (T_{nb} , %) для даної вибірки досліджених сполук.

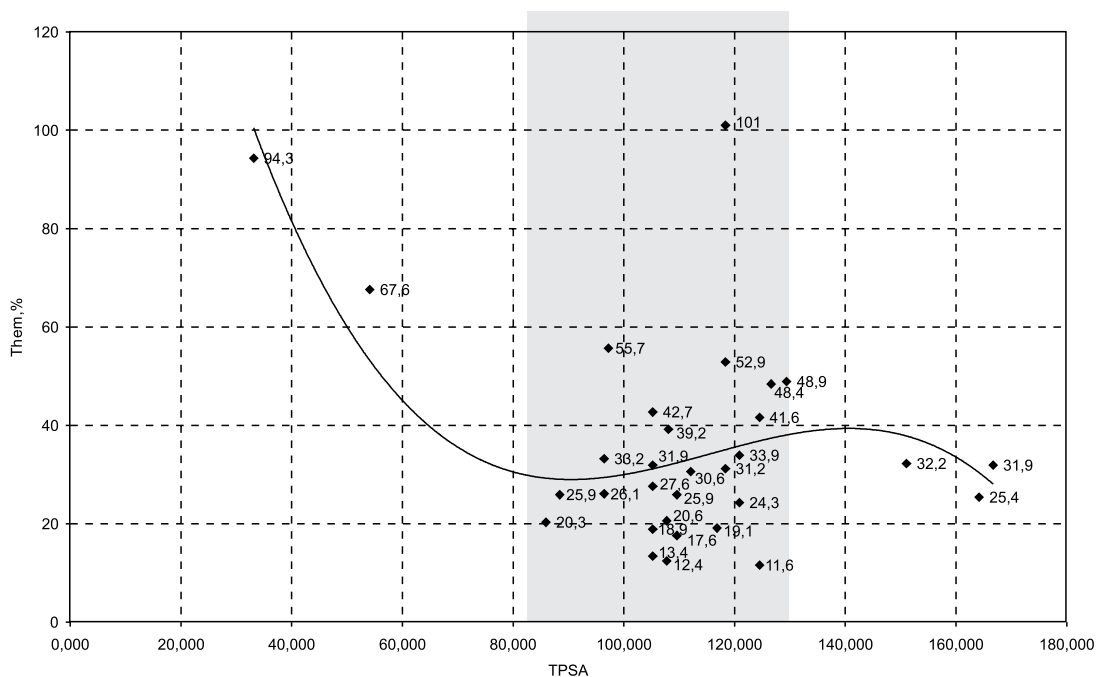


Рис. 5. Взаємозв'язок між площею полярних поверхонь молекул (TPSA) і антигіпоксичною активністю на моделі гемічної гіпоксії ($T_{\text{hem}}, \%$) для даної вибірки досліджених сполук.

на та естерна група роблять вагомий внесок у ліпофільність сполук (R-2, R-77, R-25), тоді як піразольне кільце знижує ліпофільність та антигіпоксичну активність (R-29).

Зміна положення 5-метильної групи на N-метильну виявилася дуже чутливим чинником щодо прояву антигіпоксичної активності (наприклад, пари структурних ізомерів R-2 та R-27, R-77 та R-78), що, вочевидь, відобразилося на активності сполук на моделях гіпоксії. Тобто, в цілому метильний радикал у 5 положенні ароматичного ядра

чинить позитивний вплив на прояв антигіпоксичної активності. Естерна група хоча і призводить до підвищення ліпофільності, наприклад, сполука R-25, однак ця речовина показала досить низьку активність, що пояснюється швидкою біотрансформацією (гідролізом) карбетоксі групи до полярної карбоксильної (очевидно, вже при всмоктуванні в ШКТ та біотрансформацією вже при «першому проходженні») і закономірним зниженням ліпофільності його потенціального метаболіту, проникності крізь ГЕБ та антигіпоксичної

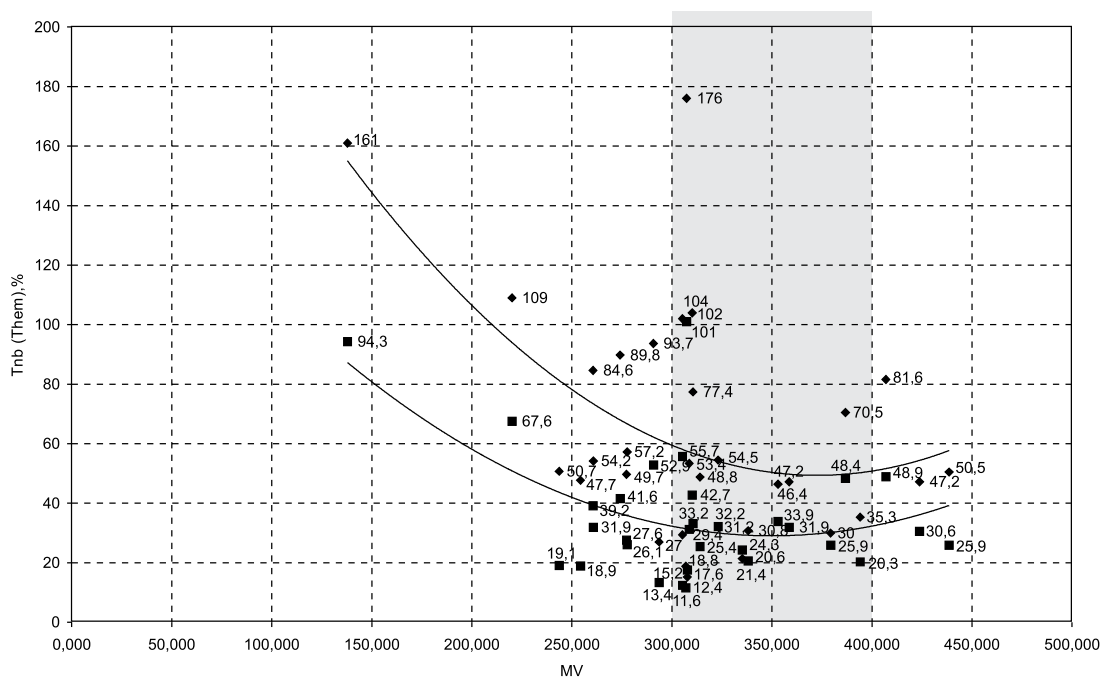


Рис. 6. Взаємозв'язок між молекулярним об'ємом (MV) і антигіпоксичною активністю ($T_{\text{nb}} (T_{\text{hem}}), \%$) на моделі нормобаричної та гемічної гіпоксії для даної вибірки досліджених сполук.

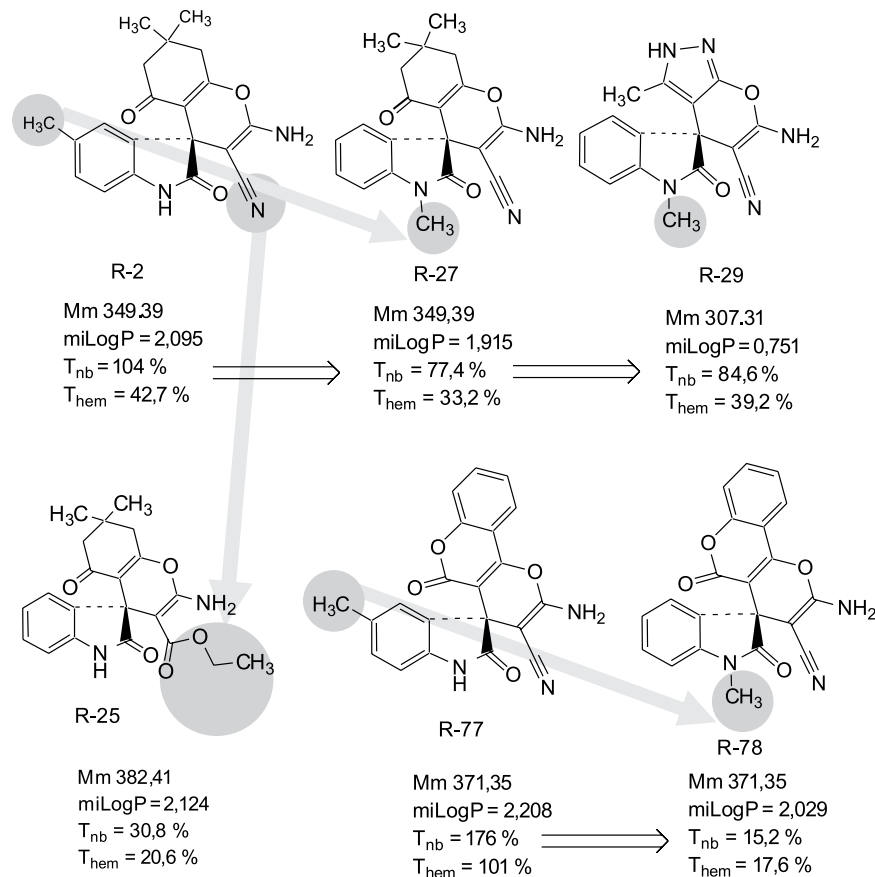


Рис. 7. Аналіз взаємозв'язку між структурою та властивостями деяких з досліджуваних сполук.

активності. Аналогічна закономірність спостерігається для естерів R-84 – R-87, які мають високу ліпофільність, але виявили низьку антигіпоксичну активність (рис. 8).

Таким чином, хоча естерна функція й підвищує ліпофільність, однак такі сполуки не проявили очікуваної високої антигіпоксичної активності, що можна пояснити швидкою біотрансформацією естерної групи до карбоксильної функції та зниженням проникності крізь ГЕБ.

Експериментальна частина

Всі 30 досліджуваних сполук були отримані нами за раніше описаними методиками [2-4].

Дослідження на тваринах. Дослідження були проведені на тваринах, отриманих з віварію ЦНДЛ НФаУ (зав. проф. Л.В.Яковлева), які утримувались на звичайному харчовому та водному раціоні. Досліди здійснювали згідно з «Правилами проведення робіт з використанням експерименталь-

них тварин» (Страсбург, 18.03.86). У роботі використовували відомі експериментальні моделі гіпоксії – нормабаричну та гемічну [17].

Гостру нормобаричну гіпоксію викликали при вміщенні тварин до герметичної камери об'ємом 200 мл [17]. Досліди проводили на мишах самцях масою 18-22 г. Препарат порівняння мексидол виробництва ЗАТ «Мир-фарм», Росія вводили мишам у шлунок одноразово в умовно-терапевтичній дозі 42 мг/кг, що відповідає середньодобовій дозі 500 мг мексидолу для людини. Оскільки синтезовані біологічно активні сполуки є структурними аналогами мелатоніну, іншим референс-препаратом обрано віта-мелатонін виробництва ЗАТ «Київський вітамінний завод», Україна. Віта-мелатонін вводили тваринам у шлунок одноразово в умовно-терапевтичній дозі 0,50 мг/кг, що відповідає середньодобовій дозі 6 мг мелатоніну для людини. Досліджувані субстанції вводили у дозі 0,50 мг/кг. Контрольні тварини одержували ек-

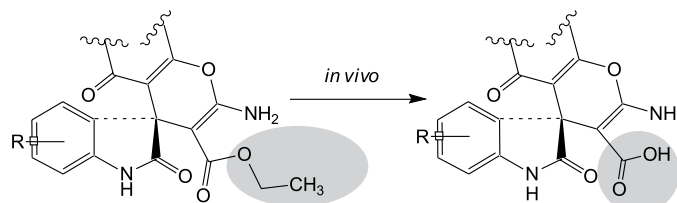


Рис. 8. Біотрансформація ліпофільних естерів та утворення гіпотетичних полярних легкорозчинних метаболітів, які, очевидно, не проникають крізь ГЕБ.

вівалентну кількість води. Перерахунок доз для мишей зроблено з урахуванням біологічної константи Ю. П. Риболовлева.

Гостру гемічну гіпоксію викликали підшкірним введенням мишам нітриту натрію у дозі 225 мг/кг [17]. Досліджувані субстанції та референт-препарати мексидол і віта-мелатонін вводили перорально одноразово за 30 хв до введення нітриту натрію у дозах, які були розраховані для попередньої моделі гострої нормобаричної гіпоксії. Отримані експериментальні дані обробляли статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Розрахункова платформа. Всі обчислення молекулярних дескрипторів були зроблені за допомогою програмного комплексу Molinspiration Cheminformatics, 2013 (Університет Братислави, Словаччина), вільно доступного *on-line* <http://www.molinspiration.com> [18]. Використовували стандартну IBM PC-сумісну персональну робочу станцію (ЦПУ PIV з тактовою частотою 1,4 ГГц, 512 Мб оперативної пам'яті) на платформі операційної системи Windows 2000 та пакет Microsoft (MS) Office 2003.

Висновки

1. Для вибірки молекул з 29 оригінальних описаних нами раніше сполук розраховано набір важливих молекулярних дескрипторів (LogP, TPSA,

MV) *in silico* та в експерименті *in vivo* визначено антигіпоксичну активність на двох експериментальних моделях.

2. У результаті нелінійного регресійного аналізу встановлено залежність між розрахунковими параметрами молекул та антигіпоксичною активністю, що дозволило обрати найактивнішу з досліджених сполук (лабораторний шифр R-77) та оцінити вплив деяких замісників на прояв антигіпоксичної дії, що в подальшому буде використано для удосконалення структур 2-оксіндольної синтетичної платформи.

3. Встановлено, що поєднання трьох фармакофорів, а саме 2-оксіндолу, дигідропірано[3,2-с] хромену та нітрильної групи як біоізостеру карбоксильної функції з одночасним уведенням метильної групи у 5-положенні базового ядра молекули R-77.

4. Визначено, що найбільш активними за проявом антигіпоксичної активності є досліджені сполуки, які мають розрахунковий показник ліпофільності приблизно від 1,2 до 2,5, топологічний дескриптор площі полярних поверхонь молекул (TPSA) від 85 до 125 та оптимальний молекулярний об'єм (MV) від 250 до 320. Саме в цих інтервалах досліджені сполуки з найбільшою вірогідністю проявляють антигіпоксичну активність.

Література

1. Ivanenkov Y. A., Savchuk N. P., Ekins S., Balakin K. V. *Drug Discovery Today*, 2009, Vol. 14, No.15-16, pp.767-775. Cited 16 times. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.05.016
2. Takahashi Y., Konji M., Fujishima S. J. *Molec. Graph and Model*, 2003, Vol. 21(5), pp.333-339. Cited 8 times. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1093-3263\(02\)00180-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1093-3263(02)00180-8)
3. Bilsland E., Sparkes A., Williams K., Moss H. J., de Clare M., Pir P., Rowland J., Aubrey W., Pateman R. Young M., Carrington M., King R. D., Oliver S. G. *Open Biol.*, 2013, Vol. 3, No.2, pp.120-158. Cited 1 times. DOI: 10.1098/rsob.120158.
4. Redkin R. G., Chernykh V. P., Shemchuk L. A. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2008, Vol. 44, No.5, pp.693-696. Cited 2 times. DOI: 10.1134/S1070428008050096.
5. Redkin R. G., Chernykh V. P., Shemchuk L. A. Shishkina S. V., Shishkin O. V. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2007, Vol. 5, No.4, pp.19-26.
6. Redkin R. G., Chernykh V. P., Shemchuk L. A. Bereznyakova A. I., Tsubanova N. A. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2008, Vol. 6, No.22, pp.24-29.
7. Redkin R. G., Shemchuk L. A., Chernykh V. P. Shishkina S. V., Shishkin O. V. *Tetrahedron*, 2007, Vol. 63, No.46, pp.11444-11450. Cited 52 times. DOI: 10.1016/j.tet.2007.08.050
8. Shemchuk L. A., Chernykh V. P., Redkin R. G. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2008, Vol. 44, No.12, pp.1789-1794. Cited 14 times. DOI: 10.1134/S1070428008120117.
9. Redkin R. G. *Problemi endokrinnoi patologii – Problems of endocrine pathology*, 2013, Vol. 1, pp.60-74.
10. Singh G. S., Desta Z. Y. *Chem. Rev.*, 2012, Vol. 112, No.11, pp.6104-6155. DOI: 10.1021/cr300135y
11. Zhuravel' I. A., Kovalenko S. N., Ivashchenko A. V. Balakin K. V., Chernykh V. P., Skorenko A. V., Ivanenkov Ya. A. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2005, Vol. 3, No.1, pp.6-11.
12. Balakin K. V., Dorogov M. V., Zhuravel' I. A. Kovalenko S. N., Semeykin A. S., Skorenko A. V., Ivanenkov Ya. A., Solovyev M. Yu., Chernykh V. P., Khakhina M. Yu., Shalygina Ye. Ye. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2005, Vol. 3 (2), pp.8-16.
13. Metz A., Pflieger C., Kopitz H., Pfeiffer-Marek S., Baringhaus K.-H., Gohlke H. J. *Chem. Inf. Model.*, 2012, Vol. 52, No.1, pp.120-1133. Cited 5 times. DOI: 10.1021/ci200322s.
14. Ertl P., Rohde B., Selzer P. J. *Med. Chem.*, 2000, Vol. 43, No.20, pp.3714-3717. Cited 68 times. DOI: 10.1021/jm000942e
15. Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H.-Y. Smith B. R., Ward K. W., Kopple K. D. J. *Med. Chem.*, 2002, Vol. 45, No.12, pp.2615-2623. Cited 100 times. DOI: 10.1021/jm020017n
16. Spadoni G., Diamantini G., Bedini A. Tarzia G., Vacondio F., Silva C., Rivara M., Mor M., Plazzi P. V., Zusso M., Franceschini D., Giusti P. J. *Pineal Res.*, 2006, Vol. 40, No.3, pp.259-269. Cited 9 times. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2005.00309.x
17. Stefanov O. V. *Doklinichni doslidzhennya likarskih zasobiv: Metodichni rekomendatsii (Preclinical studies of drugs. Guidelines)*, Kiev, 2001, 528 p.
18. Mishra N. K., Kumar M., Raghava G. P. *Protein Pept. Lett.*, 2007, Vol. 14, No.6, pp.575-580. Cited 13 times. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986607780990046>

Надійшла до редакції 10.12.2013 р.

UDC 577.151.4

CALIX[4]ARENE α -HYDROXYMETHYLPHOSPHONIC ACIDS AS POTENTIAL INHIBITORS OF PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASES

V.V.Trush, V.Yu.Tanchuk, S.O.Cherenok*, V.I.Kalchenko*, A.I.Vovk

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine
Murmanska str., 1, Kyiv, 02660, Ukraine. E-mail: vovk@bpcci.kiev.ua

* Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine

Key words: protein tyrosine phosphatases; inhibitors; calixarenes; docking

Calix[4]arene are known to be a promising scaffold for designing inhibitors of protein tyrosine phosphatases. In this work calix[4]arene mono- and bis- α -hydroxymethylphosphonic acids have been tested *in vitro* for the inhibitory activity against some therapeutically important protein tyrosine phosphatases. The results obtained have shown that these macrocyclic compounds can inhibit CD45, PTP1B, and SHP2 with IC_{50} values in the micromolar range. At the same time the inhibitors have demonstrated lower activity toward other protein tyrosine phosphatases such as TC-PTP and PTP β . It has been found that mono-substituted calix[4]arene is more potent inhibitor of CD45 than the bis-substituted one and shows about 2-15 fold selectivity over TC-PTP, PTP β , SHP2 and PTP1B. Model 4-hydroxyphenyl- α -hydroxymethylphosphonate displays at least one order lower activity than the phosphonate derivatives of calix[4]arene. Thus, the combination of a macrocyclic platform and α -hydroxymethylphosphonate group is essential for the inhibition activities of these compounds. Computer-simulated docking studies have been performed using AutoDock 4.2 programme by the example of PTP1B. The data obtained indicate that the inhibitors can bind in the active site of the enzyme. To clarify the inhibition mechanism the possible enzyme-inhibitor complexes have been considered using several crystal structures of PTP1B and all stereoisomeric forms of the inhibitors.

КАЛІКС[4]АРЕН α -ГІДРОКСИФОСФОНОВІ КИСЛОТИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНТИРОЗИН-ФОСФАТАЗ

В.В.Труш, В.Ю.Танчук, С.О.Черенок, В.І.Кальченко, А.І.Вовк

Ключові слова: протеїнтирозинфосфатази; інгібітори; каліксарени; докінг

Відомо, що калікс[4]арени є перспективною платформою для розробки інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз. У цій роботі калікс[4]арен моно- та біс- α -гідроксиметилфосфонові кислоти були випробувані як інгібітори деяких терапевтично важливих протеїнтирозинфосфатаз. Отримані результати свідчили про те, що ці макроциклічні сполуки можуть інгібувати PTP1B, CD45 та SHP2 зі значеннями IC_{50} в мікромольному діапазоні. Разом з тим, інгібітори демонстрували меншу активність відносно інших протеїнтирозинфосфатаз, таких як TC-PTP і PTP β . Було встановлено, що моно-заміщений калікс[4]арен є кращим інгібітором CD45, ніж біс-заміщений макроцикл і виявляє приблизно 2-15-кратну селективність впливу відносно TC-PTP, PTP β , SHP2 та PTP1B. Модельна сполука 4-гідроксифеніл- α -гідроксиметилфосфонат характеризується щонайменше на порядок гіршою активністю, ніж фосфонатні похідні калікс[4]арену. Таким чином, поєднання макроциклічної платформи та α -гідроксиметилфосфонатної групи відіграє важливу роль для інгібуючої здатності цих сполук. Молекулярний докінг було проведено з використанням програми AutoDock 4.2 на прикладі PTP1B. Отримані результати показали, що інгібітори можуть зв'язуватися в активному центрі ферменту. Для з'ясування механізму інгібування були розглянуті можливі фермент-субстратні комплекси, сформовані з використанням різних кристалічних структур PTP1B та всіх стереоізомерних форм інгібіторів.

КАЛІКС[4]АРЕН α -ГИДРОКСИФОСФОНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНТИРОЗИНФОСФАТАЗ

В.В.Труш, В.Ю.Танчук, С.О.Черенок, В.И.Кальченко, А.И.Вовк

Ключевые слова: протеинтирозинфосфатазы; ингибиторы; каликсарены; докинг

Известно, что каликс[4]арены могут быть перспективной платформой для конструирования ингибиторов протеинтирозинфосфатаз. В этой работе каликс[4]арен моно- и бис- α -гидроксиметилфосфоновые кислоты были испытаны как ингибиторы некоторых терапевтически важных протеинтирозинфосфатаз. Полученные результаты свидетельствовали о том, что эти макроциклические соединения могут ингибировать PTP1B, CD45 и SHP2 со значениями IC_{50} в микромолярном диапазоне. Вместе с тем, ингибиторы демонстрировали меньшую активность относительно других протеинтирозинфосфатаз, таких как TC-PTP и PTP β . Было найдено, что моно-замещенный каликс[4]арен является лучшим ингибитором CD45 чем бис-замещенный макроцикл и проявляет приблизительно 2-15-кратную селективность по сравнению с ингибированием TC-PTP, PTP β , SHP2 и PTP1B. Модельное соединение 4-гидроксифенил- α -гидроксиметилфосфонат характеризуется по меньшей мере на порядок меньшей активностью, чем фосфонатные производные каликс[4]арена. Таким образом, макроциклическая платформа и α -гидроксиметилфосфонатная группа играет важную роль для обеспечения ингибирующей способности соединений. Молекулярный докинг был проведен с использованием программы AutoDock 4.2 на примере PTP1B. Полученные результаты показали, что ингибиторы могут связываться в активном центре фермента. Для выяснения механизма ингибирования были рассмотрены возможные фермент-субстратные комплексы, сформированные с использованием различных кристаллических структур PTP1B и всех стереоизомерных форм ингибиторов.

A number of bioorganic studies have been focused on searching for inhibitors of protein tyrosine phosphatases (PTPs) [1]. The PTPs superfamily consists of 107 members that can be divided into different classes, which include the classical receptor and non-receptor PTPs [2]. Because of their involvement in various cellular processes, such as growth and proliferation, differentiation and survival or apoptosis [3], these enzymes are considered to be promising targets for new drug discovery today. Increase in activity or expression of PTPs may promote development of cancer, diabetes, obesity, Alzheimer's disease, Noonan syndrome, and other diseases [1]. For example, one of the non-receptor enzymes, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) was found to be a negative regulator of insulin, as well as leptin signaling pathways [4]. The experimental data with PTP1B knockout mice have shown that hyperactivity of this enzyme may lead to type 2 diabetes and obesity [5, 6]. The activity of protein tyrosine phosphatase SHP2 is associated with Noonan syndrome and the negative effect on several oncogene signaling pathways [7, 8]. It has been shown that SHP2 can be involved in pathogenicity of oncogenic bacterium *Helicobacter pylori* that is associated with stomach cancer [9]. One more protein tyrosine phosphatase CD45 belongs to the receptor-like PTPs and plays an essential role in signaling by T- and B-lymphocytes [10, 11]. This enzyme controls the immune response by dephosphorylating Src family kinases [12, 13]. Therefore, inhibitors of CD45 may be attractive as drugs for treatment of the tissue transplant rejection or autoimmune pathologies [14]. Thus, an opportunity to control the activity of at least several PTPs could lower risk of developing Type 2 diabetes and other diseases.

Calixarenes represent macrocyclic molecules that can be easily functionalized at either the upper or lower rim. Because of their unique three-dimensional structure they have used as important tools for investigations in bioorganic chemistry and medicine [15-18]. The calixarenes were found to exhibit an-

tibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacterial strains [19-21], antiviral [22, 23] and anticancer properties [24]. Finally, calixarenes can be used for biochemical recognition and separation of bioactive molecules such as amino acids, proteins, nucleotides, saccharides and steroids [25]. Experiments on mice have shown that some of calixarene derivatives have low or no toxicity [26].

Based on understanding that the active site of PTP accommodates a phosphorylated tyrosine residue, it is likely that compounds with a non-cleavable phosphonate group, which mimic the phosphorylated tyrosine fragment, may be suitable for investigation as possible enzyme inhibitors. Recent studies have identified PTPs as targets for new bioactive phosphonate compounds [27, 28]. It has been shown also that pre-organizing phosphonic or methylenebisphosphonic acids into calix[4]arene derivatives provides a promising approach to design effective inhibitors of alkaline phosphatase [29-31], Yersinia protein tyrosine phosphatase [32], and PTP1B [33].

Derivatives of 1-hydroxyphosphonic acid are shown to have a wide variety of the biological activity. They can be used as antihypertensive [34] and antiviral agents [35], antibiotics [36] and pesticides [37]. Series of the compounds featuring aryl or heteroaryl 1-hydroxyphosphonate derivatives were investigated as inhibitors of CD45 [38]. We have already determined that calix[4]arenes bearing hydroxymethylphosphonic acid fragments at the wide rim of the macrocycle are able to inhibit alkaline phosphatase and glutathione-S-transferase [39]. The present research was undertaken to evaluate the inhibitory activity of 1-hydroxymethylphosphonate derivatives of calix[4]arene toward some of protein tyrosine phosphatases.

Calix[4]arene α -hydroxyphosphonic acid **1** in the racemic form and compound **2** as a (RS)-stereoisomer (Fig. 1) were synthesized according to the protocols previously developed [39]. At physiological pH the phosphonic acid derivatives **1-3** can exist in phosphonate monoanionic and partially phosphonate dianionic forms. The compounds synthesized were evaluated in vitro for their inhibitory activity against commercially available PTP1B, TC-PTP, CD45, SHP2, and PTP β . The activities of protein tyrosine phosphatases were determined by following the changes in the concentration of p-nitrophenol released during hydrolysis of p-nitrophenylphosphate used as a substrate. The values of IC₅₀ were calculated from a dose-dependent curve as the concentration of the inhibitor, which decreased the enzyme activity by 50% in 5 min of incubation of the reaction mixture.

The results obtained are summarized in Table 1 macrocyclic compound **1** It has been found that macrocyclic compound is a potent inhibitor of CD45 (IC₅₀ = 0.64 μ M) and PTP1B (IC₅₀ = 1.6 μ M). This macro-

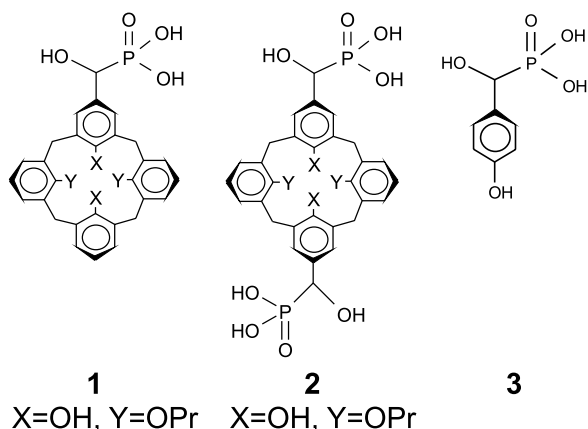


Fig. 1. Chemical structures of PTP inhibitors used in this work.

Table 1

The values of IC_{50} (μM) of calix[4]arene α -hydroxymethylphosphonic acids **1** and **2** as inhibitors of protein tyrosine phosphatases^a

Inhibitor	PTP1B	TC-PTP	SHP2	PTP β	CD45
1	1.6	11	3.5	4.5	0.64
2	8.4	59	17	45	7.6
3	>10	>10	>10	N/D	N/D

^a IC_{50} values determined with *p*-nitrophenylphosphate (in the concentrations equal to K_m values of enzymes) are the mean values of three assays with standard deviations within 25%.

cycle exhibits selectivity to CD45 over TC-PTP and shows a modest selectivity over PTP1B, PTP β and SHP2. Compound **2** seems to be less potent inhibitor of PTPs than inhibitor **1**. Bis-substituted inhibitor **2** showed approximately the same values of IC_{50} in case of inhibiting CD45 and PTP1B and was less potent inhibitor against TC-PTP, PTP β , and SHP2. The data obtained indicate that calix[4]arene inhibitors **1** and **2** are more effective in comparison with a model compound, 4-hydroxyphenyl- α -hydroxymethylphosphonate **3** (with IC_{50} values for PTP1B, TC-PTP, and SHP2 which were greater than 10 μM). The activity of calix[4]arene α -hydroxymethylphosphonates compared to the model compound can be explained by effects of both the phosphonate fragment and the molecular scaffold of the macrocyclic inhibitors.

To elucidate stereoselective effects of calix[4]arene- α -hydroxymethylphosphonates **1** and **2** on the activity of PTPs the inhibitors were docked into the active site of PTP1B. This enzyme selected for computer-simulation docking studies is represented by more than one hundred PDB files. It is known that PTPs catalyze the hydrolysis of phosphate monoesters by two-step mechanism [40]. In case of PTP1B, an important role in this action belongs to residues of Cys215, Arg221 (active pocket) and Asp181 (WPD-loop) [41]. All available X-ray crystal structures of PTP1B have the main difference, which can be attributed to open or closed conformation of WPD-loop [42]. As shown, the structures belonging to these two groups are also different and can be divided into subclasses [43]. To analyze the binding mode of the phosphonate inhibitors in the active site of PTP1B we applied the previously reported approach of dividing all PDB crystal structures into classes based on similarity of the binding profile. This was achieved by clustering all available conformations of PTP1B in the RSCB Protein Data Bank. Five centroids representing the enzyme structures with open WPD-loop (1NL9, 1PH0) and with closed WPD-loop (2CNF, 1Q6M, 2CM8) were used for docking of stereoisomeric forms of compounds **1** and **2**. According to the results obtained all stereoisomeric forms of α -hydroxyphos-

Table 2

Docking results (AutoDock 4.2) of stereoisomers of calix[4]arene- α -hydroxymethyl-phosphonates **1** and **2** in the active site of PTP1B

Compounds	ΔG_{doc} (kcal/mol)				
	2CM8	2CNF	1Q6M	1PH0	1NL9
1 (<i>R</i>)	-7.39	-8.84	-6.39	-4.92	-5.80
1 (<i>S</i>)	-7.38	-8.86	-4.35	-5.10	-5.91
2 (<i>RR</i>)	-7.19	-5.66	-7.21	-6.14	-5.92
2 (<i>RS</i>)	-6.00	-8.24	-6.05	-4.49	-4.64
2 (<i>SS</i>)	-6.80	-7.52	-3.72	-3.47	-5.35
3 (<i>R</i>)	-7.54	-7.25	-8.13	-5.71	-5.90
3 (<i>S</i>)	-8.36	-7.90	-8.22	-5.63	-5.95

phonates are able to bind to the active site of PTP1B. The weak correlation between the experimental activity of the inhibitors and predicted free energies ΔG_{doc} is observed only for 2CNF. The values of binding free energies indicate that (*RS*)-isomer of **2** exhibits stronger binding affinity than its (*RR*)- or (*SS*)-analogues. Enantiomeric compounds (*S*)-**1** and (*R*)-**1** bind to the enzyme with the same affinity (Table 2).

Docking results have shown that the binding mode of calix[4]arene derivative **1** is similar to that of inhibitor **2**. The phosphonate residues of macrocycles **1** and **2** form a hydrogen bond with catalytic Cys215, and with other amino acid residues from the active pocket, such as Arg221, Ser216, and Ala217. Due to the closed conformation of WPD-loop, Phe182 is close to the upper rim of the macrocycle. In addition,

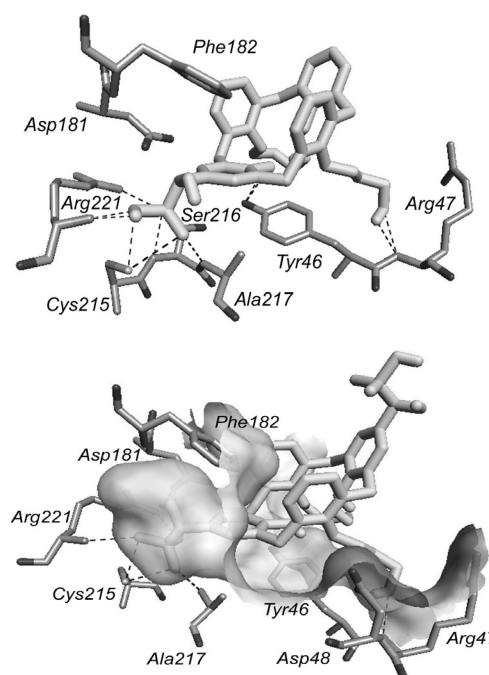


Fig. 2. The possible binding modes of (*S*)-calix[4]arene-mono- α -hydroxyphosphonate (top) and (*R*)-calix[4]arene-bis- α -hydroxyphosphonate (bottom) at the active site of PTP1B.

hydrophobic interactions are observed between the narrow rim of the macrocyclic platform and Tyr46, Arg47, and Asp48. According to the data (Tab. 1) experimentally obtained the second α -hydroxymethylphosphonate group of bis-substituted compound 2 does not interact with the enzyme surface (Fig. 2).

Experimental Part

The enzymatic reaction was carried out at 37°C (PTP1B) and 30°C (TC-PTP, SHP2, CD45, or PTP β). The assay solution contained 50 mM Bis-Tris (pH 7.2), 1 vol. % of dimethyl sulfoxide, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 3 mM EDTA, 2 mM *p*-nitrophenyl phosphate (for PTP1B), and the inhibitor. The final volume was 0.5 ml. The mixture was preincubated for 5 min and the reaction was initiated by addition of the enzyme (6nM in the reaction mixture). The *p*-nitrophenol released was determined by measuring the absorbance at 410 nm ($\epsilon = 18.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

References

1. Vintonyak V.V., Antonchick A.P., Rauh D. et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2009, Vol. 13, pp.272-283.
2. Alonso A., Sasin J., Bottini N. et al. *Cell.*, 2004, Vol. 117, pp.699-711.
3. Hunter T. *Cell.*, 2004, Vol. 100, pp.113-127.
4. Elchebly M., Payette P., Michaliszyn E. et al. *Science*, 1999, Vol. 283, pp.1544-1548.
5. Klamann L.D., Boss O., Peroni O.D. et al. *Mol. Cell Biol.*, 2000, Vol. 20, No.15, pp.5479-5489.
6. Lund I.K., Hansen J.A., Andersen H.S. et al. *J. Mol. Endocrinol.*, 2005, Vol. 34, No.2, pp.339-351.
7. Wang S., Yu W.-M., Zhang W. et al. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, No.2, pp.913-920.
8. Chan G., Kalaitzidis D., Neel B.G. *Cancer Metastasis Rev.*, 2008, Vol. 27, No.2, pp.179-192.
9. Hatakeyama M. *Nat. Rev. Cancer.*, 2004, Vol. 4, pp.688-694.
10. Koretzky G.A., Picus J., Thomas M.L. et al. *Nature.*, 1990, Vol. 346, pp.66-68.
11. Justement L.B., Campbell K.S., Chien N.C. et al. *Science*, 1991, Vol. 252, pp.1839-1842.
12. Mustelin T., Coggeshall K.M., Altman A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, Vol. 86, pp.6302-6306.
13. Desai D.M., Sap J., Silvennoinen O. et al. *EMBO J.*, 1994, Vol. 13, pp.4002-4010.
14. Lazarovits A.I., Visser L., Asfar S. et al. *Kidney Int.*, 1999, Vol. 55, pp.1303-1310.
15. Sansone F., Segura M., Ungaro R. *Dodrecht: Kluwer Academic Publishers*, 2001, pp.496-512.
16. Vicens J., Harrowfield J., Baklouti L. *Dodrecht: Springer*, 2007, pp.395-340.
17. Perret F., Lazar A.N., Coleman A.W. *Chem. Commun.*, 2006, pp.2425-2438.
18. Guo D.-D., Wang K., Liu Y. J. *Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2008, Vol. 62, pp.1-21.
19. Casnati A., Fabbri M., Pelizzi N. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, Vol. 6, pp.2699-2704.
20. Dibama H.M., Clarot I., Fontanay S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, Vol. 19, pp.2679-2682.
21. Patel M.B., Modi N.R., Raval J.P. et al. *Org. Biomol. Chem.*, 2012, Vol. 10, pp.1785-1789.
22. Tsou L.K., Dutschman G.E., Gullen E.A. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, Vol. 20, pp.2137-2139.
23. Mourer M., Psychogios N., Laumond G. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, Vol. 18, pp.36-40.
24. Menger F.M., Bian J., Sizova E. et al. *Org. Lett.*, 2004, Vol. 6, pp.261-264.
25. Shimojo K., Oshima T., Naganawa H. et al. *Biomacromolecules*, 2007, Vol. 8, pp.3061-3066.
26. Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. *Curr. Med. Chem.*, 2009, Vol. 16, pp.1630-1655.
27. Li X., Bhandari A., Holmes C. P. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, Vol. 14, pp.4301-4305.
28. Wang Q., Zhu M., Zhu R. et al. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, Vol. 49, pp.354-360.
29. Vovk A.I., Kalchenko V.I., Cherenok S.O. et al. *Org. Biomol. Chem.*, 2004, Vol. 2, pp.3162-3166.
30. Vovk A.I., Kononets L.A., Tanchuk V.Yu. et al. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2010, Vol. 66, pp.271-276.
31. Cherenok S.O., Vovk A.I., Muravyova I.V. et al. *Org. Lett.*, 2006, Vol. 8, pp.549-556.
32. Vovk A.I., Kononets L.A., Tanchuk V.Yu. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, Vol. 20, pp.483-485.
33. Trush V.V., Cherenok S.O., Tanchuk V.Yu. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, Vol. 23, No.22, pp.5619-5623.
34. Patel D.V., Rielly-Gauvin K., Ryono D.E. et al. *J. Med. Chem.*, 1995, Vol. 38, pp.4557-4569.
35. Bubenik M., Preville P., Dugas J. et al. *Tetrahedron Lett.*, 2003, Vol. 44, pp.8261-8263.
36. Patel R.N., Banerjee A., Szarka L.J. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, Vol. 8, pp.1055-1059.
37. Patel D.V., Rielly-Gauvin K., Ryono D.E. *Tetrahedron Lett.*, 1990, Vol. 31, pp.5587-5590.
38. Frechette R.F., Ackerman C., Beers S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, Vol. 7, No.17, pp.2169-2172.
39. Cherenok S.O., Yushchenko O.A., Tanchuk V.Yu. et al. *Arkivok*, 2012, Vol. 4, pp.278-280.
40. Tonks N.K. *FEBS Lett.*, 2003, Vol. 546, pp.140-148.
41. Denu J.M., Dixon J.E. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, Vol. 2, pp.633-641.
42. Kamerlin S.C.L., Rucker R., Boresch S. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2006, Vol. 345, pp.1161-1166.
43. Tanchuk V.Y., Tanin V.O., Vovk A.I. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2012, Vol. 80, pp.121-124.
44. Huey R., Morris G.M., Olson A.J. et al. *J. Comput. Chem.*, 2007, Vol. 28, No.6, pp.1145-1152.

Надійшла до редакції 07.02.2014 р.

Computer-simulated docking studies were performed using AutoDock 4.2 programme [44]. A ligand presented at the binding site was removed before calculations and then the enzyme was examined with inhibitors. The phosphoryl groups of the docked inhibitors were in the form of monoanions.

Conclusions

The data obtained in this study show that calix[4]arene- α -hydroxymethylphosphonic acids can inhibit CD45 and PTP1B with IC_{50} values in the micromolar range. The combination of the macrocyclic platform and α -hydroxymethylphosphonate group is essential for the inhibition activities of these compounds. The computer-simulated docking indicates that α -hydroxymethylphosphonate fragment of the macrocyclic inhibitor may compete with the phosphotyrosine-containing substrate for binding in the active site of PTP1B.

UDC 54.057:547.792

DIRECTED SYNTHESIS OF POTENTIAL ANTITUMOR SUBSTANCES AMONG DERIVATIVES OF 3-MERCAPTO-4-(PYRROL-1-YL)-5-CYCLOHEXYL-1,2,4-TRIAZOLE(4H)

N.B.Saidov, V.A.Georgiyants*, A.M.Demchenko**

Tajik National University, Dushanbe

* National University of Pharmacy,

53, Pushkinska str., Kharkiv, 61002, Ukraine. E-mail: vgeor@ukr.net

** Institute of Pharmacology and Toxicology, Kyiv

Key words: 3-mercapto-1,2,4-triazole; pyrrole; derivatives; synthesis; antitumor action

Synthesis of the series of new 4-(1H-pyrrol-1-yl)-5-cyclohexyl-1,2,4-triazole(4H)-3-yl thioacetanilides from 4-amino-5-cyclohexyl-1,2,4-triazole(4H)-3-yl thioacetanilides previously synthesized is described. The target products 3a-z have been obtained by Paal-Knorr pyrrole condensation of the initial aminocompounds 1 with 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (2) in the acetic acid medium. The structure of the substances synthesized has been proven by elemental analysis and NMR spectra data. All compounds synthesized contain signals of the cyclohexane system protons as two multiplets in their NMR spectra at 2.39-2.33 ppm (methyne proton) and 1.76-1.13 ppm (cyclohexyl methylene groups protons). Unlike the starting compounds (1) the end products (3a-z) have no signal of 4-aminogroup proton as a singlet in the spectra at 5.87-5.92 ppm. Instead of it, signals of the pyrrole ring are present as two triplets at 7-20-7.17 and 6.32-6.29 ppm. Among activities being more probable for the substances synthesized due to preliminary PASS-prognosis were inhibition of MAO and some enzymes (Pa = 0.554-0.729). Compound (3w) was selected by the National Cancer Institute (NCI) for in vitro screening on different tumour cell lines. As result of this investigation we have noted that, unfortunately, substance 3w is not an effective inhibitor of tumour cells in the dose studied, in particular the growth percent for leukemia cells for more sensitive lines is 68.48 (RPMI-8226); 69.30 (HL-60(TB)); for non-small cell lung cancer – 63.06 (HOP-92); for melanoma – 47.82 (SK-MEL-5); 67.37 (UACC-62); for renal cancer – 56.66 (UO-31). Sensitivity of all cancer cell lines for the colon, CNS, ovarian, prostate and breast cancer was approximately at the control level.

ЦІЛЕСПРЯМОВАНИЙ СИНТЕЗ ПОТЕНЦІЙНИХ ПРОТИПУХЛИННИХ СУБСТАНЦІЙ В РЯДУ ПОХІДНИХ 3-МЕРКАПТО-4-(1Н-ПІРОЛ-1-ІЛ)-5-ЦИКЛОГЕКСИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛУ(4Н)

Н.Б.Саїдов, В.А.Георгіянци, А.М.Демченко**Ключові слова:** 3-меркапто-1,2,4-триазол; пірол; похідні; синтез; протипухлинна дія

Описано синтез серії нових 4-(1H-пірол-1-іл)-5-циклогексил-1,2,4-триазол(4H)-3-ілтіоацетанілідів з одержаних раніше 4-аміно-5-циклогексил-1,2,4-триазол(4H)-3-ілтіоацетанілідів. Цільові речовини 3a-z отримані пірольною конденсацією Пааля-Кнорра з вихідних аміносполук 1 та 2,5-диметокситетрагідрофурану (2) в середовищі оцтової кислоти. Структура синтезованих речовин доведена за допомогою елементного аналізу і даних спектрів ЯМР ¹H. Всі синтезовані сполуки містять у спектрах ЯМР ¹H сигнали системи циклогексанових протонів у вигляді двох мультиплетів при 2,39-2,33 м.ч. (метинові протони) та 1,76-1,13 м.ч. (протони метиленових груп циклогексилу). На відміну від вихідних сполук (1) кінцеві продукти (3a-z) не мають у спектрах сигналу протона 4 – аміногрупи у вигляді синглету при 5,87-5,92 м.ч. Замість цього присутні сигнали протонів пірольного кільця у вигляді двох триплетів при 7-20-7,17 і 6,32-6,29 м.ч. Серед видів активності, які були найбільш ймовірні для синтезованих речовин відповідно до попереднього PASS-прогнозу, були інгібування MAO і деяких ферментів (Pa = 0,554-0,729). Сполуку (3w) було обрано Національним інститутом раку (NCI) для скринінгу in vitro на різних лініях ракових клітин. У результаті цього дослідження ми відзначили, що речовина 3w, на жаль, не є ефективним інгібітором росту пухлинних клітин у досліджуваній дозі. Зокрема, відсоток росту лейкозних клітин для найбільш чутливих ліній був: 68,48 (RPMI-8226); 69,30 (HL-60 (TB)); для недрібноклітинного раку легенів – 63,06 (HOP-92); для меланому – 47,82 (SK-MEL-5); 67,37 (UACC-62); для раку нирки – 56,66 (UO-31). Чутливість усіх ліній ракових клітин товстої кишки, ЦНС, яєчників, простати та молочної залози був приблизно на рівні контролю.

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННИЙ СИНТЕЗ ПОТЕНЦІЙНИХ ПРОТИООПУХОЛЕВИХ СУБСТАНЦІЙ В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ 3-МЕРКАПТО-4-(1Н-ПИРОЛ-1-ІЛ)-5-ЦИКЛОГЕКСИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛА(4Н)

Н.Б.Саїдов, В.А.Георгіянци, А.М.Демченко**Ключевые слова:** 3-меркапто-1,2,4-триазол; пиррол; производные; синтез; противоопухолевое действие

Описан синтез серии новых 4-(1H-пиррол-1-ил)-5-циклогексил-1,2,4-триазола(4H)-3-илтиоацетанилидов из полученных ранее 4-амино-5-циклогексил-1,2,4-триазол(4H)-3-илтиоацетанилидов. Целевые вещества 3a-z получены пиррольной конденсацией Паля-Кнорра из исходных аминосоединений 1 и 2,5-диметокситетрагидрофурана (2) в среде уксусной кислоты. Структура синтезированных веществ доказана с помощью элементного анализа и данных спектров ЯМР ¹H. Все синтезированные соединения содержат в спектрах ЯМР ¹H сигналы системы циклогексановых протонов в виде двух мультиплетов при 2,39-2,33 м.д. (метиновые протоны) и 1,76-1,13 м.д. (протоны метиленовых групп циклогексила). В отличие от исходных соединений (1) конечные продукты (3a-z) не имеют в спектрах сигнала протона 4-аминогруппы в виде синглета при 5,87-5,92 м.д. Вместо этого присутствуют сигналы протонов пиррольного кольца в виде двух триплетов при 7-20-7,17 и 6,32-6,29 м.д. Среди видов активности, ко-

торые были наиболее вероятны для синтезированных веществ в соответствии с предварительным PASS-прогнозом, было ингибирование MAO и некоторых ферментов ($Pa = 0,554-0,729$). Соединение (**3w**) было выбрано Национальным институтом рака (NCI) для скрининга *in vitro* на различных линиях раковых клеток. В результате этого исследования мы отметили, что вещество **3w**, к сожалению, не является эффективным ингибитором роста опухолевых клеток в изучаемой дозе. В частности, процент роста лейкозных клеток для наиболее чувствительных линий был: 68,48 (RPMI-8226); 69,30 (HL-60 (ТВ)); для немелкоклеточного рака легкого – 63,06 (HOP-92); для меланомы – 47,82 (SK-MEL-5); 67,37 (UACC-62); для рака почки – 56,66 (UO-31). Чувствительность всех линий раковых клеток толстой кишки, ЦНС, яичников, простаты и молочной железы была примерно на уровне контроля.

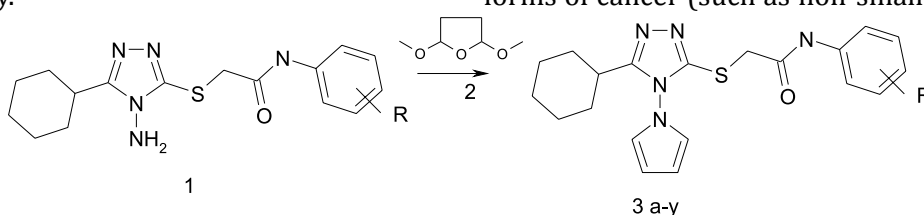
In our present investigation a large group of alkylation products of 3-mercapto-4-amino-1,2,4-triazole(4H) has been synthesized [1]. Due to the presence of the aminogroup in their structure these substances possess a high hydrophilicity and have not a wide spectrum of the possible pharmacological activity. The main way for decreasing hydrophilicity for chemical substances is their chemical modification. We planned such modification of the aminogroup in compounds **1** basing on the literature data about the possible reactivity and products with the pharmacological activity. Thus, large series of compounds with a modified aminogroup are acylated [2], arylidene [3-6], thiosemicarbazide [7, 8] derivatives and products of their cyclization [8, 9]. Mainly the substances synthesized have the antimicrobial activity.

For our investigation we planned to obtain chemical compounds with another structure. We have taken into account that combination in one molecule of both 1,2,4-triazole and pyrrole fragments is promising for obtaining highly active substances with different kinds of the pharmacological activity [10-12]. It has been also noted that these substances possess the antitumour activity.

The abovementioned facts were prerequisites for planning modification of compounds **1** previously synthesized into the corresponding pyrrole derivatives **3** (Scheme).

For carrying out this synthesis we considered different possible methods of transformation of the aminogroup into the pyrrole cycle. The simplest way, in our opinion, is to use Paal-Knorr pyrrole condensation of 2,5-dimethoxytetrahydrofuran with amines, which usually allows to synthesize N-substituted pyrroles under very mild reaction conditions in good to excellent yields [13].

So, the end products **3a-y** (Table 1) have been obtained by Paal-Knorr pyrrole condensation of the initial aminocompounds **1** with 2,5-dimethoxytetrahydrofuran **2** in the acetic acid medium. These conditions allow us to obtain substances **3 a-z** with good yields and purity.



Scheme

The structure of the substances synthesized has been proven by elemental analysis and NMR spectra data (Table 2).

All compounds synthesized contain signals of the cyclohexane system protons as two multiplets in their NMR spectra at 2.39-2.33 ppm (methyne protone) and 1.76-1.13 ppm (cyclohexyl methylene groups protons). Unlike the starting compounds (**1**) the end products (**3a-z**) have no signal of 4-aminogroup proton as a singlet in the spectra at 5.87-5.92 ppm [1]. Instead of it, signals of the pyrrole ring are present as two triplets at 7.20-7.17 and 6.32-6.29 ppm due to the presence of two pairs of magnet equivalent to methyne protons in the pyrrole structure. In some cases these signals overlap with aromatic protons of substituents signals interpreted in the correspondence with their intensity and multiplicity (Table 2). All spectra also contain singlets at 9.54-10.70 ppm due to presence of amide NH-protons.

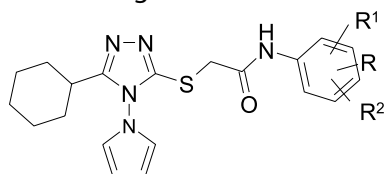
Traditionally the preliminary prediction of the possible pharmacological activity by computer prognosis (PASS programme) [14] was used as the next step of our investigation for optimizing of the pharmacological screening.

Among activities, which are more probable for the substances synthesized, there is inhibition of MAO and some enzymes ($Pa = 0.554-0.729$). It should be noted that there is not enough information about structures like these ones.

Due to the prognosis and logical analysis data the substances synthesized have been examined as possible anticancer agents *in vitro*.

Of the compounds synthesized only one (**3w**) was selected by the National Cancer Institute (NCI) within the Developmental Therapeutic Programme (www.dtp.nci.nih.gov) for *in vitro* cell line screening. Anticancer assays were performed according to US NCI protocol [15]. The compound was evaluated in one dose in the primary anticancer assay towards approximately 60 cell lines (the concentration was 10^{-5} M). The human tumour cell lines represent all forms of cancer (such as non-small cell lung cancer,

Table 1
Yields, melting points for the substances synthesized with the general formula of



Comp.	R	R ¹	R ²	Yield	Melting point °C
3a	3-Me	H	H	73.4	114-6
3b	2-Et	H	H	77.2	130-2
3c	4-Et	H	H	81.1	134-6
3d	4-i-Pr	H	H	74.4	138-40
3e	2-OMe	H	H	76.5	118-20
3f	3-Cl	H	H	70.8	125-7
3g	4-Cl	H	H	76.4	192-4
3h	3-F	H	H	77.8	148-50
3i	4-F	H	H	80.5	158-60
3j	3-CF ₃	H	H	72.9	127-9
3k	4-OEt	H	H	73.3	203-5
3l	4-COOMe	H	H	75.7	218-20
3m	2-COOEt	H	H	77.6	135-7
3n	4-COOEt	H	H	77.5	84-6
3o	4-COMe	H	H	72.1	203-5
3p	2-Me	3-Me	H	79.4	164-6
3q	2-Me	5-Me	H	77.8	158-60
3r	2-Me	5-Me	H	74.3	160-2
3s	3-Me	5-Me	H	75.5	156-8
3t	2-Me	5-Cl	H	76.2	133-5
3u	3-Me	4-Br	H	73.1	160-2
3v	2-Me	4-Me	6-Me	83.3	166-8
3w	2-OMe	4-OMe	H	77.6	116-8
3x	3-OMe	4-OMe	H	73.8	168-70
3y	2-Cl	6-Cl	H	71.7	220-2

colon cancer, breast cancer, ovarian cancer, leukemia, renal cancer, melanoma, prostate cancer). In the screening protocol, each cell line was inoculated and pre-incubated for 24-48 h on a microtiter plate. Test agents were then added at the single concentration and the culture was incubated for additional 48 h. The end point determinations were made with a protein binding dye, sulforhodamine B (SRB). The results for each test agent were reported as the percent growth of the treated cells compared to the untreated control cells.

As result of this investigation we have noted that, unfortunately, substance 3w is not an effective inhibitor of tumour cells in the dose studied, in particular the growth percent for leukemia cells for more sensitive lines is 68.48 (RPMI-8226); 69.30 (HL-60(TB)); for non-small cell lung cancer – 63.06 (HOP-92); for melanoma – 47.82 (SK-MEL-5); 67.37 (UACC-62); for renal cancer – 56.66 (UO-31). Sensitivity of all cancer cell lines for the colon, CNS, ovarian, prostate and breast cancer was approximately at the control level.

The next step for investigation of these compounds will be the research of the CNS activity.

Experimental Part

Melting points were determined by the open capillary tube. NMR ¹H spectra were recorded on a Bruker WM spectrometer (300 MHz); solvents – CDCl₃ or DMSO-d₆; chemical shifts were in ppm, TMS was used as an internal standard. The purity of the compounds synthesized was monitored by TLC.

The elemental analysis data correspond to the calculated ones.

N-Phenyl-2-(5-cyclohexyl-4-(1H-1-pyrrolyl)-4H-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetanilides (3a-y, Table 1) (a general procedure). To the solution of 0.005 mole

Table 2

Chemical shifts (δ, ppm) at NMR ¹H spectra of the substances synthesized

Comp.	NH, s, 1H	Ar-H	Pyrrole 2.5, 2H, t	Pyrrole 3.4, 2H, t	S-CH ₂ , s, 2H	CH, 1H, m	5xCH ₂ (cyclohex), 10H, m	Other
1	2	3	4	5	6	7	8	9
3a	10.26	7.40, 2H,m, 7.19, 3H, m, 6.90, 1H, d		6.31	4.10	2.36, 4H (+CH ₃)	1.76-1.16	-
3b	9.69	7.35, 1H, d, 7.18, 5H, m		6.31	4.13	2.36	1.76-1.16	2.57, 2H, kv, CH ₂ CH ₃ , 1.11, 3H, c, CH ₃
3c	10.27	7.48, 2H, d, 7.19, 4H, m		6.31	4.10	2.35	1.75-1.15, 13H, m (CH ₃)	2.51, 2H, c, CH ₂
3d	10.26	7.45, 2H, d, 7.17, 4H, m		6.31	4.09	2.36	1.75-1.16, 16H, m (+2x CH ₃)	2.84, 1H,c, CH
3e	9.67	7.97, 1H,d, 7.06, 1H, m, 6.91, 1H, t	7.20	6.31	4.14	2.35	1.76-1.16	3.32, 3H, s, OCH ₃
3f	10.62	7.09; 7.38-7.54, m, 4H	7.18	6.30	4.11	2.39	1.72-1.17	
3g	10.41	8.65, 1H,d, 7.95, 1 H, d, 7.63, 1H, t, 7.20, 3H, m		6.32	4.11	2.34	1.73-1.17, 13H (+CH ₃)	4.31, 2H, q, CH ₂ CH ₃
3h	10.56	7.57, 1H, d, 7.36, 2H, m, 6.91, 1H,t	7.20	6.32	4.13	2.36	1.75-1.15	-
3i	10.41	7.59, 2H,m, 7.19, 4H, m		6.31	4.10	2.36	1.73-1.14	-
3j	10.71	8.06-7.44, 4H, m	7.20	6.32	4.14	2.34	1.71-1.15	-
3k	10.18	7.45; 6.87, dd, 4H	7.18	6.30	4.07	2.34	1.74-1.15, 13H (+CH ₃)	3.96, 2H, q, OCH ₂

Table 2 continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3l	10.67	7.93,2H,d, 7.70, 2H, d	7.17	6.29	4.14	2.35	1.74-1.16	3.81, s, 3H (OCH ₃)
3m	11.20	7.50, 2H,m, 7.35, 1H, m	7.19	6.31	4.10	2.35	1.73-1.15	2.31, 3H, s, CH ₃
3n	10.64	7.93,2H,d, 7.70, 2H, d	7.17	6.30	4.13	2.35	1.74-1.16, 13H (+CH ₃)	4.28, 2H, q, CH ₂ CH ₃
3o	10.69	7.94, 2H, d, 7.72, 2H, d	7.19	6.31	4.16	2.35	1.76-1.15	2.51, 3H, c, CH ₃
3p	9.74	7.14, 1H, d, 6.04, 2H, m	7.20	6.32	4.11	2.36	1.75-1.17	2.25, 3H, c, 2.07, 3H, s, 2xCH ₃
3q	9.61	7.05, m, 3H	7.18	6.31	4.11	2.35	1.75-1.16	2.49, 6H, s, 2xCH ₃
3r	9.64	7.23, 1H,c, 7.08, 1H, d, 6.89, 1H, d	7.18	6.30	4.09	2.35	1.75-1.15	2.49, 3H, c, 2.13, 3H, s, 2xCH ₃
3s	10.17	7.17, 4H, m, 6.72,1H,c		6.29	4.08	2.35	1.76-1.16	2.18, c, 6H, CH ₃
3t	9.72	7.59, 1H,s, 7.19, 4H, m		6.31	4.12	2.35	1.73-1.16	2.20, 3H, s, CH ₃
3u	10.41	7.50, 2H,m, 7.35, 1H, m	7.19	6.31	4.10	2.35	1.73-1.15	2.31, 3H, s, CH ₃
3v	9.53	6.86, 2H,s	7.18	6.31	4.09	2.36	1.73-1.15	2.21, 3H, c, 2.06,3H, s, 2xCH ₃
3w	9.51	7.76, 1H, d, 6.61, 1H, s, 6.41, 1H, d	7.19	6.31	4.09	2.33	1.73-1.13	3.81, 3H, c, 3.74, 3H, s, 2xCH ₃
3x	10.20	7.28-7.19, 5H, m		6.32	4.08	2.35	1.76-1.16	2.71, 6H, c, 2xOCH ₃
3y	10.28	7.54, d; 2H, 7.35, t, 1H	7.17	6.30	4.16	2.34	1.73-1.15	-

of N-phenyl-2-(4-amino-5-cyclohexyl-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetanilide **2** [1] in 40 ml acetic acid add 0.005 mole of 2,5-dimethoxytetrahydrofuran. Reflux the reaction mixture for about 1 h, cool and place into 200 ml water. Collect and dry the precipitate re-crystallizing it from ethanol.

Conclusions

1. Series of new N-Phenyl-2-(5-cyclohexyl-4-(1H-1-pyrrolyl)-4H-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetanilides has

been synthesized started from the corresponding amino derivatives using Paal-Knorr condensation. The structure of the compounds synthesized has been proven by elemental analysis and NMR-spectra data.

2. Due to prognosis and logical analysis data the pharmacological screening have been planed for discovering of an antitumour and CNS-agent. It has been shown that in the *in-vitro* investigation one of the compounds synthesized has not a high potential in the cancer cell inhibition.

References

- Saidov N. B., Georgiyants V. A., Garna N. V. *Zhurnal organichnoi ta farmacevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2013, Vol. 11, 4(44), pp.33-37.
- Upmanyu N., Kumar S., Murali-Dhar, Kharya, Shah K., Mishra P. *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research*, 2011, Vol. 68, 2, pp.212-221.
- Goyal P. K., Bhandari A., Rana A. C., Jain C. B. *International Journal Chem. Tech. Research*, 2010, Vol. 2, 4, pp.1992-1997.
- Jubie S., Sikdar P., Kalirajan R., Kalirajan R., Gowramma B., Gomathy S., Elango K. *Pakistan Journal Pharmaceutical Research*, 2011, Vol. 3, 3, pp.511-513.
- Calisir M. M., Kocyigit-Kaymakcioglu B., Uzbek B., Utuk G. *E-Journal of Chemistry*, 2010, Suppl. 1, Vol. 7, pp.458-464.
- Valentina P., Ilango K., Deepthi M., Harusha P., Pavani G. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2009, Vol. 1, 2, pp.74-77.
- Kshirsagar A., Toraskar M. P., Kulkarni V., Dhanashirez M. S., Kadam V. *International Journal Chem. Tech. Research*, 2009, Vol. 1, 3, pp.696-701.
- Al-Omar M. A. *Molecules*, 2010, Vol. 15, pp.502-514.
- Bhat K. S., Poojary B., Prasad D. J., Naik P., Holla B. S. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, Vol. 44, 12, pp.5066-5070.
- Idhayadhulla A., Kumar R. S., Nasser A. J. A., Manilal A. *Der Pharma Chemica*, 2011, Vol. 3, 4, pp.210-218.
- Joshi S. D., More U. A., Kulkarni V. H. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, Vol. 75, 3, pp.310-323.
- Bijev A. T., Prodanova P. *Khimia geterociklicheskih soedinenij – Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2007, Vol. 43, 3, pp.306-313.
- Azizi N., Khajeh-Amiri A., Ghafuri H., Bolourchian M., Saidi M. R. *Synlett*, 2009, pp.2245-2248.
- Poroiikov V. V. *Medicinal Chemistry Research*, 2010, Vol. 19 (S1), pp.30.
- Shoemaker R. H. *Nature Reviews Cancer*, 2006, Vol. 6, pp.813-823.

Надійшла до редакції 05.02.2014 р.

УДК 547.796.1

СИНТЕЗ 7-АРИЛ-6,7-ДИГИДРОТЕТРАЗОЛО[1,5-*a*]ПІРИМІДИН-5(4*H*)-ОНІВ

Н.В.Світлична, В.В.Бородіна, В.В.Ліпсон*/**, В.І.Мусатов**

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського НАМН України»
61002, м. Харків, вул. Артема, 10. E-mail: lipson@ukr.net

* Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна

** ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України

Ключові слова: 1*H*-тетразол-5-амін; 1,3-карбонільні біелектрофіли; метилцинамат; арилметиліденмалонові кислоти; арилметиліденпохідні 2,2-диметил-1,3-діоксан-4,6-діону; кислота Мельдрума; 6,7-дигідро-7-арилтетразоло[1,5-*a*]піримідин-5(4*H*)-они; синтез; фармакологічна активність

Циклоконденсації 1*H*-тетразол-5-аміну з метилцинаматами, арилметиліденмалоновими кислотами та арилметиліденпохідними 2,2-диметил-1,3-діоксан-4,6-діону (кислоти Мельдрума) відбуваються регіоселективно та приводять до утворення 7-арил-6,7-дигідротетразоло[1,5-*a*]піримідин-5(4*H*)-онів. Направленість формування піримідинового кільця відповідає взаємодії атома карбону у β-положенні ненасиченої карбонільної сполуки з ендоциклічним атомом нітрогену, а карбонільної групи – з аміногрупою в молекулі аміноазолу. Сполук ізомерної будови в жодному з експериментів не виявлено. Склад та будову вперше синтезованих тетразоло[1,5-*a*]піримідин-5(4*H*)-онів доведено за допомогою елементного аналізу, інфрачервоної спектроскопії (ІЧ), ядерного магнітного резонансу на протонах (ЯМР ¹H) та мас-спектрометрії. Віртуальний скринінг 7-арил-6,7-дигідротетразоло[1,5-*a*]піримідин-5(4*H*)-онів, проведений із використанням програми PASS за 780 видами фармакологічної дії, засвідчив, що ці сполуки доцільно тестувати за показниками анальгетичної активності, а також як потенційні засоби для лікування серцевої недостатності.

SYNTHESIS OF 7-ARYL-6,7-DIHYDROTETRAZOLO[1,5-*a*]PYRIMIDIN-5(4*H*)-ONES

N.V.Svitlichna, V.V.Borodina, V.V.Lipson, V.I.Musatov

Key words: 1*H*-tetrazol-5-amine; 1,3-carbonyl bielectrophiles; methylcinnamates; arylmethylidenmalonic acids; arylmethyliden derivatives of 2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione; Meldrum's acid; 6,7-dihydro-7-aryltetrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5(4*H*)-ones; synthesis; pharmacological activity

Cyclocondensations of 1*H*-tetrazol-5-amine with methylcinnamates, arylmethyliden malonic acids and arylmethyliden derivatives of 2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione (Meldrum's acid) proceed regioselectively and lead to formation of 7-aryl-6,7-dihydro-7-aryltetrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5(4*H*)-ones. The direction of cyclization corresponds to the interaction of the carbon atom in β-position of the unsaturated carbonyl compounds with the endocyclic nitrogen atom and the carbonyl group with amino group in the aminoazole molecule. Compounds of the isomeric structure in any of the experiments have been not identified. The structures and composition of the newly synthesized tetrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5(4*H*)-ones have been confirmed by elemental analysis, infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance on protons (¹H NMR) and mass spectra data. Virtual screening of 7-aryl-6,7-dihydro-7-aryltetrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5(4*H*)-ones carried out using the PASS programme for 780 types of the pharmacological action has demonstrated that it is expedient to test these compounds by their analgesic and anti-inflammatory activity, as well as as potential agents for the treatment of heart failure.

СИНТЕЗ 7-АРИЛ-6,7-ДИГИДРОТЕТРАЗОЛО[1,5-*a*]ПІРИМІДИН-5(4*H*)-ОНІВ

Н.В.Світлична, В.В.Бородіна, В.В.Ліпсон, В.І.Мусатов

Ключевые слова: 1*H*-тетразол-5-амин; 1,3-карбонильные биелектрофилы; метилцинаматы; арилметиліденмалонові кислоти; арилметиліденпроизводные 2,2-диметил-1,3-діоксан-4,6-диона; кислота Мельдрума; 6,7-дигідро-7-арилтетразоло[1,5-*a*]піримідин-5(4*H*)-они; синтез; фармакологіческая активність

Циклоконденсації 1*H*-тетразол-5-аміна з метилцинаматами, арилметиліденмалоновими кислотами та арилметиліденпроизводними 2,2-диметил-1,3-діоксан-4,6-диона (кислоти Мельдрума) проходять регіоселективно і приводять до утворення 7-арил-6,7-дигідротетразоло[1,5-*a*]піримідин-5(4*H*)-онів. Направленість формування піримідинового кільця відповідає взаємодії атома вуглецю, що знаходиться в β-положенні ненасиченого карбонільного зв'язування, з ендоциклічним атомом азота, а карбонільної групи – з аміногрупою в молекулі аміноазолу. Сполук ізомерної будови в жодному з експериментів не виявлено. Склад та будову вперше синтезованих тетразоло[1,5-*a*]піримідин-5(4*H*)-онів доведено за допомогою елементного аналізу, інфрачервоної спектроскопії (ІК), ядерного магнітного резонансу на протонах (ЯМР ¹H) та мас-спектрометрії. Віртуальний скринінг отриманих 7-арил-6,7-дигідротетразоло[1,5-*a*]піримідин-5(4*H*)-онів, проведений з використанням програми PASS по 780 видам фармакологічного дії, показав, що ці зв'язування цілком доцільно тестувати за показниками анальгетичної та протизапальної активності, а також як потенційні засоби для лікування серцевої недостатності.

Тетразольний цикл є ізостером карбоксильної групи, який широко використовується у синтезі біологічно активних сполук і входить до складу сучасних високоефективних антигіпертензивних засобів – антагоністів рецепторів ангіотензину II – сартанів. Серед конденсованих похідних тетразолу, зокрема тетразола[1,5-*a*]піримідинів також відомі антагоністи зазначених рецепторів [1], інгібітори ксантиноксидази, що перешкоджають утворенню сечових конкрементів та накопиченню сечової кислоти у сироватці та нирках [2], інгібітори NO-синтетази – сполуки з протизапальними і анагетичними властивостями, здатні загальмувати розвиток септичного шоку або захворювань аутоімунної природи [3]. Тому пошук доступних, регіоскерованих методів побудови вказаних систем має певне практичне значення.

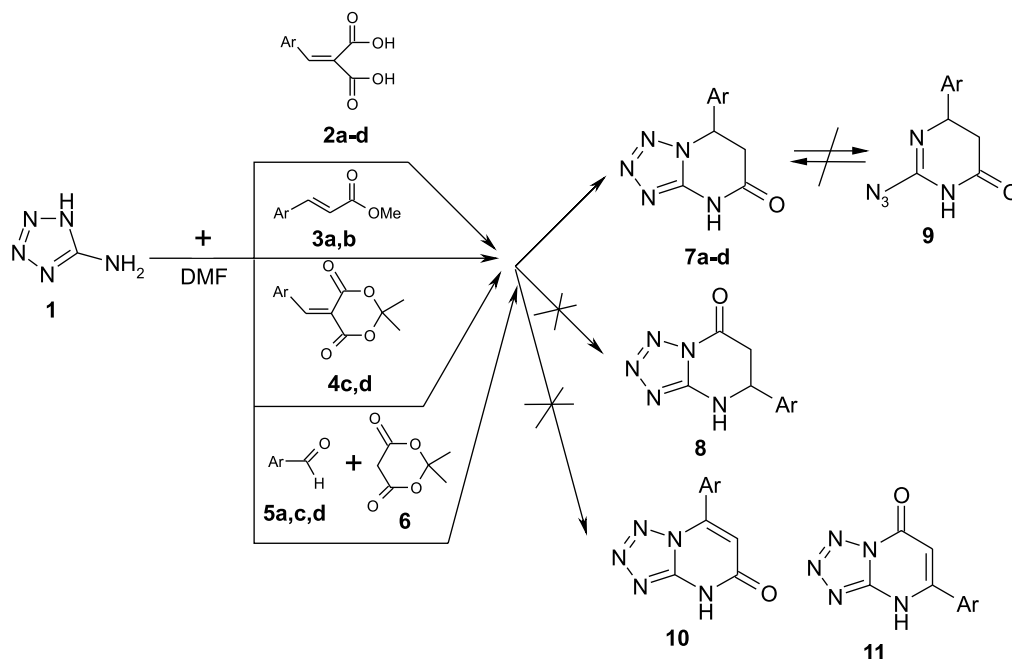
На сьогодні є два основні підходи до синтезу тетразоліпіримідинів з арильними замісниками в азиновому циклі. Перший пов'язаний з побудовою тетразольного циклу до вже існуючого піримідинового [4, 5]. Але його недоліком є використання важкодоступних аміно- і гідразінопіримідинів. Другий ґрунтується на реакціях 5-амінотетразолу з карбонільними 1,3-біелектрофільними сполуками або їх синтетичними попередниками [6-8]. Втім при застосуванні несиметричних біелектрофілів ймовірно утворення сумішей ізомерних тетразоліпіримідинів, тому важливо виявити такі С-3 синтони, які б забезпечували регіоселективність у формуванні піримідинового циклу. Мета даного дослідження полягає у встановленні направленості взаємодії 5-амінотетразолу з естерами заміщених коричних кислот, арилметиліденмалоновими кислотами та аналогічними

похідними 2,2-диметил-1,3-діоксан-4,6-діону (кислоти Мельдрума) у різних умовах.

При тривалому (впродовж 2-2,5 год) кип'ятінні еквімольних кількостей 1*H*-тетразол-5-аміну **1** з арилметиліденмалоновими кислотами **2a-d**, метилцинаматами **3a,b**, арилметиліденпохідними кислоти Мельдрума **4c,d**, а також з синтетичними попередниками останніх – бензальдегідами **5a,c,d** і діоксандіоном **6** у диметилформаміді утворюються 7-арил-6,7-дигідротетразоло[1,5-*a*]піримідин-5(4*H*)-они **7a-d** [9]. Сполук ізомерної будови **8** в жодному з експериментів не виявлено (схема).

Одержати тетразоліпіримідини **7** у м'яких умовах – при кип'ятінні аміну **1** з карбонільними біелектрофілами у спиртовому середовищі (MeOH, EtOH, *i*-PrOH) не вдалося. В усіх випадках з реакційної суміші виділені вихідні речовини або їх суміші з відповідними коричними кислотами – продуктами декарбоксилювання сполук **2** або ретро-розпаду іліденових похідних **4**.

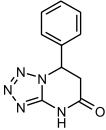
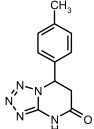
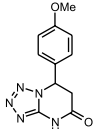
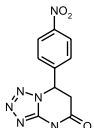
Склад та будову вперше синтезованих тетразоліпіримідинонів **7a-d** доведено за допомогою елементного аналізу, ІЧ-, ЯМР ¹H та мас-спектральними методами. Вибір між 5- **7** та 7-оксоізомерами **8** здійснено шляхом порівняння ІЧ і ЯМР ¹H спектрів з відповідними даними для їх найближчих структурних аналогів – похідних дигідро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]піримідин-5- та -7-онів, описаних раніше [10, 11]. Наявність у ІЧ-спектрах сполук **7a-d** смуг поглинання при 3492-2784 (NH-зв'язана), 1696-1712 («амід I»), 1520-1542 см⁻¹ («амід II») свідчить на користь лактамного характеру частково відновленого піримідинового кільця. Для 1,2,4-триазольних аналогів сполук альтернатив-



2-5,7: **a** Ar= C₆H₅, **b** Ar= C₆H₄-4-Me, **c** Ar= C₆H₄-4-OMe, **d** Ar= C₆H₄-4-NO₂

Таблиця

Передбачувана біологічна активність сполук **7a-d** за програмою PASS

Сполука, №	Сполука	P _a	P _i	Активність
7a		0,943	0,003	Heart failure treatment
		0,854	0,004	Analgesic, non-opioid
		0,839	0,005	Analgesic
7b		0,918	0,003	Heart failure treatment
		0,819	0,005	Analgesic, non-opioid
		0,806	0,005	Analgesic
7c		0,893	0,003	Heart failure treatment
		0,765	0,005	Analgesic, non-opioid
		0,758	0,006	Analgesic
7d		0,901	0,003	Heart failure treatment
		0,725	0,005	Analgesic, non-opioid
		0,708	0,009	Analgesic

P_a – вірогідність наявності активності; P_i – вірогідність відсутності активності

ної будови **8** з карбонільною групою у 7-му положенні біциклічної системи валентні коливання C=O виявляються в області значно більших хвильових чисел 1724-1760 см⁻¹ [10-12]. Відсутність прояву коливань N₃-фрагмента при 2120-2166 см⁻¹ спростовує існування тетразольного циклу в азидній формі **9** [13].

У спектрах ЯМР ¹H тетразоліпіримідинонів **7** хімічний зсув протону NH-групи зареєстровано в інтервалі 11.14-12.32 м.ч., що типово для 5-оксопохідних. У випадку 7-оксоізомерів будови **8** резонанс цієї групи слід очікувати у більш сильному полі при 8.44-9.00 м.ч. [10-12]. Окрім цього, у спектрах ЯМР ¹H присутні сигнали усіх протонівмісних груп (див. експериментальну частину). Наявність сигналів фрагмента C⁶H₂-C⁷H, які утворюють АВХ систему, однозначно підтверджує частково гідрогенований характер азинового циклу і спростовує структури **10,11**.

Позаекспериментальний скринінг 7-арил-6,7-дигідротетразоло[1,5-а]піримідин-5(4H)-онів **7a-d**, проведений із використанням програми PASS [14], засвідчив, що ці сполуки доцільно вивчати за показниками протизапальної та анальгетичної активності, а також як потенційні засоби лікування серцевої недостатності (таблиця). Ці результати повністю збігаються з даними літературного пошуку, наведеними у вступі.

Експериментальна частина

ІЧ-спектри зареєстровано на спектрометрі Record M-82 для таблеток КВг, ЯМР ¹H спектри – на спектрометрі Varian-200 для розчинів у DMSO-d₆,

внутрішній стандарт – ТМС. Мас-спектри виміряні на хромато-мас-спектрометрі Varian 1200 L при прямому введенні зразка в іонне джерело, іонізуюча напруга – 70 eV. Елементний аналіз виконано на приладі Euro AE-3000. Температури плавлення визначені на блоці Кофлера.

Циклоконденсації 1H-тетразол-5-аміну **1 з карбонільними 1,3-біелектрофілами (загальні методики).**

А. Суміш 2 ммоль (0,17 г) амінотетразолу **1** та 2 ммоль арилметиліденмалонової кислоти **2** у 1 мл ДМФА кип'ятять впродовж 2 год, охолоджують, додають 5 мл 2-пропанолу, осад тетразоліпіримідинону **7** відфільтровують.

В. Суміш 2 ммоль (0,17 г) амінотетразолу **1** і 2 ммоль естеру коричної кислоти **3** в 1 мл ДМФА кип'ятять впродовж 2,5 год, охолоджують, додають 5 мл 2-пропанолу, осад сполуки **7** відфільтровують та висушують.

С. Суміш 1 ммоль (0,09 г) амінотетразолу **1** з 1 ммоль арилметиліденпохідної кислоти Мельдрума **4** у 1 мл ДМФА кип'ятять впродовж 2 год, охолоджують, додають 5 мл 2-пропанолу, осад сполуки **7** відфільтровують, кристалізують з 2-пропанолу.

Д. Суміш 1 ммоль (0,09 г) амінотетразолу **1**, 1 ммоль альдегіду **5** та 1 ммоль (0,14 г) кислоти Мельдрума **6** у 1 мл ДМФА кип'ятять впродовж 2 год, охолоджують, додають 5 мл 2-пропанолу, осад сполуки **7** відфільтровують та висушують.

6,7-Дигідро-7-фенілтетразоло[1,5-а]піримідин-5(4H)-он **7a.** Вихід – 63% (**A**), 68% (**B**), 74% (**D**), Т.пл. – 240-242°C. ІЧ-спектр, ν, см⁻¹: 3492-2960 (NH,

Н-зв'яз.), 1700 (C=O-«амід І»), 1540 (CN, NH-«амід II»). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.ч.: 3.09, 3.29 д.д (2H, C $^6\text{H}_2$, $J_{\text{AX}} = 6.8$, $J_{\text{BX}} = 7.2$, $J_{\text{AB}} = -16.2$ Гц), 6.04 т (1H, C ^7H), 7.27-7.39 м (5H, $\text{H}_{\text{аром}}$), 11.89 р.с (1H, NH). Мас-спектр, m/z ($I_{\text{відн}}$ (%)): 215[M] $^+$ (24), 186(28), 149(27), 104(75), 77(50). Знайдено, %: С 55,88; Н 4,17; N 32,60. $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$. Розраховано, %: С 55,81; Н 4,19; N 32,56.

6,7-Дигідро-7-(4-метилфеніл)тетразоло [1,5-а]піримідин-5(4H)-он 7b. Вихід – 72% (А), 56% (В), Т.пл. – 206-208°C. ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 3448-2840 (NH, Н-зв'яз.), 1712 (C=O-«амід І»), 1540 (CN, NH-«амід II»). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.ч.: 2.85 с (3H, CH_3), 3.07, 3.25 д.д (2H, C $^6\text{H}_2$, $J_{\text{AX}} = 7.4$, $J_{\text{BX}} = 6.6$, $J_{\text{AB}} = -16.4$ Гц), 5.99 т (1H, C ^7H), 7.20 д.д (4H, $\text{H}_{\text{аром}}$, $J = 8.2$ Гц), 11.14 р.с (1H, NH). Мас-спектр, m/z ($I_{\text{відн}}$ (%)): 229[M] $^+$ (30), 200(38), 163(29), 118(85), 91(49). Знайдено, %: С 57,62; Н 4,82; N 30,58. $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$. Розраховано, %: С 57,64; Н 4,80; N 30,57.

6,7-Дигідро-7-(4-метоксифеніл)тетразоло [1,5-а]піримідин-5(4H)-он 7c. Вихід – 63% (А), 65% (С), 65% (D), Т.пл. – 202-204°C. ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 3468-2840 (NH, Н-зв'яз.), 1706 (C=O-«амід І»), 1542 (CN, NH-«амід II»). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.ч.: 3.16, 3.41 д.д (2H, C $^6\text{H}_2$, $J_{\text{AX}} = 7.4$, $J_{\text{BX}} = 6.8$, $J_{\text{AB}} = -16.2$ Гц), 3.74 с (3H, OCH_3), 5.96 т (1H, C ^7H), 7.00-7.74 д.д (4H, $\text{H}_{\text{аром}}$, $J = 8.8$ Гц), 12.04 р.с (1H, NH). Мас-спектр, m/z ($I_{\text{відн}}$ (%)): 245[M] $^+$ (33), 216(25), 179(31), 134(78), 107(53). Знайдено, %: С 53,90; Н 4,47; N 28,54. $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2$. Розраховано, %: С 53,88; Н 4,49; N 28,57.

6,7-Дигідро-7-(4-нітрофеніл)тетразоло [1,5-а]піримідин-5(4H)-он 7d. Вихід – 65% (А),

75% (С), 78% (D), Т.пл. – 260-264°C. ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 3484-2784 (NH, Н-зв'яз.), 1696 (C=O-«амід І»), 1520 (CN, NH-«амід II»), 1348 (NO_2). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.ч.: 3.16, 3.41 д.д (2H, C $^6\text{H}_2$, $J_{\text{AX}} = 8.0$, $J_{\text{BX}} = 6.6$, $J_{\text{AB}} = -16.4$ Гц), 6.19 т (1H, C ^7H), 7.58-8.29 д.д (4H, $\text{H}_{\text{аром}}$, $J = 8$ Гц), 12.32 р.с (1H, NH). Мас-спектр, m/z ($I_{\text{відн}}$ (%)): 260[M] $^+$ (34), 231(38), 194(31), 149(77), 122(56). Знайдено, %: С 46,13; Н 3,10; N 32,30. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_6\text{O}_3$. Розраховано, %: С 46,15; Н 3,08; N 32,31.

Висновки

1. Циклоконденсації 1H-тетразоло-5-аміну з арилметиліденмалоновими кислотами, естерами заміщених коричних кислот, арилметиліденпохідними кислоти Мельдрума та їх синтетичними попередниками – ароматичними альдегідами та ізопропіліденмалонатом є регіоселективними і завершуються утворенням 7-арилзаміщених дигідротетразоло[1,5-а]піримідин-5(4H)-онів.

2. Направленість утворення піримідинового кільця відповідає взаємодії атома карбону у β -положенні ненасиченої карбонільної сполуки з ендциклічним атомом нітрогену, а карбонільної групи – з аміногрупою в молекулі аміноазолу.

3. Віртуальний скринінг 7-арил-6,7-дигідротетразоло[1,5-а]піримідин-5(4H)-онів, проведений із використанням програми PASS, засвідчив, що ці сполуки доцільно вивчати за показниками протизапальної та аналгетичної активності, а також як потенційні засоби для лікування серцевої недостатності.

Література

1. Pat. US 5231094. – Publ. 27.07.93. Chem. Abstr., 1994, Vol. 120, 8611 p.
2. Pat. WO 9617610. – Publ. 13.06.96. Chem. Abstr., 1996, Vol. 125, 132770 p.
3. Pat. JP 11029480. – Publ. 02.02.99. Chem. Abstr., 1999, Vol. 130, 191897 p.
4. Ivashchenko A. V., Garicheva O. N. Khimiya geterocyclicheskikh soedinenij – Chemistry of Heterocyclic Compounds, 1982, No.5, pp.579-600.
5. Kanno H., Yamaguchi H., Ichikawa Y., Isoda S. A reagent, ethyl 2-(2-tret-butyl-2H-tetrazol-5-yl)-3-(dimethylamino)acrylate (DMTE), for facile synthesis of 2,3-(ring fused)-5-(5-tetrazolyl)-4H-pyrimidin-4-one derivatives, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1991, Vol. 39, No.5, pp.1099-1105.
6. Chebanov V. A., Desenko S. M., Gurley T. W. Azaheterocycles based on a,b-unsaturated carbonyls. Springer, 2008, 212 p.
7. Pat. UA 48132. – Publ. 15.08.02, No.96104029. – www.ukrpatent.org
8. Zeng L.-Y., Cai C. Iodine catalyzed one-pot multicomponent synthesis of a library of compounds containing tetrazolo[1,5-a]pyrimidine core. China Journal of Combinatorial Chemistry, 2010, Vol. 12, No.1, pp.35-40.
9. Pat. 52485 (2010) Ukraine. B. V., 2010, No.16.
10. Lipson V. V., Desenko S. M., Borodina V. V., Shirobokova M. G., Karnozhitskaya T. M., Musatov V. I., Kravchenko S. V. Khimiya geterocyclicheskikh soedinenij – Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2005, No.2, pp.246-251.
11. Lipson V. V., Shirobokova M. G., Borodina V. V. Ukrainiskij khimicheskij zhurnal – Ukrainian Chemical Journal, 2005, No.6, pp.95-99.
12. Lipson V. V. Azoloazinovye sistemy s chastichno gidrirovannym azinovym tsiklom. (Metody sinteza, khimicheskie svoystva i farmakologicheskaya aktivnost' azolopiridinov, -pirimidinov i -piridazinov). – Azoloazine systems with partially hydrogenated azine cycle. (Methods of synthesis, chemical properties and pharmacological activity azolopyridines, -pyrimidines and -pyridazines), Moscow, Palmarium Academic Publ., 2012, 395 p.
13. Bellamy L. J. The Infrared Spectra of Complex Molecules. Vol. 2. London, Chapman and Hall, 1980, 299 p.
14. www.ibm.msk.ru/pass

Надійшла до редакції 05.02.2014 р.

УДК 615.212:542.951.1:547.831.7:547.831.9

N-БЕНЗИЛ-4-ГИДРОКСИ-2-ОКСО-1-(2-ЦИАНОЭТИЛ)-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОКСАМИДЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНАЛЬГЕТИКИ

И.В.Украинец, О.В.Горохова, К.В.Андреева, А.А.Давиденко*

Национальный фармацевтический университет
61002, г. Харьков, ул. Пушкинская, 53. E-mail: uiv-2@mail.ru

* Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И.Пирогова

Ключевые слова: бензиламиды; гетарилпропановые кислоты; 4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолины; синтез; анальгетическая активность

Взяв за основу закономерности связи «структура – анальгетическая активность», выявленные ранее при изучении биологических свойств многочисленных N-замещенных амидов 1-R-4-гидрокси-6,7-диметокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновых кислот, мы провели целенаправленную химическую модификацию структурно близких N-алкил-4-гидрокси-2-оксо-1-(2-цианоэтил)-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамидов. Осуществленные изменения коснулись исключительно амидного фрагмента этих соединений и фактически представляют собой замену одного из атомов водорода метильной группы в N-метил-4-гидрокси-2-оксо-1-(2-цианоэтил)-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамиде ароматическим ядром. Показано, что в синтезе целевых соединений можно использовать различные варианты амидирования этилового эфира 4-гидрокси-2-оксо-1-(2-цианоэтил)-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты бензиламидами: термоліз ефіра і аміна без розчинника при температурі 140°C или же взаимодействие эфира с избытком амина в кипящем спирте. Периферический компонент в механизме анальгетических свойств N-бензил-4-гидрокси-2-оксо-1-(2-цианоэтил)-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамидов изучен на белых мышах на классической модели «уксуснокислых корчей» параллельно и в сравнении с диклофенаком. Установлено, что некоторые из синтезированных веществ при пероральном введении в дозе 5 мг/кг заметно превосходят по обезболяющему эффекту препарат сравнения и могут быть рекомендованы для более глубокого исследования, как потенциальные анальгетики.

N-BENZYL-1-(2-CYANOETHYL)-4-HYDROXY-2-OXO-1,2-DIHYDRO-3-QUINOLINECARBOXAMIDES AS PROMISING ANALGESICS

I.V.Ukrainets, O.V.Gorokhova, X.V.Andreeva, A.A.Davidenko

Key words: benzyl amides; hetarylpropanoic acids; 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinolines; synthesis; analgesic activity
Based on the regularities of the “structure – analgesic activity” relationship revealed earlier in the complex study of the biological properties of numerous N-substituted amides of 1-R-4-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids the target chemical modification of the structurally related N-alkyl-1-(2-cyanoethyl)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamides has been conducted. These changes concerned only the amide fragment of the given compounds, and they are actually the replacement of one of the hydrogen atoms of the methyl group in N-methyl-1-(2-cyanoethyl)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamide by the aromatic ring. It has been shown that in the synthesis of the target compounds various variants of amidation of 4-hydroxy-2-oxo-1-(2-cyanoethyl)-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester with the benzyl amines can be successfully used: by thermolysis of the ester and amine without a solvent at 140°C or by interaction of the ester with the excess of amine in boiling alcohol. The peripheral component in the mechanism of analgesic properties of N-benzyl-1-(2-cyanoethyl)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamides has been studied on the standard model of “acetic acid-induced writhing” in white mice concomitantly and in comparison with diclofenac. It has been found that some of the substances synthesized exceed notably the reference drug as for the analgesic effect when administered orally in the dose of 5 mg/kg, and they can be recommended for more profound research as potential analgesics.

N-БЕНЗИЛ-4-ГИДРОКСИ-2-ОКСО-1-(2-ЦИАНОЭТИЛ)-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОКСАМИДИ ЯК ПЕРСПЕКТИВНІ АНАЛГЕТИКИ

I.V.Українець, O.V.Горохова, K.B.Андрєєва, O.O.Дави́денко

Ключові слова: бензиламід; гетарилпропанові кислоти; 4-гідроксі-2-оксо-1,2-дигідрохіноліни; синтез; анальгетична активність

Взявши за основу закономірності зв'язку «структура – анальгетична активність», що були виявлені раніше під час вивчення біологічних властивостей численних N-заміщених амідів 1-R-4-гідроксі-6,7-диметокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових кислот, ми провели цілеспрямовану хімічну модифікацію структурно близьких N-алкіл-4-гідроксі-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамідів. Здійснені зміни торкнулися виключно амідного фрагменту цих сполук і фактично представляють собою заміну одного з атомів водороду метильної групи в N-метил-4-гідроксі-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксаміді ароматичним ядром. Показано, що в синтезі цільових сполук можна використовувати різні варіанти амидування етилового естеру 4-гідроксі-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти бензиламидами: термоліз естеру та аміну без розчинника при температурі 140°C або ж взаємодію естеру з надлишком аміну у киплячому спирті. Периферичний компонент у механізмі анальгетичних властивостей N-бензил-4-гідроксі-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамідів вивчено на білих мишах на класичній моделі «оцтовокислих корчів» паралельно та у порівнянні з диклофенаком. Встановлено, що деякі із синтезованих речовин при пероральному введенні у дозі 5 мг/кг помітно перевищують за знеболюючим ефектом препарат порівняння і можуть бути рекомендовані до більш глибокого дослідження, як потенційні анальгетики.

Целенаправленный синтез биологически активных субстанций с заранее заданными свойствами базируется, как известно, на изначальном выявлении вполне конкретных закономерностей связи химического строения веществ с оказываемой ими активностью. Далее следуют их анализ и обобщение, установление наиболее важных структурных фрагментов, определяющих специфический фармакологический эффект, и, наконец, рекомендации относительно возможных направлений модификации базовой молекулы. Такой подход весьма продуктивен и широко используется многими исследовательскими коллективами, занятыми созданием новых лекарств [1-6].

В процессе поиска потенциальных анальгетиков нами ранее была изучена большая группа *N*-алкил-, арилалкил-, арил- и гетарилзамещенных 1-*R*-4-гидрокси-6,7-диметокси-2-оксо-1,2-дигидрохиолин-3-карбоксамидов. При этом удалось обнаружить, что наличие в 3-карбамидном фрагменте арилалкильных и особенно бензильных заместителей на обезболивающих свойствах отражается весьма благоприятно [7, 8]. Отсюда и возникла идея использовать данную закономерность для химической модификации структурно близких 4-гидрокси-2-оксо-1-(2-цианоэтил)-1,2-дигидрохиолин-3-карбоксамидов, тем более, что алкильные производные этого ряда в качестве пероральных анальгетиков уже показали очень высокие результаты [9, 10].

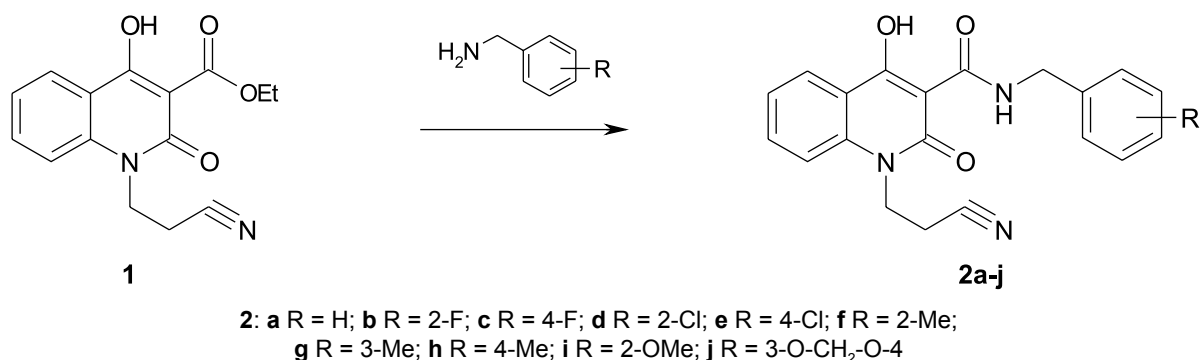
Синтез объектов исследования, т. е. *N*-бензилзамещенных 4-гидрокси-2-оксо-1-(2-цианоэтил)-1,2-дигидрохиолин-3-карбоксамидов **2a-j**, осуществлен реакцией этилового эфира **1** и соответствующих бензиламинов. Принимая во внимание тот факт, что бензиламины, как правило, имеют достаточно высокие температуры кипения, амидирование можно проводить путем термолиза эквимолярных количеств эфира и амина без растворителя при температуре 140°C (Метод А). Продолжительность реакции при этом составляет не более 5 минут, выходы конечных продуктов высокие. Следует, однако, иметь в виду, что алкил-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохиолин-3-карбоксилаты (в том числе и эфир **1**), а также их много-

численные аналоги при высоких температурах чрезвычайно чувствительны к воде и в случае ее присутствия в реакционной смеси серьезную конкуренцию амидированию начинает составлять гидролиз [11]. Во избежание этого побочного процесса перед проведением синтеза исходные реагенты – эфир **1** и амин должны быть тщательно обезвожены подходящим способом. Если же это по каким-либо причинам сделать не удастся, то синтез любого из амидов **2a-j** можно осуществить и обычным амидированием эфира **1** небольшим избытком соответствующего амина в кипящем этаноле (метод Б). Это, конечно же, сразу влечет за собой существенное увеличение продолжительности реакции (до 2-3 часов) и дополнительные расходы на растворитель и вспомогательные реагенты. Зато в таких условиях эфир **1** достаточно устойчив к гидролизу и деструкция его сложноэфирного фрагмента не наблюдается.

Отметим еще одну черту практического выполнения синтеза *N*-бензил-4-гидрокси-2-оксо-1-(2-цианоэтил)-1,2-дигидрохиолин-3-карбоксамидов **2a-j**, требующую внимания со стороны химика-синтетика, особенно при работе с маленькими количествами. В отличие от большинства других аминов бензиламины – особенно метилзамещенные или пиперониламин жадно поглощают углекислоту из воздуха, очень быстро превращаясь в инертные карбонаты. Эту особенность следует учитывать при отмеривании и загрузке в реактор таких реагентов, чтобы избежать их неоправданного перерасхода. Очень удобны в этом отношении специальные пластиковые боксы, предварительно заполненные сухим инертным газом, например, аргоном.

Независимо от того, каким способом они получены, все бензиламиды **2a-j** представляют собой белые с желтоватым оттенком кристаллические вещества с узкими интервалами температур плавления (табл. 1). При комнатной температуре они хорошо растворимы в ДМСО и ДМФА, при нагревании – в спиртах, практически нерастворимы в воде.

Все содержащие протоны функциональные группы бензиламидов **2a-j** легко подтверждаются спект-



Таблиця 1

Характеристики бензиламидов **2a-j**

Соединение	Брутто-формула	Найдено, % Вычислено, %			Т. пл., °С	Выход по методу, %
		C	H	N		
2a	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃	<u>69.22</u> 69.15	<u>5.02</u> 4.93	<u>12.21</u> 12.10	153-155	А: 94 Б: 90
2b	C ₂₀ H ₁₆ FN ₃ O ₃	<u>65.84</u> 65.75	<u>4.34</u> 4.41	<u>11.43</u> 11.50	159-161	Б: 83
2c	C ₂₀ H ₁₆ FN ₃ O ₃	<u>65.86</u> 65.75	<u>4.32</u> 4.41	<u>11.41</u> 11.50	164-166	Б: 91
2d	C ₂₀ H ₁₆ ClN ₃ O ₃	<u>62.99</u> 62.91	<u>4.33</u> 4.22	<u>10.94</u> 11.01	161-163	Б: 88
2e	C ₂₀ H ₁₆ ClN ₃ O ₃	<u>63.02</u> 62.91	<u>4.27</u> 4.22	<u>11.18</u> 11.01	156-158	Б: 96
2f	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₃	<u>69.88</u> 69.79	<u>5.42</u> 5.30	<u>11.70</u> 11.63	165-167	Б: 85
2g	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₃	<u>69.85</u> 69.79	<u>5.39</u> 5.30	<u>11.56</u> 11.63	150-152	Б: 90
2h	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₃	<u>69.69</u> 69.79	<u>5.28</u> 5.30	<u>11.57</u> 11.63	172-174	Б: 94
2i	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₄	<u>66.74</u> 66.83	<u>4.98</u> 5.07	<u>11.02</u> 11.13	199-201	Б: 83
2j	C ₂₁ H ₁₇ N ₃ O ₅	<u>64.53</u> 64.45	<u>4.46</u> 4.38	<u>10.66</u> 10.74	191-193	Б: 91

рами ЯМР ¹H (табл. 2). Как уже отмечалось нами ранее [12], сильная магнитная анизотропия со стороны группы C≡N оказывает настолько специфическое влияние на сигналы находящихся в положении 7 и 8 ароматических протонов хинолонового ядра (в отличие от соответствующих хинолинил-пропанамидов и пропановых кислот, они проявляются одним общим узким мультиплетом с интегральной интенсивностью 2H), что уже по характеру спектра в данной области можно судить о присутствии цианэтильного фрагмента в молекуле. Однако в любом случае это всего лишь косвенное подтверждение. Поэтому группа C≡N идентифицирована нами во всех бензиламидах **2a-j** уже однозначно с помощью более информативной в данном случае ИК-спектроскопии (табл. 2).

Анальгетическую активность бензиламидов **2a-j** изучали на белых нелинейных мышах весом 18-23 г (по 10 животных на каждое тестируемое вещество – уровень значимости доверительно интервала $p \leq 0,05$) на классической модели «уксуснокислых корчей» [13], используемой для исследования механизмов периферической анальгезии. «Корчи», в основе которых лежит химическое болевое раздражение, воспроизводили внутривенным введением 0,6% раствора уксусной кислоты из расчета 0,1 мл на 10 г массы животного через 1 час после перорального введения исследуемого образца бензиламидов **2a-j** и

диклофенака в дозе 5 мг/кг, соответствующей ЕД₅₀ диклофенака для данной модели [14]. За животными наблюдали 20 мин, подсчитывая количество «корчей». Анальгетическое действие оценивали по способности веществ уменьшать количество «корчей» в исследуемых группах по сравнению с контролем и выражали в процентах.

Анализ полученных экспериментальных данных (табл. 3) показывает, что замена в *N*-метил-4-гидрокси-2-оксо-1-(2-цианоэтил)-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамиде [9] одного из атомов водорода *N*-метильной группы ароматическим ядром на обезболивающих свойствах получаемых бензиламидов отражается по-разному. В одних случаях – амиды **2f**, **2i** – она остается практически на исходном уровне, в других – амиды **2d**, **2e**, **2g**, **2h** и **2j** – заметно снижается. Тем не менее, есть и положительные примеры указанной модификации, например, если незамещенный бензиламид **2a** по анальгетическому эффекту только сравним с диклофенаком, то 4-фторбензиламид **2c** уже заметно активнее референс-препарата в той же дозе.

Интересная закономерность прослеживается и в части зависимости анальгетических свойств изучаемых соединений от положения заместителей в ароматическом кольце бензильного фрагмента. Как правило, *орто*-замещенный изомер активнее своего *мета*-аналога, а тот, в свою очередь, гораздо активнее *пара*-производного. Эта

Таблица 2

ИК- и ЯМР ^1H спектры бензилами́дов **2a-j**

Соединение	ИК $\nu_{\text{C=O}}$	ЯМР ^1H : Химические сдвиги, δ , м. д. (J , Гц)							
		4-OH (1H, c)	NH-R (1H, τ)	H Ar хинолона			1-NCH ₂ CH ₂		Бензильный фрагмент
				H-5 (1H, д)	H-7 + H-8 (2H, м)	H-6 (1H, τ)	NCH ₂ (2H, τ)	NCH ₂ CH ₂ (2H, τ)	
2a	2250	17.28	10.55 ($J = 5.6$)	8.12 ($J = 7.9$)	7.77-7.72	См. Вп фрагм.	4.55 ($J = 6.9$)	2.86 ($J = 6.9$)	7.39-7.23 (6H, м, H-6 + Ph); 4.61 (2H, д, $J = 5.9$, NCH ₂ Ph)
2b	2252	17.14	10.58 ($J = 5.8$)	8.14 ($J = 8.0$)	7.81-7.76	См. Вп фрагм.	4.57 ($J = 7.0$)	2.89 ($J = 7.0$)	7.46-7.12 (5H, м, H-6 + Ar); 4.68 (2H, д, $J = 5.8$, NCH ₂ Ar)
2c	2249	17.26	10.56 ($J = 5.8$)	8.15 ($J = 8.0$)	7.80-7.76	7.36 ($J = 6.6$)	4.57 ($J = 6.9$)	2.89 ($J = 6.9$)	7.43 (2H, дд, $J = 7.6$ и 5.6 , H-2', 6'); 7.10 (2H, τ , $J = 8.8$, H-3', 5'); 4.61 (2H, д, $J = 6.0$, NCH ₂ Ar)
2d	2253	17.09	10.66 ($J = 5.5$)	8.15 ($J = 8.0$)	7.82-7.77	7.37 ($J = 6.7$)	4.59 ($J = 6.9$)	2.90 ($J = 6.9$)	7.48-7.42 (2H, м, H-3', 4'); 7.34-7.30 (2H, м, H-5', 6'); 4.71 (2H, д, $J = 6.2$, NCH ₂ Ar)
2e	2250	17.21	10.58 ($J = 5.8$)	8.15 ($J = 8.0$)	7.80-7.77	7.37 ($J = 6.6$)	4.58 ($J = 7.0$)	2.89 ($J = 7.0$)	7.41 (2H, д, $J = 8.5$, H-2', 6'); 7.32 (2H, д, $J = 8.5$, H-3', 5'); 4.62 (2H, д, $J = 6.1$, NCH ₂ Ar)
2f	2248	17.29	10.49 ($J = 5.6$)	8.15 ($J = 8.0$)	7.81-7.75	7.38 ($J = 6.6$)	4.57 ($J = 6.8$)	2.89 ($J = 6.8$)	7.31 (1H, д, $J = 6.5$, H-3'); 7.22-7.16 (3H, м, H-4', 5', 6'); 4.61 (2H, д, $J = 5.7$, NCH ₂ Ar); 2.41 (3H, c, Me)
2g	2251	17.33	10.54 ($J = 6.0$)	8.15 ($J = 8.0$)	7.79-7.76	7.37 ($J = 6.6$)	4.57 ($J = 6.9$)	2.89 ($J = 6.9$)	7.24 (1H, τ , $J = 7.4$, H-5'); 7.19 (1H, c, H-3'); 7.15 (1H, д, $J = 7.5$, H-4'); 7.08 (1H, д, $J = 7.4$, H-6'); 4.60 (2H, д, $J = 6.1$, NCH ₂ Ar); 2.37 (3H, c, Me)
2h	2253	17.31	10.50 ($J = 5.5$)	8.14 ($J = 7.9$)	7.79-7.75	7.36 ($J = 6.5$)	4.56 ($J = 6.8$)	2.88 ($J = 6.8$)	7.26 (2H, д, $J = 8.0$, H-2', 6'); 7.15 (2H, д, $J = 8.0$, H-3', 5'); 4.58 (2H, д, $J = 5.8$, NCH ₂ Ar); 2.35 (3H, c, Me)
2i	2250	17.42	10.54 ($J = 5.9$)	8.14 ($J = 8.0$)	7.79-7.75	7.36 ($J = 6.6$)	4.57 ($J = 7.0$)	2.89 ($J = 7.0$)	7.31-7.24 (2H, м, H-3', 4'); 6.99 (1H, д, $J = 8.4$, H-6'); 6.92 (1H, τ , $J = 7.7$, H-5'); 4.59 (2H, д, $J = 6.1$, NCH ₂ Ar); 3.93 (3H, c, OMe)
2j	2251	17.23	10.47 ($J = 5.8$)	8.13 ($J = 7.9$)	7.78-7.74	7.35 ($J = 6.7$)	4.55 ($J = 7.1$)	2.86 ($J = 7.1$)	6.89 (1H, c, H-2'); 6.84 (1H, д, $J = 7.9$, H-5'); 6.78 (1H, д, $J = 7.9$, H-6'); 5.97 (2H, c, OCH ₂ O); 4.49 (2H, д, $J = 5.8$, NCH ₂ Ar)

закономерность соблюдается у монохлор-, монометил- и монометоксибензилами́дов (данные по 4-метоксипроизводному см. [15]). И только в случае фторированных продуктов она меняется на противоположную, в результате чего *N*-(4-фторбензил)-4-гидрокси-2-оксо-1-(2-цианоэтил)-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамид (**2c**) оказывает самым мощным анальгетиком не только среди фторпроизводных, но и во всей группе синтезированных бензилами́дов и может быть рекомендован для дальнейшего изучения как структура-лидер.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H синтезированных соединений записаны на приборе Varian Mercury-400 (рабочая частота 400 МГц) в растворе ДМСО- d_6 , внутренний стандарт ТМС. ИК-спектры получены на Фурье-спектрометре Bruker Tensor 27 в дисках с KBr. Перед регистрацией спектров образцы тонко измельчали и высушивали под вакуумом над

Таблица 3

Анальгетическая активность бензилами́дов **2a-j** на модели «уксуснокислых корчей»

Соединение	R	Анальгетическая активность	
		среднее количество «корчей», $M \pm m$	%
2a	H	19,3 \pm 1,1	54,4
2b	2-F	33,7 \pm 1,5	20,3
2c	4-F	13,9 \pm 1,0	67,1
2d	2-Cl	35,3 \pm 1,4	16,5
2e	4-Cl	40,1 \pm 1,7	5,2
2f	2-Me	25,7 \pm 1,3	39,2
2g	3-Me	34,7 \pm 1,5	18,0
2h	4-Me	41,3 \pm 1,6	2,4
2i	2-OMe	26,2 \pm 1,2	38,1
2j	3-O-CH ₂ -O-4	42,0 \pm 1,4	1,0
Диклофенак		19,5 \pm 1,1	53,9
Контроль		42,3 \pm 1,7	-

силикагелем. Елементний аналіз виконан на мікроаналізаторі EuroVector EA-3000. Температури плавлення визначені в капілярі на цифровому аналізаторі точки плавлення SMP10 Stuart. Етил-4-гідрокси-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксилат (**1**) синтезовано по відомій методикі [11].

Н-Бензил-4-гідрокси-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід (2a). Метод А. В колбу завантажують 2,86 г (0,01 Моль) етилового ефіра 4-гідрокси-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти (**1**), після чого в течение кількох хвилин пропускають сухий аргон для витіснення повітря. Далі додають 1,10 мл (0,01 Моль) бензиламіну і утримують на металічній бані при 140°C в течение 3-5 хв. К ще гарячій реакційній масі додають 10 мл водного етанолу (осторожно, можливо вскипання!), ретельно ретирують і залишають на кілька годин для остигання до кімнатної температури. Виділений амід **2a** відфільтровують, промивають на фільтрі підкисленою НСІ водою, далі чистою водою і сушать. Кристалізують з етанолу.

Метод Б. В колбу, що містить розчин 2,86 г (0,01 Моль) етилового ефіра 4-гідрокси-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти (**1**) в 15 мл етилового спирту в течение кількох хвилин пропускають сухий ар-

гон для витіснення повітря. Далі додають 1,20 мл (0,011 Моль) бензиламіну і кип'ятять з обертовим холодильником 3 х, продовжують пропускати повільний потік аргону. Реакційну суміш охолоджують, розбавляють 100 мл холодної води і підкислюють НСІ до рН 4. Виділений осадок аміда **2a** відфільтровують, промивають холодною водою, сушать. Кристалізують з етанолу. Сумішана проба з зразком аміда **2a**, отриманим способом А, не дає депресії температури плавлення. Спектри ЯМР ¹Н цих сполучень ідентичні.

Висновки

1. Розглянуті два варіанти отримання і якості потенціальних анальгетиків здійснено ціленаправлений синтез серії нових *N*-бензил-4-гідрокси-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамідів.

2. Вивчення анальгетических властивостей синтезованих речовин показало, що введення ароматического ядра в метиламідний фрагмент може служити позитивним фактором і сприяти помітній посиленню обезболиваючої активності. По результатам проведенних експериментів для подальшого дослідження якості структури-лідера рекомендовано *N*-(4-фторбензил)-4-гідрокси-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід.

Література

1. Roouf Bhat A., Arshad M., Ju Lee E., Pokharel S., Choi I., Athar F. *Chemistry & biodiversity*, 2013, Vol. 10, No.12, pp.2267-2277.
2. Shi J.F., Wu P., Jiang Z.H., Wei X.Y. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, Vol. 71, pp.219-228.
3. Singh K.D., Muthusamy K. *Acta pharmacologica Sinica*, 2013, Vol. 34, No.12, pp.1592-606.
4. Rami C., Patel L., Patel C.N., Parmar J.P. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 2013, Vol. 5, No.4, pp.277-289.
5. Sun G.X., Sun Z.H., Yang M.Y., Liu X.H., Ma Y., Wei Y.X. *Molecules*, 2013, Vol. 18, No.12, pp.14876-14891.
6. Lim C.J., Choi J.Y., Lee B.H., Oh K.S., Yi K.Y. *Chemical & pharmaceutical bulletin (Tokyo)*, 2013, Vol. 61, No.12, pp.1239-1247.
7. Mospanova Ye.V., Ukrainets I.V., Bezv O.V., Savchenkova L.V., Yankovich S.I. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2012, Vol. 10, 2(38), pp.50-53.
8. Ukrainets I.V., Mospanova E.V., Jaradat N.A., Bezv O.V., Turov A.V. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2012, Vol. 48, No.9, pp.1347-1356.
9. Ukrainets I.V., Andreeva K.V., Gorokhova O.V., Kravchenko V.N. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2012, Vol. 48, No.12, pp.1809-1816.
10. Ukrainets I.V., Gorokhova O.V., Andreeva X.V., Sim G. *International Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, Vol. 1, No.3, pp.33-40, available at: <http://www.internationalscholarsjournals.org/journal/ijpp/articles?index=3>
11. Ukrainets I.V., Gorokhova O.V., Andreeva X.V., Golik N.Yu. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2013, Vol. 11, 3 (43), pp.32-35.
12. Ukrainets I.V., Gorokhova O.V., Andreeva X.V. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2013, Vol. 11, 4(44), pp.61-66.
13. Vogel H.G. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Berlin, Springer; 2008, pp.1030-1032.
14. Sigidin Ya.A., Shvarts G.Ya., Arzamastsev A.P., Liberman S.S. *Lekarstvennaya terapiya vospalitel'nogo protsesssa (eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya protivovospalitel'nykh preparatov) – Drug Therapy of the Anti-inflammatory Process (Experimental and Clinical Pharmacology of Anti-inflammatory Medications)*. Moscow, Meditsina, 1988, pp.60-63.
15. Ukrainets I.V., Gorokhova O.V., Andreeva K.V. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2013, Vol. 49, No.6, pp.867-871.

Надійшла до редакції 25.12.2013 р.

УДК 547.77

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 1-ФЕНИЛ-5-ХЛОРО-1Н-ПИРАЗОЛ-4-КАРБОКСАМИДА И 1-ФЕНИЛ-N-ФОРМИЛ-5-ХЛОРО-1Н-ПИРАЗОЛ-4-КАРБОКСАМИДА С ГИДРАЗИНГИДРАТОМ

А.О.Гуренко, Б.М.Хутова, С.В.Ключко, А.Н.Василенко, В.С.Броварец

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
02660, г. Киев, ул. Мурманская, 1. E-mail: brovarets@bpci.kiev.ua*Ключевые слова:* пиразол; пиразол-4-карбоксамид; пиразол-4-карбогидразид; гидразингидрат

Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия 1-фенил-5-хлор-1Н-пиразол-4-карбоксамид и 1-фенил-N-формил-5-хлор-1Н-пиразол-4-карбоксамид с гидразингидратом с целью получения производных пиразола как потенциальных биоактивных веществ. Нами найдено, что при непродолжительном (~40 мин) кипячении 1-фенил-5-хлор-1Н-пиразол-4-карбоксамид с гидразингидратом образуется с выходом 50% неизвестный ранее 5-гидразинил-1-фенил-1Н-пиразол-4-карбогидразид. Дальнейшее (~15 ч) кипячение полученного продукта с гидразингидратом неожиданно приводит к 1-фенил-1Н-пиразол-4-карбогидразиду. Рассмотрен вероятный механизм его получения, который включает в себя димеризацию образующегося прототропного изомера с одновременным отщеплением молекулы гидразина и последующим элиминированием молекулы азота. 1-Фенил-N-формил-5-хлор-1Н-пиразол-4-карбоксамид с гидразингидратом при кипячении в течение 3 ч даёт 5-амино-1-фенил-1Н-пиразол-4-карбогидразид. Сначала, очевидно, образуется N-[(5-гидразинил-1-фенил-1Н-пиразол-4-ил)карбонил]формамид, который циклизуется в пиразоло[3,4-d][1,2,3]триазин-4-он. Последний при нагревании элиминирует молекулу азота с образованием реакционноспособного 4-карбонил-1-фенил-4,5-дигидро-1Н-пиразол-5-имина, присоединение к нему гидразина приводит к 5-амино-1-фенил-1Н-пиразол-4-карбогидразиду. Состав всех синтезированных веществ доказан элементным анализом, а строение подтверждено при помощи спектральных методов.

INTERACTION OF 5-CHLORO-1-PHENYL-1H-PYRAZOLE-4-CARBOXAMIDE AND 5-CHLORO-N-FORMYL-1-PHENYL-1H-PYRAZOLE-4-CARBOXAMIDE WITH HYDRAZINE HYDRATE

A. O. Gurenko, B. M. Khytova, S. V. Klyuchko, O. M. Vasilenko, V. S. Brovarets

Key words: pyrazole; pyrazole-4-carboxamide; pyrazole-4-carbohydrazide; hydrazine hydrate

This article represents the research of the interaction of 1-phenyl-5-chloro-1H-pyrazole-4-carboxamide and 1-phenyl-N-formyl-5-chloro-1H-pyrazole-4-carboxamide with hydrazine hydrate in order to get pyrazole derivatives as potential bioactive substances. It has been found that during the short (~40 min) boiling of 1-phenyl-5-chloro-1H-pyrazole-4-carboxamide with hydrazine hydrate a previously unknown 5-hydrazino-1-phenyl-1H-pyrazole-4-carbohydrazide with the yield of 50% is formed. The further boiling (~15 h) of the product obtained with hydrazine hydrate leads unexpectedly to 1-phenyl-1H-pyrazole-4-carbohydrazide. The probable mechanism of its obtaining, which includes dimerization of the prototropic isomer formed while cleaving the hydrazine molecule and the further elimination of the nitrogen molecule, has been considered. When boiling with hydrazine hydrate for 3 hours 1-Phenyl-N-formyl-5-chloro-1H-pyrazole-4-carboxamide gives 5-amino-1-phenyl-1H-pyrazole-4-carbohydrazide. At first, obviously, N-[(5-hydrazino-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl) carbonyl]formamide is formed with further cyclization into pyrazolo[3,4-d][1,2,3]triazin-4-one. The latter eliminates the nitrogen molecule when heating with the formation of the reactive 4-carbonyl-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-5-imine. Addition of hydrazine to it leads to 5-amino-1-phenyl-1H-pyrazole-4-carbohydrazide. The composition of all compounds synthesized has been proven by elemental analysis and the structure has been confirmed by spectroscopic methods.

ВЗАЄМОДІЯ 1-ФЕНІЛ-5-ХЛОРО-1Н-ПІРАЗОЛ-4-КАРБОКСАМІДУ І 1-ФЕНІЛ-N-ФОРМІЛ-5-ХЛОРО-1Н-ПІРАЗОЛ-4-КАРБОКСАМІДУ З ГІДРАЗИНГІДРАТОМ

А.О.Гуренко, Б.М.Хутова, С.В.Ключко, О.М.Василенко, В.С.Броварець

Ключові слова: піразол; піразол-4-карбоксамід; піразол-4-карбогидразид; гидразингидрат

Робота присвячена дослідженню взаємодії 1-феніл-5-хлоро-1Н-піразол-4-карбоксаміду та 1-феніл-N-форміл-5-хлоро-1Н-піразол-4-карбоксаміду з гидразингидратом з метою одержання похідних піразолу як потенційних біоактивних речовин. Нами знайдено, що при нетривалому (~40 хв) кип'ятінні 1-феніл-5-хлоро-1Н-піразол-4-карбоксаміду з гидразингидратом утворюється з виходом 50% невідомий раніше 5-гидразиніл-1-феніл-1Н-піразол-4-карбогидразид. Подальше (~15 год) кип'ятіння отриманого продукту з гидразингидратом несподівано призводить до 1-феніл-1Н-піразол-4-карбогидразиду. Розглянуто ймовірний механізм його отримання, який включає в себе димеризацію прототропного ізомера, що утворюється, з одночасним відщепленням молекули гидразину і наступним елімінуванням молекули азоту. 1-Феніл-N-форміл-5-хлоро-1Н-піразол-4-карбоксамід з гидразингидратом при кип'ятінні протягом 3 год дає 5-аміно-1-феніл-1Н-піразол-4-карбогидразид. Спочатку, очевидно, утворюється N-[(5-гидразиніл-1-феніл-1Н-піразол-4-іл)карбоніл]формамід, який циклізується в піразоло[3,4-d][1,2,3]триазин-4-он. Останній при нагріванні елімінує молекулу азоту з утворенням реакційноздатного 4-карбоніл-1-феніл-4,5-дигідро-1Н-піразол-5-іміну, приєднання до нього гидразину призводить до 5-аміно-1-феніл-1Н-піразол-4-карбогидразиду. Склад усіх синтезованих речовин доведений елементним аналізом, а будова підтверджена за допомогою спектральних методів.

Недавно [1] нами найдено, что при взаимодействии 7-фенил-3*H*,4*H*,7*H*-пиразоло-[3,4-*d*][1,2,3] триазин-4-она **1** с тионилхлоридом в присутствии диметилформаида образуется 1-фенил-*N*-формил-5-хлор-1*H*-пиразол-4-карбоксамид **2**, который в результате гидролиза был превращён в 1-фенил-5-хлор-1*H*-пиразол-4-карбоксамид **3** (схема 1).

Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия 5-хлорпиразолов **2** и **3** с гидразингидратом с целью получения новых производных пиразола как потенциальных биоактивных веществ [2-12].

Нами установлено, что при непродолжительном (~40 мин) кипячении 1-фенил-5-хлор-1*H*-пиразол-4-карбоксамид **3** с гидразингидратом образуется с выходом 50% неизвестный ранее 5-гидразинил-1-фенил-1*H*-пиразол-4-карбогидразид **4** (схема 2). Состав и строение его подтверждено результатами элементного анализа, спектрами ЯМР ¹H и ИК. В частности, спектр ЯМР ¹H характеризуется синглетным сигналом протона С-3 пиразольного фрагмента при 7,92 м. д., а также уширенным сигналом двух NH₂ групп при 4,30 м. д. Сигнал протона фрагмента С(О)NHNH₂ находится при 9,54 м. д., а NHNH₂ попадает в область сигналов протонов фенильного кольца. В ИК-спектре полоса при 1658 см⁻¹ соответствует валентным колебаниям С=О группы, а полосы при 3164-3370 см⁻¹ – двум NHNH₂ фрагментам.

Дальнейшее (~15 ч) кипячение продукта **4** с гидразингидратом неожиданно приводит к 5-незамещенному пиразолу **5**. Образование 1-фенил-1*H*-пиразол-4-карбогидразид **5** можно предста-

вить через прототропный изомер **A**, его димеризацию **2A**→**B** с отщеплением гидразина и дальнейшее элиминирование молекулы азота, приводящее к пиразолу **5** (схема 3). Подобное разложение гидразонов ароматических структур под действием гидразингидрата описано в литературе [13].

1-Фенил-1*H*-пиразол-4-карбогидразид **5** упоминается в работах [14, 15] как прекурсор в синтезе биологически активных соединений. Однако метод его синтеза и константы в литературе не описаны. Поэтому для однозначного доказательства строения соединения **5** проведен комплексный ЯМР анализ (NOESY, COSY, HSQC, HMBC). Результаты отнесения сигналов ¹H и ¹³C представлены на рисунке, а полный перечень найденных корреляций в таблице. Наличие кросс-пиков в спектрах NOESY 8,86↔7,82, COSY 8,86↔8,07, а также в спектрах HMBC 8,07→118,97; 8,86→118,97; 8,86→139,77 и 7,49→139,77 подтверждают предложенную структуру соединения **5**.

Следующим этапом нашей работы было исследование взаимодействия 1-фенил-*N*-формил-5-хлор-1*H*-пиразол-4-карбоксамид **2** с гидразингидратом. Оказалось, что при кипячении указанных реагентов в течение 3 ч основным продуктом реакции является 5-амино-1-фенил-1*H*-пиразол-4-карбогидразид **6**, полученный ранее другими способами [16-18]. На схеме 4 представлен вероятный механизм образования соединения **6**. Взаимодействие 5-хлорпиразола **2** с гидразингидратом приводит сначала к *N*-[(5-гидразинил-1-фенил-1*H*-пиразол-4-ил)карбонил]формаиду **C**, который циклизуется в пиразоло-[3,4-*d*][1,2,3]три-

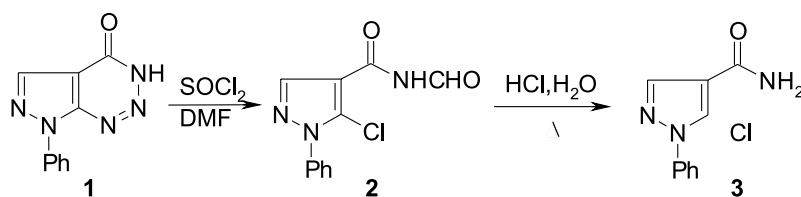


Схема 1

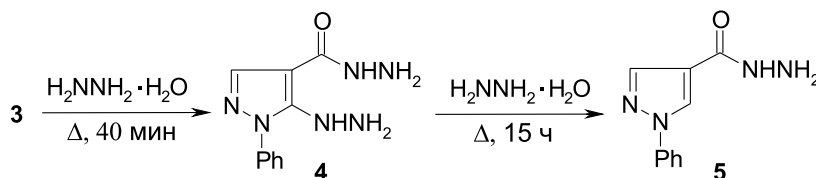


Схема 2

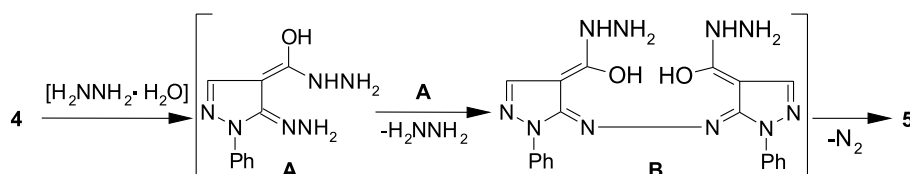


Схема 3

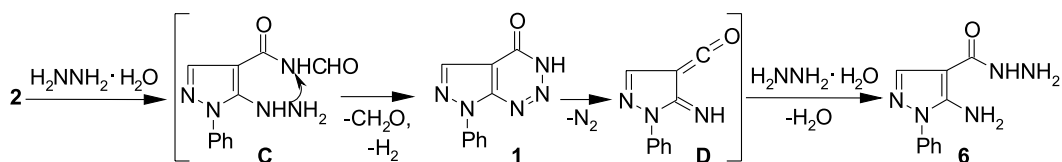


Схема 4

Таблица

Перечень корреляций, найденных в спектрах COSY, NOESY, HSQC, HMBC соединения 5*

$^1\text{H}, \delta$	$^1\text{H}, \delta$		$^{13}\text{C}, \delta$	
	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
9,69	-	-	-	-
8,86	8,07	7,82	128,69	118,97, 139,77
8,07	8,86	-	140,48	118,97
7,82	7,49	7,49, 8,86	119,08	126,94, 119,08
7,49	7,82, 7,32	7,82, 7,32	129,69	129,69, 139,77
7,32	7,49	7,49	126,94	119,08

* Отнесения сигналов см. на рис.

азин-4-он **1**. Последний при нагревании элиминирует молекулу азота с получением реакционноспособного 4-карбонил-1-фенил-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-5-имина **D**, присоединяющего молекулу гидразина, что приводит к соединению **6** (схема 4). Возможность образования промежуточного продукта **D** описана нами ранее [19].

Соединение **6** также было получено нами с выходом 56% нагреванием 7-фенил-3*H*,4*H*,7*H*-пиразоло[3,4-*d*][1,2,3]триазин-4-она **1** с гидразингидратом.

Экспериментальная часть

ИК-спектры зарегистрированы на спектрометре Vertex 70 в таблетках KBr. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C записаны на приборе Bruker Avance DRX-500 (500 и 125 МГц соответственно) в растворе $\text{DMSO-}d_6$, стандарт ТМС. Элементный анализ проведен в аналитической лаборатории Института биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины. Температуры плавления определены на приборе Fisher-Johns. Контроль за ходом реакций и чистотой синтезированных соединений осуществлён методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системе CHCl_3 -MeOH, 10:2.

Спектральные характеристики соединения **6** соответствуют литературным [17].

5-Гидразинил-1-фенил-1*H*-пиразол-4-карбогидразид (4). Смесь 5 ммоль соединения **3** кипятили с 50 ммоль 98% гидразингидрата в течение 40 мин, смесь оставляли на 12 ч при 20°C, выпавший осадок отфильтровывали и очищали перекристаллизацией из ацетонитрила. Выход –

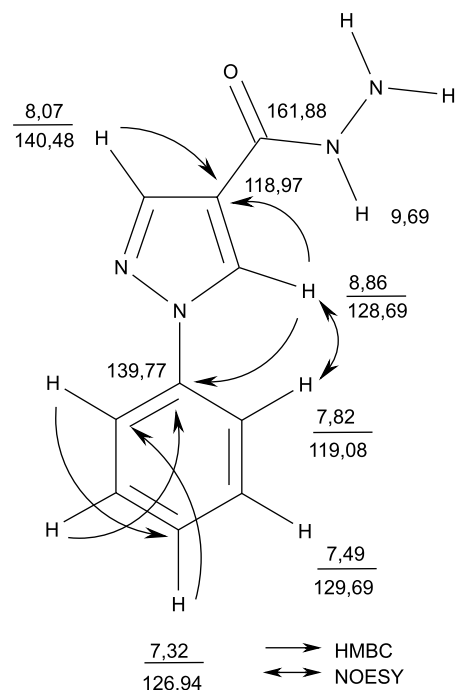


Рис. Основные корреляции и отнесения сигналов (м.д.) в спектрах ^1H и ^{13}C соединения **5**.

50%. Т. пл. – 148-150°C. ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 3370, 3277, 3164 (NHNH_2); 1658 (C=O); 1572, 1493, 1283, 925. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д.: 4,30 ш. с (4*H*, 2 NHNH_2); 7,34-7,55 м (6*H*, 5*H* Ph, 1*H* NHNH_2); 7,92 с (1*H*, *H*-3); 9,54 с (1*H*, C(O)NHNH_2). Найдено, %: C 51,98; H 5,26; N 36,03. $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}$. Вычислено, %: C 51,71; H 5,21; N 36,19.

1-Фенил-1*H*-пиразол-4-карбогидразид (5)

Смесь 5 ммоль соединения **4** кипятили с 50 ммоль 98% гидразингидрата в течение 15 ч, смесь оставляли на 12 ч при 20°C, выпавший осадок отфильтровывали, промывали 10 мл H_2O , высушивали в вакуум-эксикаторе над пентаоксидом фосфора и очищали перекристаллизацией из бензола. Выход – 30%. Т. пл. – 175-178°C. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д.: 4,23 ш. с (2*H*, NHNH_2); 7,32-7,82 м (5*H*, Ph); 8,07 с (1*H*, *H*-3); 8,86 с (1*H*, *H*-5); 9,69 с (1*H*, NHNH_2). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 118,97 (C-4 пиразол); 119,08, 126,94, 129,69, 139,77 (C Ph); 128,69 (C-5 пиразол); 140,48 (C-3 пиразол); 161,88 (C=O). Найдено, %: C 59,66; H 5,03; N 27,40. $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$. Вычислено, %: C 59,38; H 4,99; N 27,43.

5-Амино-1-фенил-1*H*-пиразол-4-карбогидразид (6). Смесь 5 ммоль соединения **2** кипятили с 50 ммоль 98% гидразингидрата в течение 3 ч, смесь оставляли на 12 ч при 20°C, выпавший осадок фильтровали, промывали 10 мл H_2O , сушили

в вакуум-ексикаторе над пентаоксидом фосфора і очищали перекристалізацією із ацетонітрила. Вихід – 62%. Т. пл. – 185-186°C (Т. пл. – 186-187°C [16], 183°C [17], 183-184°C [18]). Это же соединение с выходом 56% было получено кипячением 5 ммоль пиразолотриазина **1** с 5 мл 98% гидразингидрата в течение 30 мин.

Литература

1. Khytova B. M., Klyuchko S. V., Gurenko A. O. et al. *Khimija geterociklicheskih soedinemij* – Chem. Heterocycl. compd., 2013, No.6, pp.987-998.
2. Vovk M. V., Bratenko M. K., Chornous V. A. 4-Funkcionalizirovannye pirazoly (4-functionalized pyrazoles), Chernovcy, Prut, 2008, 278 p.
3. Bezuglyj P. O. *Farmaceuticheskaja khimija* – Pharmaceutical chemistry, Vinnica, Novaja kniga, 2006, 315 p.
4. Hall A., Billinton A., Bristow A. K. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, Vol. 18, pp.4027-4032.
5. Rapposelli S., Lapucci A., Minutolo F. et al. *IL Farmaco*, 2004, Vol. 59, pp.25-31.
6. Varnes J. G., Wacker D. A., Jacobson I. C. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, Vol. 17, pp.6481-6488.
7. Bekhit A. A., Ashour H. M., Abdel Ghany Y. S. et al. *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, Vol. 43, pp.456-463.
8. Padmaja A., Payani T., Reddy G. D., Padmavathi V. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, Vol. 44, pp.4557-4566.
9. Ragavan R. V., Vijayakumar V., Kumari N. S. *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, Vol. 45, pp.1173-1180.
10. Riyadh S. M., Farghaly T. A., Abdallah M. A. et al. *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, Vol. 45, pp.1042-1050.
11. El-borai M. A., Rizk H. F., Abd-Aal M. F., El-Deeb I. Y. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, Vol. 48, pp.92-96.
12. Vujasinovic I., Paravic-Radicevic A., Mlinaric-Majerski K. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, Vol. 20, pp.2101-2110.
13. Staudinger H., Kupfer O. *Chem. Ber.*, 1911, Bd. 44, pp.2197-2212.
14. Hernandez P., Cabrera M., Lavaggi M. L. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, Vol. 20, pp.2158-2171.
15. Hernandez P., Rojas R., Gilman R. H. et al. *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, Vol. 59, pp.64-74.
16. Dornow A., Hinz E. *Chem. Ber.*, 1958, Bd. 91, pp.1834-1840.
17. Wamhoff H., Ertas M., Atta S. M. S. *Liebigs Ann. Chem.*, 1985, No.9, pp.1910-1916.
18. Li J.-F., Zhu Y.-Q., Wang X., Yang H.-Z. *J. Heterocycl. Chem.*, 2007, Vol. 44, pp.749-755.
19. Khytova B. M., Klyuchko S. V., Gurenko A. O., Vasilenko A. N., Balja A.G., Rusanov Eh. B., Brovarets V. S. *Khimija geterociklicheskih soedinemij* – Chem. Heterocycl. compd., 2012, No.8, pp.1344-1355.

Надійшла до редакції 13.09.2013 р.

Выводы

Исследовано взаимодействие 1-фенил-5-хлор-1H-пиразол-4-карбоксамиды и его N-формильного аналога с гидразингидратом. При этом образуются 1-фенил-1H-пиразол-4-карбогидразид и 5-амино-1-фенил-1H-пиразол-4-карбогидразид соответственно.

МОДЕЛЮВАННЯ 3D ФАРМАКОФОРІВ У МОЛЕКУЛАХ ПОХІДНИХ 5,7-ДИМЕТИЛ-6-ФЕНІЛАЗО-3Н-ТІАЗОЛО[4,5-*b*]ПІРИДИН-2-ОНУ

О.В.Кленіна, Т.І.Чабан, В.В.Огурцов, І.Г.Чабан, І.Я.Голос

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69. E-mail: olena_klenina@yahoo.com

Ключові слова: тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-они; фармакофори; віртуальний скринінг; докінг; докінгові «відбитки пальців»

Проведені докінгові дослідження з метою встановлення можливості інгібування похідними 5,7-диметил-6-фенілазо-3Н-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону активності ферментів, задіяних у різних стадіях циклооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти: двох ізоформ циклооксигенази (COX-1 і COX-2) та мікросомної простанландин Е синтази-1 (mPGES-1). Було проведено моделювання 3D фармакофорів у молекулах досліджуваних сполук із використанням методології «відбитків пальців» взаємодій між рецептором та лігандом (Protein-Ligand Interaction Fingerprints – PLIF). Встановлені типи і локалізація взаємодій у комплексах синтезованих сполук із зазначеними рецепторами дозволили побудувати три- та двоцентрові 3D моделі фармакофорів у молекулах цих речовин, які поєднують стеричні та електронні властивості їх структур, необхідні для забезпечення оптимального зв'язування з біологічними мішенями. Аналіз одержаних фармакофорних моделей вказує на функціональність конденсованого біциклічного тіазолопіридинового скафолда, яка забезпечується стеричним розміщенням атомів хоча б одного з цих гетероциклів у відповідних фармакофорних центрах. Конденсовану тіазолопіридинову гетероциклічну систему можна розглядати як перспективний скафолд для створення комбінаторних бібліотек потенційних біологічно активних речовин, що підтверджується результатами проведених процедур віртуального скринінгу та моделювання фармакофорних центрів у молекулах похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону.

3D PHARMACOPHORE MODELING IN THE MOLECULES OF 5,7-DIMETHYL-6-PHENYLAZO-3H-THIAZOLO[4,5-*b*]PYRIDINE-2-ONE DERIVATIVES

O.V.Klenina, T.I.Chaban, V.V.Ogurtsov, I.G.Chaban, I.Ya.Golos

Key words: thiazolo[4,5-*b*]pyridines; pharmacophores; virtual screening; docking; protein-ligand interaction fingerprints
Flexible molecular docking studies for 5,7-dimethyl-6-phenylazo-3H-thiazolo[4,5-*b*]pyridin-2-ones have been performed with the purpose to reveal their potency as enzymes involved in the arachidonic acid (AA) cascade inhibitors: both cyclooxygenase isoforms (COX-1 and COX-2), and microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1). The protein-ligand interaction fingerprint (PLIF) tool implemented in MOE software has been used for summarizing the interactions between ligands and the abovementioned enzymes. Receptor interaction fingerprints have been generated from the docked poses of the virtual screening hits with COX-1,2 and mPGES-1 active sites coordinates. 3D pharmacophore models containing two and three points queries as the combination of their structures steric and electronic parameters have been generated and it provides the affinity and inhibitory activity of the novel compounds towards multiply receptors. The analysis of the pharmacophore models obtained indicates the functionality of fused bicyclic thiazolopyridine scaffold which provides the steric placement of at least one of these heterocycles atoms in the respective pharmacophore centres. The fused thiazolo[4,5-*b*]pyridine-2-one system may be considered as a promising scaffold for creating diverse combinatorial libraries of potential biologically active substances. The final conclusion has been confirmed by the results of the virtual screening procedures and pharmacophore centres modeling in molecules of novel thiazolo[4,5-*b*]pyridine-2-one.

МОДЕЛИРОВАНИЕ 3D ФАРМАКОФОРОВ В МОЛЕКУЛАХ ПРОИЗВОДНЫХ 5,7-ДИМЕТИЛ-6-ФЕНИЛАЗО-3Н-ТІАЗОЛО[4,5-*b*]ПІРИДИН-2-ОНА

Е.В.Кленіна, Т.І.Чабан, В.В.Огурцов, І.Г.Чабан, І.Я.Голос

Ключевые слова: тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-они; фармакофори; віртуальний скринінг; докінг; докінгові «отпечатки пальцев»

Проведены докинговые исследования, целью которых было установить возможность ингибирования производными 5,7-диметил-6-фенилазо-3Н-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-она активності ферментов, которые являются катализаторами разных стадий циклооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты: обеих изоформ циклооксигеназы (COX-1, COX-2) и микросомной простанландин Е синтазы-1 (mPGES-1). Осуществлено моделирование 3D фармакофоров в молекулах исследуемых соединений с использованием методологии «отпечатков пальцев» взаимодействия между рецептором и лигандом (Protein-Ligand Interaction Fingerprints – PLIF). Выявленные типы и локализация взаимодействий в комплексах синтезованных соединений с указанными рецепторами позволили построить трех- и двухцентровые 3D модели фармакофоров в молекулах этих веществ, которые объединяют стерические и электронные свойства их структур, необходимые для реализации оптимального связывания с биологическими мишенями. Анализ полученных фармакофорных моделей указывает на функциональность конденсированного бициклического скафолда, которая обеспечивается стерическим расположением атомов по меньшей мере одного из указанных гетероциклов в соответствующих фармакофорных центрах. Конденсированную тіазолопіридиновую гетероциклическую систему можно рассматривать как перспективный скафолд для создания комбинаторных библиотек потенциально биологически активных веществ, подтверждением чему являются результаты проведенных процедур виртуального скрининга и моделирования фармакофорных центров в молекулах производных тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону.

Сучасні методи комп'ютерного молекулярного моделювання є невід'ємною частиною фундаментальних досліджень, спрямованих на вивчення молекулярних механізмів функціонування біологічних наносистем, прикладним аспектом яких є використання встановлених закономірностей у раціональному дизайні нових лікарських засобів. Основними напрямками *in silico* досліджень, які на теперішній час широко використовуються у драг-дизайні, є оптимізація структури «сполуки-лідера», віртуальний скринінг, який дозволяє визначити афінитет сполук до певної біологічної мішені та здійснити відбір сполук, для яких спостерігатиметься певний вид біологічної активності, моделювання зв'язування ліганд-мішень, при якому враховується специфічність взаємодії низькомолекулярної хімічної сполуки із відповідною мішенню [1, 2].

Конденсовані гетероциклічні системи та їх похідні є перспективними «структурними блоками» в комбінаторному синтезі нових біологічно активних речовин. Зокрема, тіазоло[4,5-*b*]піридини як біоізостери пурину є важливим типом гетероциклічних систем, інтенсивне дослідження яких зумовлене як широким діапазоном їх біологічної активності [3-12], так і синтетичними можливостями для функціоналізації похідних за різними положеннями базового циклу.

Об'єктами досліджень у даній роботі було 36 похідних 5,7-диметил-6-фенілазо-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридину [3, 7, 13], модифікованих за третім положенням тіазолідинового циклу (рис. 1).

Згідно з результатами фармакологічного скринінгу антиексудативної активності синтезованих речовин [14] для значної частини сполук зазначений ефект є еквівалентним ефекту еталонних лікарських засобів – вольтарену, бутадіону та ібупрофену. Зокрема було встановлено, що показник пригнічення запальної реакції сполуками **4-7**, **21**, **25**, **26**, **32-34** коливається в межах 40-50%. Протизапальна активність ряду синтезованих сполук є нижчою порівняно з еталонними препаратами з показниками пригнічення запальної реакції в межах 12-39%. Проте антиексудативна активність низки речовин (сполуки **1-3**, **29**, **35-37**) перевищує 50% (рис. 2).

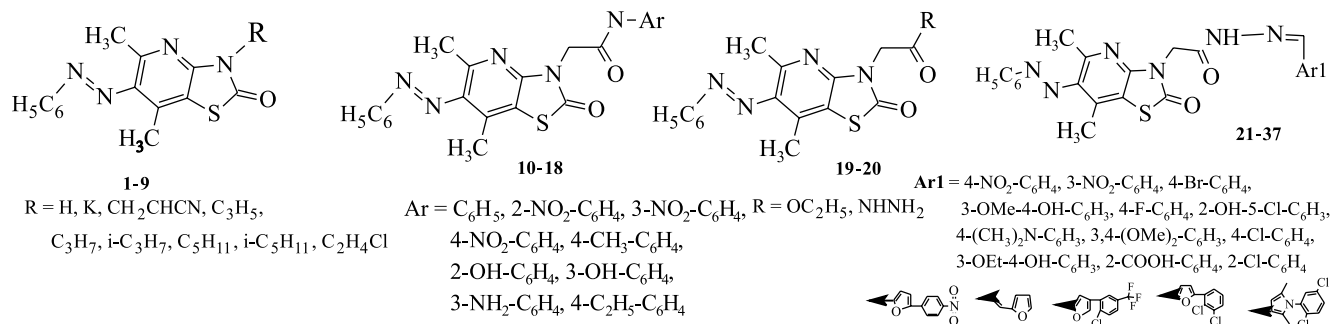


Рис. 1. Структури похідних тіазоло[4,5-*b*]піридину.

Метою даної роботи було дослідження механізмів дії синтезованих речовин на клітинному та субклітинному рівнях із використанням методів віртуального скринінгу з подальшим виявленням фармакофорних центрів у їх молекулах та побудова 3*D* моделей фармакофорів, що забезпечують зв'язування лігандів із біологічними мішенями.

1. Докінгові дослідження

Встановлення можливості пригнічення синтезу простагландинів похідними 5,7-диметил-6-фенілазо-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону шляхом інгібування ними активності ферментів, задіяних у різних стадіях циклооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти: COX-1, COX-2 і mPGES-1 [15-20] було здійснено з використанням програмного пакету Molecular Operating Environment (MOE) [21]. Для докінгових досліджень були використані кристалографічні структурні моделі з високою роздільною здатністю з Protein Data Bank: COX-1 у комплексі з α -метил-4-дифенілацетатною кислотою (pdb code 1Q4G) [22], COX-2, співкристалізованої з напроксеном (pdb code 3NT1) [23] та mPGES-1 у комплексі з глутатионом (pdb code 4AL0) [24].

Перед початком проведення процедури докінгу для 36 синтезованих сполук було створено базу конформерів за допомогою систематичного конформаційного пошуку, який дозволяє встановлювати координати атомів практично в усіх локальних мінімумах на поверхні потенціальної енергії молекул. Застосування процедури систематичного конформаційного пошуку також є виправдане з огляду на те, що базова гетероциклічна система синтезованих сполук є жорсткою, а кількість дигідральні кути, величини яких можуть змінюватися, залежить виключно від природи заміників в 3-му положенні тіазолопіридинового ядра. Мінімізація енергії всіх отриманих конформерів здійснювалась з використанням силового поля MMFF94x і зупинялася при досягненні коренем середньоквадратичного градієнта (RMS gradient) значення, меншого від 0,01 при встановленій кількості проведених ітерацій не більше 200. Конформери, значення енергії яких перевищувало міні-

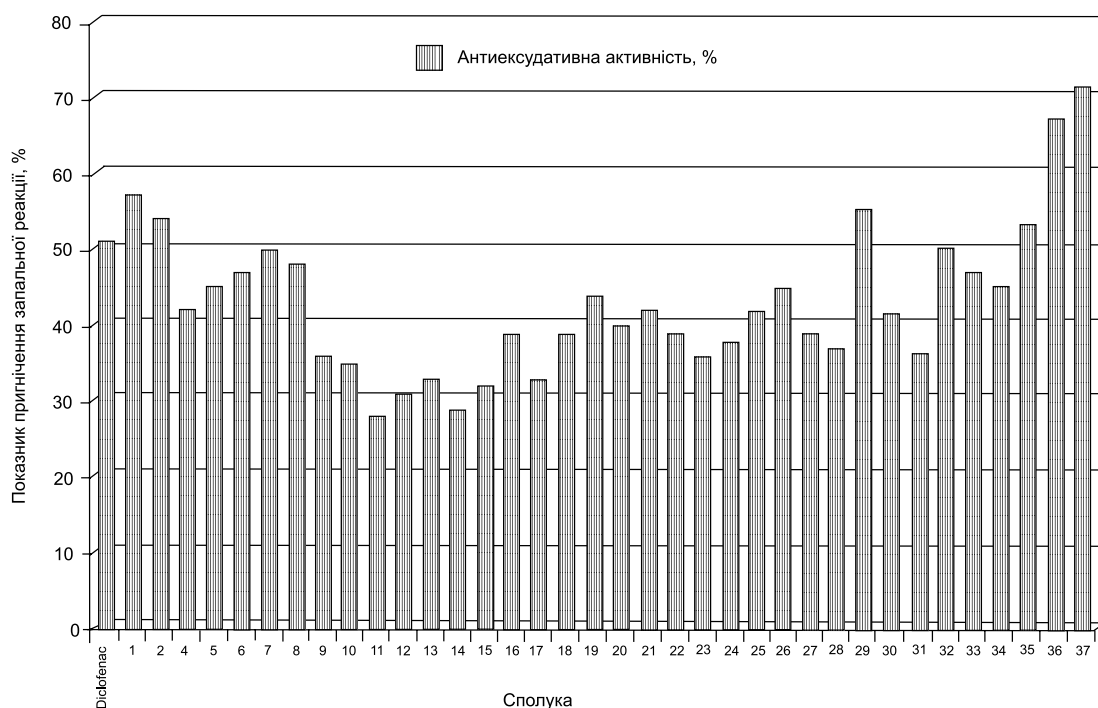


Рис. 2. Результати вивчення антиексудативної активності синтезованих сполук.

мальне знайдене значення енергії для даної сполуки більше, ніж на 7 ккал/моль, виключалися з бази як енергетично не вигідні. Таким чином було сформовано базу з 2545 конформерів для 36 досліджуваних сполук.

Попередня оптимізація структури рецепторів включала обчислення часткових зарядів на атомах та процедуру 3D протонування при $\text{pH}=7,4$, метою якої є встановлення та виправлення стану іонізації кислотних і основних функціональних груп у складі залишків певних амінокислот, а також положення атомів Гідрогену у структурі макромолекули пептиду. Після цього було проведено остаточну градієнтну мінімізацію енергії із накладанням силового поля AMBER99 до досягнення RMS градієнтом значення 0,01.

Було проведено процедуру гнучкого молекулярного докінгу одержаної бази конформерів лігандів до зазначених рецепторів, яка передбачає можливість конфірмаційних змін у структурах амінокислотних залишків в активних центрах рецепторів. За результатами проведеного молекулярного докінгу були обчислені величини чотирьох

скорингових функцій (Affinity dG, Alpha HB, London dG GBVI/WSA dG), величини яких дозволяють оцінювати стійкість комплексів, утворених між лігандами та відповідними рецепторами, і прогнозувати здатність синтезованих речовин інгібувати каталітичну активність ферментів.

Значення розрахованих скорингових функцій для комплексів, утворених молекулами синтезованих речовин та рецепторами COX-1 і COX-2, свідчать про можливість прояву синтезованими речовинами інгібіторної активності відносно обох ізоформ циклооксигенази, яка проявляється не-селективно. Слід зазначити, що величини скорингової функції London dG (рис. 3), що визначають вільну енергію зв'язування, мають загалом вищі абсолютні значення у випадку комплексів досліджуваних речовин з COX-2, що свідчить про вищу термодинамічну ймовірність прояву інгібіторної активності досліджуваних речовин по відношенню саме до цієї ізоформи COX.

Співставлення величин скорингової функції London dG та антиексудативної активності синтезованих сполук дозволило встановити, що для

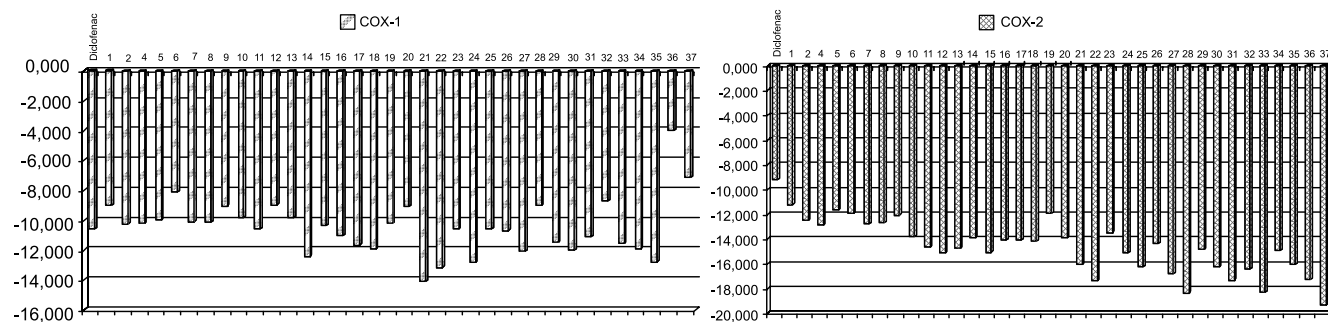


Рис. 3. Величини скорингової функції London dG для комплексів, утворених молекулами синтезованих речовин з COX-1 і COX-2.

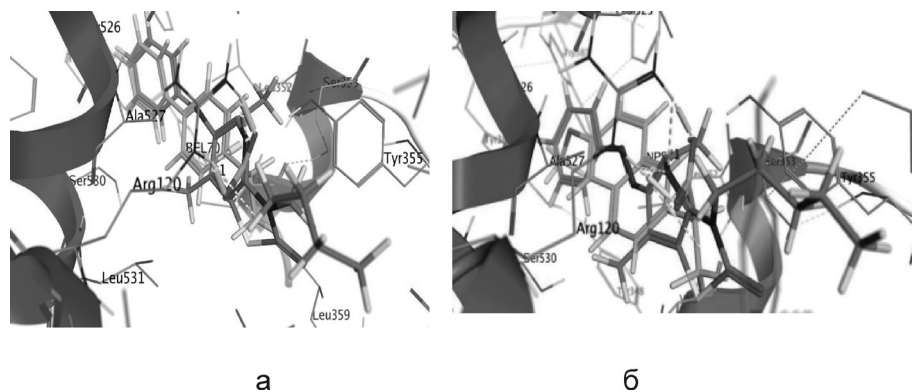


Рис. 4. Суперпозиція 2-(1,1'-дифеніл-4-іл)пропіонової кислоти (зелена) та сполуки 7 (бузкова) в активному центрі COX-1 (а); суперпозиція напроксену (зелений) та сполуки 7 (бузкова) в активному центрі COX-2 (б).

високоактивних речовин, показники пригнічення запальної реакції для яких перевищують 50%, спостерігається кореляція між експериментальною та розрахованою активністю із значеннями коефіцієнтів парної кореляції 0,70 і 0,59 для COX-1 і COX-2, відповідно.

Аналіз геометричного розташування молекул синтезованих речовин в активних центрах COX-1 і COX-2, типів зв'язування та залишків амінокислот бічних ланцюгів макромолекул пептидів, які утворюють зв'язки з лігандами, дозволяє встановити, що молекули всіх досліджуваних речовин утворюють комплекси з обома ізоформами COX за рахунок одного або декількох водневих зв'язків між Arg120 і Tyr355 та атомами молекул лігандів, що є Н-акцепторами (донорами електронної пари), причому у переважній більшості випадків одним із таких атомів є атом Нітрогену піридинового гетероциклу, хоча для декількох сполук утворення такого зв'язку відбувається за рахунок атомів Нітрогену фенілазогрупи або атомів Оксигену тіазолідинового гетероциклу і ацетамідного фрагмента (рис. 4). У комплексах, утворених молекулами синтезованих речовин з COX-2, спостерігається збільшення кількості взаємодій

різних типів, зокрема утворення π -катионної взаємодії Arg120 з тіазолідиновим гетероциклом.

Таким чином, результати проведеного гнучкого молекулярного докінгу похідних тіазолопіридину до COX-1 і COX-2 свідчать про можливість утворення між ними стійких комплексів, у яких розміщення лігандів в активному центрі рецептора та залишки амінокислот бічних ланцюгів, що беруть участь в утворенні нековалентних зв'язків, є аналогічними по геометрії та типах зв'язування класичних нестероїдних протизапальних засобів.

Величини скорингових функцій, обчислені в результаті проведення молекулярного докінгу похідних тіазолопіридину до mPGES-1 (рис. 5а), також свідчать про термодинамічну ймовірність та енергетичну сприятливість утворення комплексів між молекулами досліджуваних речовин та зазначеним рецептором.

При аналізі типів зв'язування та залишків амінокислот активного центру mPGES-1, які утворюють зв'язки з лігандами, особливу увагу було приділено Arg126 і Ser127, які, ймовірно, беруть участь у механізмі каталітичної ізомеризації PGH2 до PGE2. Переважна більшість синтезованих спо-

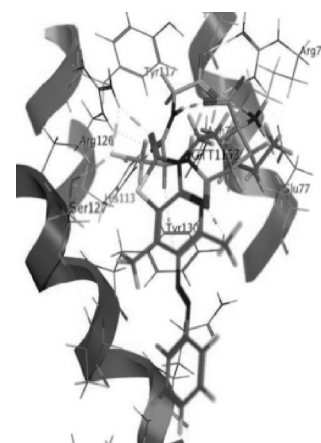
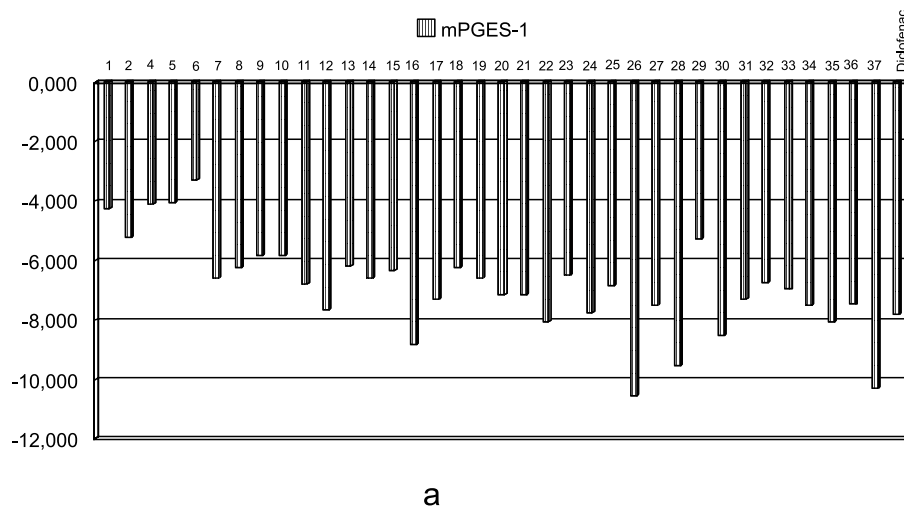


Рис. 5. Величини скорингової функції London dG для комплексів, утворених молекулами синтезованих речовин з mPGES-1 (а); суперпозиція глутатіону (зелений) та сполуки 7 (бузкова) в активному центрі mPGES-1 (б).

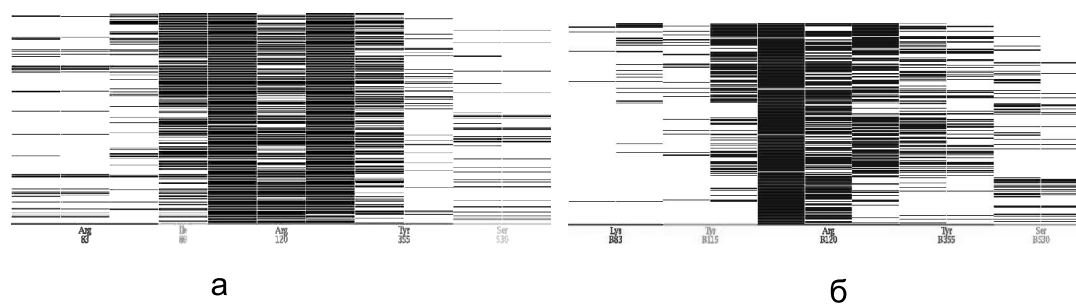


Рис. 6. «Штрих-коди» відбитків пальців, побудовані для комплексів енергетично сприятливих конформаційних положень досліджуваних речовин з рецепторами COX-1 (а) і COX-2 (б).

лук утворює водневі зв'язки з рецептором за рахунок Н-акцепторних властивостей атомів Оксигену тіазолідинового гетероциклу, ацетамідного фрагменту або атомів Оксигену нітрогрупи із залишками Arg126 і Ser127 або інших амінокислот активного центру рецептора (Tyr130, Arg73, Tyr117) (рис. 5б). Водневі зв'язки з відповідними амінокислотними залишками молекул лігандів можуть утворюватись також за участі атомів Нітрогену ацетамідного фрагмента або гідразидної групи. При цьому навіть якщо атоми базового скафолда не беруть участі в утворенні водневих зв'язків, комплекси стабілізуються за рахунок π -H взаємодії між тіазолідиновим або піридиновим циклами і Ser127 або Tyr130.

Таким чином, результати проведеного гнучкого молекулярного докінгу похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону до mPGES-1 вказують на можливість утворення між ними стійких комплексів, у яких для переважної більшості синтезованих сполук зв'язування між лігандом і рецептором відбувається за участі атомів базового гетероциклу.

2. Моделювання 3D фармакофорів у молекулах похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону

Термін «фармакофор» було вперше застосовано П.Ерліхом у 1909 р. [25]. Більш точне визначення цього терміну згідно з формулюванням IUPAC характеризує фармакофор як поєднання стеричних та електронних властивостей, необхідних для забезпечення оптимальної міжмолекулярної нековалентної взаємодії сполуки із специфічною біологічною мішенню, яка призводить до інгібування або блокування її біологічних функцій [26].

У даній роботі ми провели моделювання 3D фармакофорів у молекулах 36 синтезованих сполук із використанням методології «відбитків пальців» взаємодій між рецептором та лігандом (Protein-Ligand Interaction Fingerprints – PLIF) [27] за допомогою програмного пакету MOE. Ця методологія є інструментом для узагальнення інформації про типи взаємодій між лігандом і протеїном. У програмному пакеті MOE враховуються 6 типів таких взаємодій: водневі зв'язки між амінокислотним залишком бічного ланцюга та акцептором або

донором протону ліганду; водневі зв'язки, утворені атомами основного ланцюга пептиду та акцептором або донором протону ліганду; іонні взаємодії; контактні (поверхневі) взаємодії. Ці типи взаємодій групуються залежно від типу амінокислотного залишку, що їх утворює («відбитка пальця»). Таким чином, схема «відбитків пальців» є формою 1D представлення 3D структур комплексів між лігандом і рецептором, встановлених в результаті проведеної процедури віртуального скринінгу та виявлення афінитету досліджуваних сполук до відповідного ферменту.

Встановлення амінокислотних залишків бічних ланцюгів протеїнів, з якими найбільша кількість енергетично сприятливих конформаційних положень молекул досліджуваних речовин утворюють взаємодії різних типів, було здійснено шляхом побудови «штрих-кодів» («Barcodes») відбитків пальців для комплексів досліджуваних речовин з відповідним рецептором. Критерієм енергетично сприятливого розташування певної конформації ліганда в активному центрі фермента було вибрано величину скорингової функції Affinity dG < - 4. «Штрих-код» є матричним зображенням відбитків пальців, у якому кожен стовпчик відповідає утвореній взаємодії певного типу (bit) із відповідним залишком амінокислоти, коди амінокислотних залишків позначені на осі x. Кожен рядок у «штрих-коді» позначає активне конформаційне положення ліганда, що утворює взаємодію з відповідним амінокислотним залишком.

Найбільша кількість комплексів між молекулами досліджуваних речовин та двома ізоформами COX утворена за участі залишків амінокислот Arg83, Ile89, Arg120, Tyr355 і Ser530 бічних ланцюгів COX-1 (рис. 6а) та Lys83, Tyr115, Arg120, Tyr355 і Ser530 бічних ланцюгів COX-2 (рис. 6б). Всі амінокислотні залишки можуть брати участь в утворенні декількох типів взаємодій (утворення водневого зв'язку з Н-акцептором, контактна взаємодія, найчастіше гідрофобна), за винятком Ile89.

Встановлені на основі «штрих-кодів» відбитків пальців типу і локалізації взаємодій у комплексах синтезованих сполук з двома ізоформами COX дозволили побудувати 3D моделі фармакофорів у молекулах досліджуваних речовин. Побу-

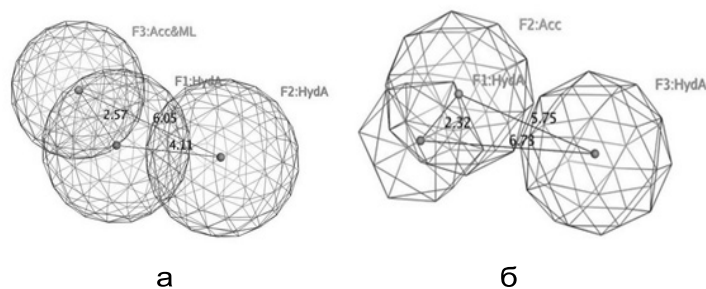


Рис. 7. Трицентрові 3D фармакофорні моделі для молекул похідних тiazоло[4,5-*b*]-піридин-2-ону у комплексах з COX-1 (а) і COX-2 (б).

довані фармакофорні 3D моделі (рис. 7) складаються з 3-х фармакофорних центрів: двох областей, у яких розташовуються гідрофобні атоми лігандів (HydA) з радіусами 2,922 Å і 2,952 Å (для COX-1) та 2,480 Å і 2,953 Å (для COX-2), а також області розташування Н-акцептора (донора електронної пари) при утворенні водневих зв'язків (Acc) з радіусом 2,579 Å (COX-1) або 2,860 Å (COX-2). Відстані між гідрофобними фармакофорними центрами становлять 4,11 Å і 6,73 Å, а відстані між Н-акцепторним і двома гідрофобними центрами становлять 2,57 Å і 6,05 Å та 2,32 Å і 5,75 Å для COX-1 і COX-2, відповідно.

Для більшості досліджуваних сполук Н-акцепторний центр фармакофора накладається на атоми Нітрогену піридинового гетероциклу або гідразидної групи або атом Оксигену ацетамідного фрагмента (рис. 8). Гідрофобними центрами у молекулах синтезованих речовин можуть виступати атоми Карбону метильних груп у 5-му або 7-му положеннях піридинового гетероциклу, атоми Карбону або Сульфуру у складі конденсованого гетероциклического скафолда та атом Карбону, з'єднаний з Нітрогеном у 3-му положенні тiazолідинового циклу.

Проте отримані трицентрові фармакофорні моделі коректно описують активні положення лише 16 сполук (absolute hits) (44,44%) з 36 досліджуваних без додаткових стеричних модифікацій їх структури або 174 конформації (48,74%) з 357, одержаних за результатами докінгу з COX-1, і 139 конформацій (33,74%) з 412, одержаних за результатами докінгу з COX-2. Узгодження молекул

всіх речовин із фармакофорними моделями можливе лише за умови, що обертання атомів довкола одинарних зв'язків буде дозволено (relative hits).

Більш коректний опис активних положень молекул синтезованих речовин у комплексах з COX-1 і COX-2 можливий із використанням двоцентрових фармакофорних 3D моделей (рис. 9), що складаються з одного фармакофорного центру, який виконує тільки одну функцію у забезпеченні зв'язування між лігандами і протеїном: Н-акцепторний центр з радіусом 1,855 Å для COX-1 і гідрофобний центр з радіусом 2,986 Å для COX-2. Другий фармакофорний центр в одержаних моделях може виконувати подвійну функцію: це ділянка з радіусом 1,968 Å (COX-1) або 2,259 Å (COX-2), що містить Н-акцептор або гідрофобний атом (Acc&HydA). Відстані між фармакофорними центрами становлять 2,81 Å у моделі для COX-1 та 6,28 Å у моделі для COX-2.

Двоцентрові фармакофорні 3D моделі коректно описують активні положення 33 сполук (absolute hits) (91,67%) або 310 конформацій (86,83%) з 357, одержаних за результатами докінгу з COX-1, і 23 сполуки (63,89%) або 219 конформацій (53,16%) з 412, одержаних за результатами докінгу з COX-2 для вибірки з 36 досліджуваних сполук без додаткових стеричних модифікацій їх структури.

Аналогічно трицентровим моделям у двоцентрових 3D фармакофорах Н-акцепторний центр добре узгоджується із стеричним розміщенням атомів Нітрогену піридинового гетероциклу чи гідразидної групи або атомом Оксигену ацетамідного фрагмента (рис. 10). Гідрофобними центра-

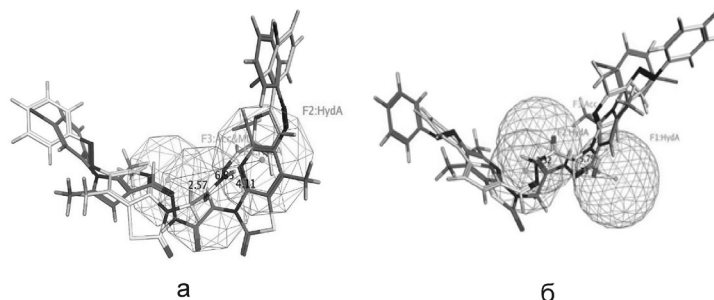


Рис. 8. Суперпозиція трицентрових фармакофорних 3D моделей та найбільш сприятливих конформаційних положень сполук **36** (сіра) і **37** (бузкова) у комплексах з COX-1 (а) і COX-2 (б).

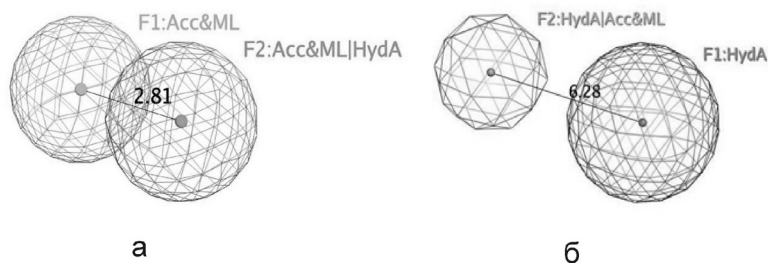


Рис. 9. Двоцентрові 3D фармакофорні моделі для молекул похідних тiazоло[4,5-*b*]-пiридин-2-ону у комплексах з COX-1 (а) і COX-2 (б).

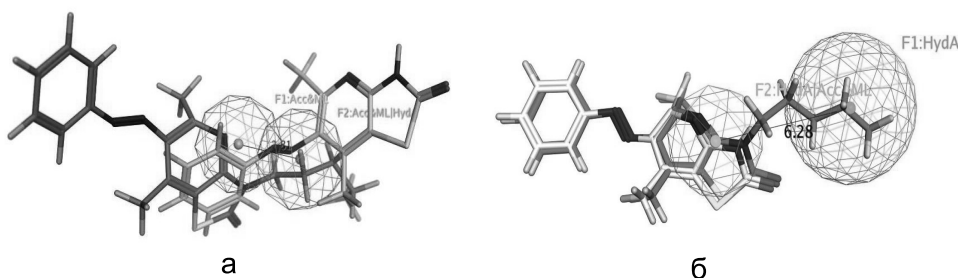


Рис. 10. Суперпозиція двоцентрових фармакофорних 3D моделей та найбільш сприятливих конформаційних положень сполук 7 (бузкова) і 1 (сіра) у комплексах з COX-1 (а) та COX-2 (б).

ми у молекулах синтезованих речовин можуть виступати атом Сульфуру тiazолідинового циклу, атом Карбону, з'єднаний з Нітрогеном у 3-му положенні тiazолідинового циклу, або атоми Карбону алкільного замісника у 3-му положенні тiazолідинового циклу.

Процедуру моделювання 3D фармакофорів для активних конформаційних положень синтезованих сполук в активному центрі mPGES-1 було проведено за аналогічною схемою.

Найбільша кількість комплексів між активними конформаціями молекул досліджуваних речовин та mPGES-1 утворена за участі залишків амінокислот Arg73, His113, Tyr117, Arg126, Ser127, Tyr130 і Thr131 бічних ланцюгів рецептора (рис. 11). Аналіз діаграми заселеностей відбитків пальців свідчить, що практично всі комплекси утворені за рахунок водневого зв'язку між лігандом і Arg126. У значній частині комплексів між лігандом і Arg126 утворюється по два водневі зв'язки та контактна взаємодія. Також слід відзначити, що у значній частині комплексів утворюються водневі зв'яз-

ки за участі Ser127, Tyr130 і Thr131, для двох останніх амінокислотних залишків суттєвою є також контактна взаємодія між ними та більшою частиною активних положень лігандів.

Побудовані фармакофорні 3D моделі (рис. 12а) складаються з 3-х фармакофорних центрів: ділянки розташування Н-акцептора (донора електронної пари) при утворенні водневих зв'язків (Acc) з радіусом 2,915 Å та двох областей, у яких розташовуються гідрофобні атоми лігандів (HydA) з радіусами 2,768 Å і 2,893 Å. Відстані між Н-акцепторним і двома гідрофобними центрами становлять 6,18 Å і 4,01 Å, а відстань між гідрофобними фармакофорними центрами – 6,79 Å.

Трицентрова 3D модель коректно описує активні положення 21 сполуки, що складає 60,0% досліджуваної вибірки, або 43,29% активних конформаційних положень молекул лігандів у комплексах з рецептором без додаткових стеричних модифікацій їх структури.

Більш коректний опис стеричних та електростатичних властивостей структури синтезованих

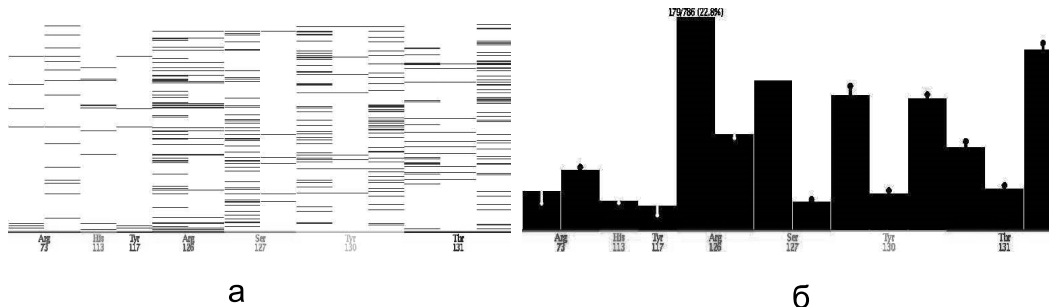


Рис. 11. «Штрих-коди» відбитків пальців (а) та діаграма заселеності (б), побудовані для комплексів досліджуваних речовин з mPGES-1.

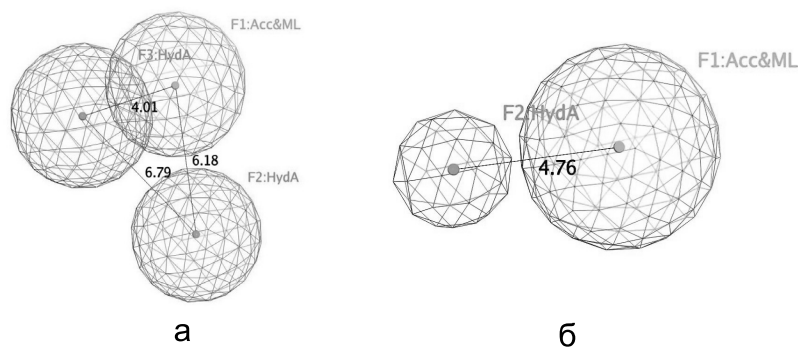


Рис. 12. Трицентрова (а) і двоцентрова (б) 3D фармакофорні моделі для молекул похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону, що забезпечують їх здатність утворювати комплекси з рецептором mPGES-1.

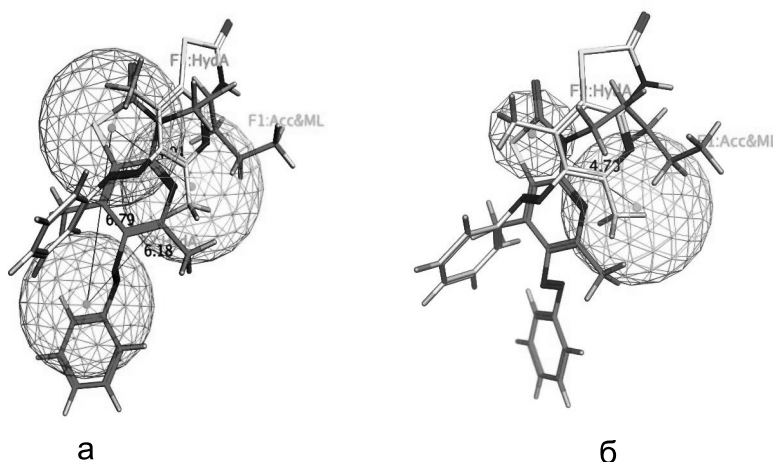


Рис. 13. Суперпозиція трицентрової (а) і двоцентрової (б) фармакофорних 3D моделей та найбільш сприятливих конформаційних положень сполук 7 (бузкова) і 1 (сіра) у комплексах з mPGES-1.

речовин забезпечується двоцентровою фармакофорною моделлю (рис. 12б), яка складається з Н-акцепторного і гідрофобного центрів, радіуси яких становлять 2,880 Å і 2,678 Å, відповідно, розташованими на відстані 4,76 Å. Двоцентрові фармакофорні 3D моделі коректно описують активні положення 20 сполук (57,14%) або 55,49% конформацій активних положень молекул лігандів у комплексах з mPGES-1 без додаткових стеричних модифікацій їх структури.

При співставленні одержаних фармакофорних 3D моделей та активних конформаційних положень досліджуваних сполук (рис. 13) було встановлено, що Н-акцепторний центр добре узгоджується із стеричним розміщенням атома Нітрогену піридинового циклу або атома Оксигену ацетамідного фрагмента. Гідрофобними центрами у молекулах синтезованих речовин можуть виступати атом Сульфуру тіазолідинового циклу, атоми Карбону одного з циклів конденсованої гетероциклічної системи, а також атоми Карбону фенільного кільця, з'єднаного з азогрупою або у складі замісника в 3-му положенні базового скафолду (для трицентрової моделі).

Аналіз усіх одержаних фармакофорних моделей вказує на функціональність конденсованого

біциклічного тіазолопіридинового скафолда, яка забезпечується стеричним розміщенням атомів хоча б одного з цих гетероциклів у відповідних фармакофорних центрах.

Таким чином, конденсовану тіазолопіридинову гетероциклічну систему можна розглядати як перспективний скафолд для створення комбінаторних бібліотек потенційних біологічно активних речовин. Таке твердження базується на певних властивостях цієї системи, які притаманні також привілейованим структурам. По-перше, поєднання двох гетероциклів з утворенням біциклічної конденсованої системи, яка є базовою у структурі молекул, забезпечує невелику кількість обертових зв'язків. По-друге, встановлений за результатами молекулярного докінгу афінитет синтезованих сполук до декількох рецепторів забезпечується компліментарністю електростатичної і стеричної поверхонь рецепторів і молекул лігандів у цілому і базового гетероцикла зокрема, що підтверджується здатністю певних його атомів утворювати енергетично сприятливі нековалентні взаємодії з цими рецепторами. І, по-третє, існуючі можливості для функціоналізації тіазолопіридинового ядра, зокрема за 3-м і 6-м положеннями, дозволяють підвищувати селективність та

специфічність зв'язування похідних, а також їх афінітет до відповідного рецептора шляхом введення відповідних замісників у структуру молекули.

Висновки

1. Проведені докінгові дослідження для встановлення афінітету похідних 5,7-диметил-6-фенілазо-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону до ферментів, задіяних у різних стадіях циклооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти: COX-1, COX-2 і mPGES-1. Одержані результати свідчать про можливість утворення стійких комплексів молекул синтезованих речовин з COX-1 і COX-2. Похідні тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону можна також розглядати як потенційні інгібітори mPGES-1.

2. Для переважної більшості досліджуваних сполук зв'язування між лігандом і зазначеними рецепторами відбувається за участі атомів базо-

вого гетероцикла або самих гетероциклів у формі утворення π -катіонної, π -H або π - π взаємодій.

3. Вперше було проведено моделювання 3D фармакофорів у молекулах похідних 5,7-диметил-6-фенілазо-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону із використанням методології «відбитків пальців» взаємодій між рецептором та лігандом. Побудовано три- та двоцентрові 3D моделі фармакофорів.

4. Аналіз одержаних фармакофорних моделей вказує на функціональність конденсованого біциклічного тіазолопіридинового скафолда, яка забезпечується стеричним розміщенням атомів хоча б одного з цих гетероциклів у відповідних фармакофорних центрах.

5. Конденсовану тіазолопіридинову гетероциклічну систему можна розглядати як перспективний скафолд для створення комбінаторних бібліотек потенційних біологічно активних речовин.

Література

1. Chang C., Ekins S., Bahadduri P. et al. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2006, Vol. 58, pp.1431-1450.
2. Ekins S., Mestres J., Testa D. et al. *Br. J. Pharmacol.*, 2007, Vol. 152, pp.21-37.
3. Чабан Т. І., Озурцов В. В., Чабан І. Г. та ін. *ЖОФХ*, 2012, Т. 10, вун. 2 (38), сс.70-76.
4. Saeyd H. H., Morsy E. M., Kotb E. R. *Sci. Commun.*, 2010, Vol. 40, pp.2712-2722.
5. Lee Y. R., Inhee M.-J., Yoo K. H. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2008, Vol. 29 (12), pp.2331-2336.
6. Chaban T. I., Panchuk R. R., Klenina O. V. et al. *Biopolym. Cell.*, 2012, Vol. 25 (5), pp.389-396.
7. Chaban T. I., Ogurtsov V. V., Chaban I. G. et al. *Phosphorus Sulfur.*, 2013, Vol. 188 (11), pp.1611-1620.
8. Klenina O., Drapak I., Chaban T. et al. *Ch&ChT*, 2013, Vol. 7 (4), pp.397-404.
9. Rao A. U., Palani A., Chen X. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, Vol. 19 (21), pp.6176-6180.
10. Kulkarni S. S., Newman A. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, Vol. 17, pp.2987-2991.
11. Lin R., Johnson S. G., Connolly P. J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, Vol. 19, pp.2333-2337.
12. Bebernitz G. R., Beaulieu V., Dale B. A. et al. *J. Med. Chem.*, 2009, Vol. 52 (19), pp.6142-6152.
13. Chaban T. I., Zimenkovskii B. S., Komaritsa I. D. et al. *Rus. J. of Org. Chem.*, 2012, Vol. 48, iss. 2, pp.268-270.
14. Чабан Т. І., Озурцов В. В., Комариця Й. Д. та ін. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*, 2011, №1-2, сс.208-213.
15. Smith W. L., DeWitt D. L., Garavito R. M. *Annu. Rev. Biochem.*, 2000, Vol. 69, pp.145-182.
16. Kurumbail R. G., Kiefer J. R., Marnett L. J. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, Vol. 11(6), pp.752-760.
17. Jegerschold C., Pawelzik S.-C., Purhonen P. et al. *PNAS*, 2008, Vol. 105, No.32, pp.1110-11115.
18. Abdul Hameed M. D. M., Hamza A., Liu J. et al. *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, Vol. 48, pp.179-185.
19. Dallaporta M., Pecchi E., Thirion S. et al. *Recent Pat. on Drug Discovery*, 2010, Vol. 5, No.1, pp.70-80.
20. He S., Lai L. *J. Chem. Inf. Model.*, 2011, Vol. 51, pp.3254-3261.
21. *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2012.10; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2012.
22. Gupta K., Selinsky B. S., Kaub C. J. et al. *J. Mol. Biol.*, 2004, Vol. 335, pp.503-518.
23. Duggan K. C., Walters M. J., Musee J. et al. *The J. of Biol. Chem.*, 2010, Vol. 285 (45), pp.34950-34959.
24. Sjögrena T., Nordb J., Eka M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, Vol. 110 (10), pp.3806-3811.
25. Ehrlich P. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1909, Vol. 42, pp.17-47.
26. Wermuth C. G., Ganellin C. R., Lindberg P. et al. *Pure and Applied Chemistry*, 1998, Vol. 70 (5), pp.1129-1143.
27. Marcou G., Rognan D. *J. of Chem. Inform. and Modeling*, 2007, Vol. 47, pp.195-207.

Надійшла до редакції 31.10.2013 р.

UDC 531.1:547.835.33:661.721.4

THE REACTIVITY OF N-PHENYLANTHRANILIC ACIDS DERIVATIVES. XXV.* KINETIC PARAMETERS OF ACTIVATION AND ISOPARAMETRICITY OF THE REACTION OF THE ALKALINE HYDROLYSIS OF METHYL ESTERS OF SUBSTITUTED 4,5-DIMETHOXY-N-PHENYLANTHRANILIC ACIDS IN THE BINARY DIOXANE-WATER SOLVENT

S.G.Isaev, O.M.Sviechnikova*, A.O.Devyatkina, T.A.Kostina

National University of Pharmacy

53, Pushkinska str., Kharkiv, 61002, Ukraine. E-mail: medchimia@mail.ru

* National Kharkiv Pedagogical University named after G.S. Skovoroda

Key words: N-phenylanthranilic acid; methyl esters; reactivity; thermodynamic parameters of activation; thermodynamic parameters of activation; isoparametricity of reactions; enthalpy control

Kinetics of the alkaline hydrolysis reaction of methyl esters of substituted 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids has been studied in the binary solvent of dioxane-water at 55, 75, 85°C. It has been found that at each experimental temperatures $\lg k_T$ dependence on the nature and position of substitutes in a non-anthranilic fragment of the molecule is described by the Hammett equation. It has been demonstrated that introduction of electrodonor substituents in the molecule of ester assists increasing of the activation energy and free activation energy. The activation entropy for all substances is significant and high according to the absolute value, which indicates the $B_{AC}2$ mechanism of the reaction with formation of high-symmetrical intermediates. The analysis of the numerous kinetic and activation parameters has shown isokinetics of the reaction with the enthalpy type of control. It has been experimentally found that the compounds synthesized show the anti-inflammatory, analgesic, diuretic, bacteriostatic activities.

РЕАКЦИЙНА ЗДАТНІСТЬ ПОХІДНИХ N-ФЕНІЛАНТРАНИЛОВИХ КИСЛОТ. XXV. КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ АКТИВАЦІЇ ТА ІЗОПАРАМЕТРИЧНІСТЬ РЕАКЦІЇ ЛУЖНОГО ГІДРОЛІЗУ МЕТИЛОВИХ ЕСТЕРІВ ЗАМІЩЕНИХ 4,5-ДИМЕТОКСИ-N-ФЕНІЛАНТРАНИЛОВИХ КИСЛОТ У БІНАРНОМУ РОЗЧИННИКУ ДІОКСАН-ВОДА

С.Г.Ісаєв, О.М.Свєчнікова, А.О.Дев'яткіна, Т.А.Костіна

Ключові слова: N-фенілантранилова кислота; метилові естери; реакційна здатність; термодинамічні параметри активації; ізопараметричність реакції; ентальпійний контроль

Досліджено кінетику реакції лужного гідролізу метилових естерів заміщених 4,5-диметокси-N-фенілантранилових кислот у бінарному розчиннику діоксан – вода при температурах 55, 75, 85°C. Встановлено, що при всіх досліджених температурах залежність $\lg k_T$ від природи і положення заступників у неантраниловому фрагменті молекули описується рівнянням Гамета. Показано, що введення електродонорних замісників у молекулу естеру сприяє підвищенню енергії активації і вільної енергії активації. Ентропія активації для всіх речовин від'ємна та велика за абсолютним значенням, що вказує на $B_{AC}2$ механізм реакції з утворенням високосиметричних інтермедіантів. Аналіз численних кінетичних і активаційних параметрів показав ізокінетичність реакції з ентальпійним типом контролю. Експериментально встановлено, що синтезовані речовини виявляють протизапальну, анальгетичну, діуретичну, бактеріостатичну активність.

РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ. XXV. КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ АКТИВАЦИИ И ИЗОПАРАМЕТРИЧНОСТЬ РЕАКЦИИ ЩЕЛОЧНОГО ГИДРОЛИЗА МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ЗАМЕЩЕННЫХ 4,5-ДИМЕТОКСИ-N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ

С.Г.Исаев, Е.Н.Свечникова, А.А.Девяткина, Т.А.Костина

Ключевые слова: N-фенілантранилова кислота; метиловый эфир; реакционная способность; термодинамические параметры активации; изопараметричность реакции; энтальпийный контроль

Исследована кинетика реакции щелочного гидролиза метиловых эфиров замещенных 4,5-диметокси-N-фенілантраниловых кислот в бинарном растворителе диоксан-вода при температурах 55, 75, 85°C. Установлено, что при всех исследованных температурах зависимость $\lg k_T$ от природы и положения заместителей в неантраниловом фрагменте молекулы описывается уравнением Гамета. Показано, что введение электродонорных заместителей в молекулу эфира способствует повышению энергии активации и свободной энергии активации. Энтропия активации для всех веществ отрицательна и велика по абсолютным значениям, что указывает на $B_{AC}2$ механизм реакции с образованием высокосимметричного интермедиаанта. Анализ многочисленных кинетических и активационных параметров показал изокинетичность реакции с энтальпийным типом контроля. Экспериментально установлено, что синтезированные вещества проявляют противовоспалительную, анальгетическую, диуретическую, бактериостатическую активность.

* Report XXIV see [15]

The long-time investigations in the range of N-phenylanthranilic acids (N-PAA) and their derivatives by researchers of the Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Institute of Pharmacology and Toxicology of the Ukrainian Academy of Medical Sciences and the National University of Pharmacy led to creation of effective medicines (mefenamic acid and its sodium salt, difluorant, antral) widely used in medical practice as anti-inflammatory, antipsoriatic and hepatoprotective medicines [5, 6]. Data of scientific research of domestic and foreign scientists indicate that derivatives of N-PAA have a wide synthetic and pharmacological potential [1-3, 6, 10, 14, 16, 17]. These circumstances caused the necessity of synthesis of methyl esters 4,5-dimethoxy-N-PAA and study their reactivity. It should be noted that the reaction of alkaline hydrolysis of N-PAA esters is one of the possible ways of their metabolism in the organism and is of a great scientific and practical interest for researchers in the field of organic synthesis and pharmacological research. Esters of N-PAA are also initial substances for obtaining the corresponding alkyl-, aryl-, heterylamides, hydrazides and their derivatives. To continue the study of kinetics of the alkaline hydrolysis reaction [15] of biologically active methylic esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids in the binary solvent of dioxane-water (60 vol.% of dioxane) by the equation according to the scheme 1, the constants of the reaction rate have been determined at the temperatures of 55, 75 and 85°C (Scheme 1).

Analysis of the results obtained proves that at all experimental temperatures the influence of the nature and position of substituents in a non-anthranilic fragment of the molecule is similar: acceptor substituents accelerate the reaction due to delocalization of the charge in relation to the anion, and donor substituents causes the opposite effect; it allows to assume the course of the alkaline hydrolysis reaction of methyl esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids (1-9) by $B_{AC}2$ mechanism.

According to the Hammett's equation the quantitative estimation of the influence of the nature and

position of substituents upon the constants of the reaction rate at 55, 75, 85°C has been performed.

$$\lg k_{328} = (-4.801 \pm 0.007) + (0.996 \pm 0.029)\sigma \quad (1)$$

$n=9 \quad r=0.997 \quad S=4.7 \cdot 10^{-2}$

$$\lg k_{348} = (-4.317 \pm 0.005) + (0.883 \pm 0.029)\sigma \quad (2)$$

$n=9 \quad r=0.998 \quad S=3.7 \cdot 10^{-2}$

$$\lg k_{358} = (-4.062 \pm 0.004) + (0.844 \pm 0.015)\sigma \quad (3)$$

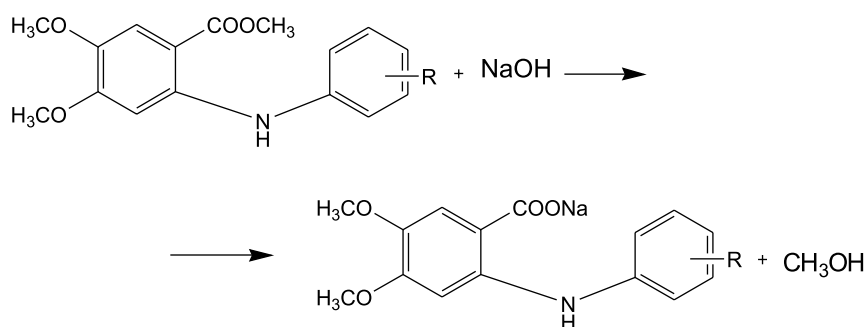
$n=9 \quad r=0.998 \quad S=2.5 \cdot 10^{-2}$

The correlative equations obtained have convincing statistical characteristics. The little values of the reaction parameter (ρ) at all experimental temperatures testify its slight sensitivity to the influence of substituents, it reduces with increase of the reaction temperature. It is interesting that the values of the reaction parameter practically coincide (within the experimental error) with ρ of β -dialkylaminomethyl esters of 4-nitro-, 4-nitro-5-chloro- and 4-sulfamoyl-N-PAA [7, 11-13]. The positive values of ρ testify of $B_{AC}2$ mechanism of the reaction (Scheme 2).

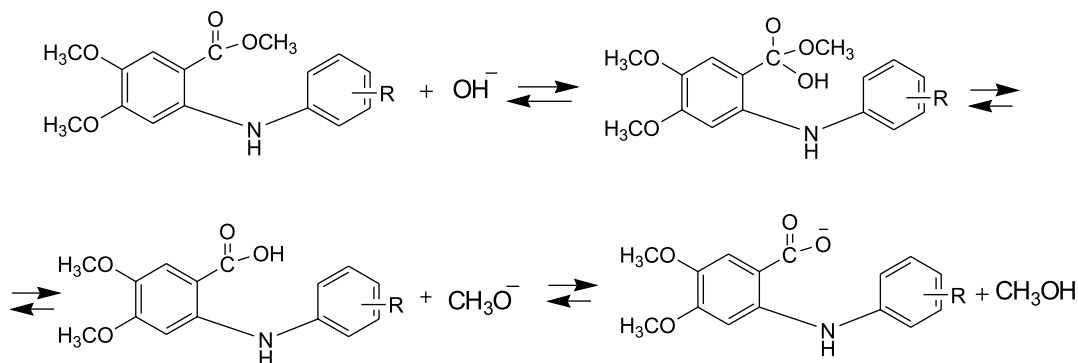
Table 1

The constants (k) of the alkaline hydrolysis reaction rate of methyl esters of substituted 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids at various temperatures

Compound	$k \cdot 10^5, l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ at T, K		
	328	348	358
1	1.63±0.03	4.46±0.03	8.69±0.05
2	1.10±0.04	3.44±0.02	6.16±0.04
3	1.03±0.03	3.44±0.03	6.02±0.04
4	0.94±0.03	2.99±0.03	5.54±0.03
5	0.88±0.02	2.81±0.04	5.15±0.04
6	0.83±0.04	2.67±0.03	5.02±0.02
7	0.71±0.03	2.54±0.04	4.68±0.02
8	2.62±0.02	7.80±0.05	13.24±0.07
9	2.67±0.02	7.85±0.05	13.95±0.06



Scheme 1



Scheme 2

The temperature dependence of constants of the reaction rates can be explained by the Arrhenius equation:

$$\ln k = \ln A \frac{E_A}{RT} \quad (4).$$

The values of the activation energy (E_A) and the logarithm of the preexponential factor ($\ln A$) calculated according to equation (4) are presented in Table 2. These data show that addition of electron-donor substituents to the molecule of ester naturally leads to increase of the energy barrier and value E_A , respectively. The acceptor substituents cause the opposite effect. Correlation of E_A and $\ln A$ with Hammett σ -constants is statistically unreliable.

According to the Eyring's equation [9] enthalpy (ΔH^\ddagger) and entropy (ΔS^\ddagger) of activation have been calculated:

$$\ln \frac{k}{T} \cdot \frac{h}{K} = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{1}{RT} \cdot \Delta H^\ddagger, \quad (5)$$

where: h – is the Planck's constant; K – is the Boltzmann's constant; R – is the universal gas constant; T – is the absolute temperature.

Free energy of activation (ΔG^\ddagger) has been calculated according to the second principle of thermodynamics. The data obtained are presented in Table 3.

Table 2

Kinetic parameters of activation (E_A and $\ln A$) of the alkaline hydrolysis reaction of methyl esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids

Compound	E_A , kJ · mol ⁻¹	$\ln A$	r	s
1	49.4±0.3	7.14±0.10	0.994	0.175
2	52.0±0.2	7.69±0.10	0.995	0.170
3	50.4±0.4	7.15±0.13	0.991	0.224
4	53.3±0.3	8.03±0.09	0.996	0.156
5	53.4±0.3	7.98±0.09	0.997	0.148
6	54.0±0.3	8.15±0.10	0.996	0.158
7	54.9±0.3	8.41±0.11	0.994	0.193
8	47.7±0.3	7.03±0.10	0.995	0.159
9	48.0±0.3	7.16±0.12	0.993	0.190

The activation entropy for all compounds is inseparable, and it additionally proves the reaction B_{AC}2 mechanism. High absolute values of ΔS^\ddagger indicate a high symmetric structure of the intermediate to be formed. Addition of acceptor substituents to the molecule causes increase of the absolute value of ΔS^\ddagger and decrease of ΔH^\ddagger . The ΔH^\ddagger values are small. This fact testifies coincidence of the reaction series. Correla-

Table 3

Thermodynamic parameters of activation (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger) of the alkaline hydrolysis reaction of methyl esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids

Compound	ΔG^\ddagger , kG · mol ⁻¹					ΔH^\ddagger , kG · mol ⁻¹	ΔS^\ddagger , kG · mol ⁻¹	r	s	$T \Delta S^\ddagger$, kG · mol ⁻¹				
	318K	328K	338K	348K	358K					318K	328K	338K	348K	358K
1	108.6	110.5	112.5	114.4	116.4	46.6±0.3	-194.9±8.9	0.994	0.173	-62.0	-63.9	-65.9	-67.8	-69.8
2	109.7	111.6	113.5	115.4	117.3	49.2±0.3	-190.3±8.6	0.995	0.168	-60.5	-62.4	-64.3	-66.2	-68.1
3	109.5	111.5	119.4	115.4	117.3	47.6±0.4	-194.8±11.4	0.990	0.222	-61.9	-63.9	-65.8	-67.8	-69.7
4	110.1	112.0	113.9	115.7	117.6	50.5±0.3	-187.5±7.9	0.996	0.486	-59.6	-61.5	-63.4	-65.2	-67.1
5	110.4	112.2	114.1	116.0	117.9	50.6±0.3	-187.9±7.5	0.996	0.462	-59.8	-61.6	-63.5	-65.4	-67.3
6	110.5	112.3	114.2	116.1	117.9	51.2±0.3	-186.4±8.0	0.996	0.157	-59.3	-61.1	-63.0	-64.9	-66.7
7	110.7	112.5	114.4	116.2	118.1	52.1±0.3	-184.3±8.0	0.994	0.192	-58.6	-60.4	-62.3	-64.1	-66.0
8	107.2	109.1	111.1	113.0	111.1	44.9±0.3	-195.8±8.0	0.995	0.157	-62.3	-64.2	-66.2	-68.1	-70.1
9	107.1	109.1	111.0	113.0	114.9	45.2±0.3	-194.7±9.5	0.993	0.185	-61.9	-63.9	-65.8	-67.8	-69.7

Table 4

Determination of isokinetic temperature. The correlation parameters of equation $y = a + bx$ of dependence of kinetic and activation parameters of the alkaline hydrolysis reaction of methyl esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids and isokinetics of temperatures β

X	y	a	b	r	s	β , K
$\lg K_{318}$	ΔH^\ddagger	$(12.6 \pm 1.2) \cdot 10^3$	$(-9.1 \pm 0.5) \cdot 10^3$	0.964	190	615
$\lg K_{328}$	ΔH^\ddagger	$(13.2 \pm 1.4) \cdot 10^3$	$(-9.1 \pm 0.7) \cdot 10^3$	0.952	230	625
$\lg K_{338}$	ΔH^\ddagger	$(14.6 \pm 1.6) \cdot 10^3$	$(-10.1 \pm 0.8) \cdot 10^3$	0.942	425	608
$\lg K_{348}$	ΔH^\ddagger	$(14.9 \pm 1.7) \cdot 10^3$	$(-10.1 \pm 0.8) \cdot 10^3$	0.944	249	629
$\lg K_{358}$	ΔH^\ddagger	$(16.6 \pm 1.8) \cdot 10^3$	$(-9.2 \pm 0.8) \cdot 10^3$	0.943	252	610
ΔS^\ddagger	ΔH^\ddagger	$(383 \pm 28) \cdot 10^2$	585 ± 31	0.963	49	585
1/T	ρ	-0.890 ± 0.08	618 ± 26	0.997	$1.27 \cdot 10^{-2}$	618

tions of ΔH^\ddagger and ΔS^\ddagger with Hammett σ -constants are statistically insignificant. It is interesting to note that enthalpy and entropy contributions to ΔG^\ddagger are similar.

For control of isokinetic correlation existence in the experimental reaction series the following correlations were examined: $\Delta H^\ddagger - \lg k_T$, $\Delta H^\ddagger - \Delta S^\ddagger$, $\rho - 1/T$ (Table 4). All of them appeared to be statistically significant. The values of isokinetic temperature β calculated from these dependencies are close to values β calculated independently (Table 5) according to the equation below:

$$\lg k_{T_2} = \text{const} + \chi \lg k_{T_1} \quad (6).$$

The value β is higher than the interval of the temperature under study, and it testifies the enthalpy type of control of the alkaline hydrolysis reaction of methyl esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids.

Based on the PASS programme the computer prognosis of possible types of biological activity of 9 methyl esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids synthesized for the first time has been conducted. It has been found experimentally that the substances synthesized reveal the anti-inflammatory, analgetic, diuretic, bacteriostatic and fungistatic activity. According to the classification of Sidorov K.K. the compounds synthesized when introduced intragastrically belong to low toxic reagents ($DL_{50} = 1500-2000$ mg/kg). A number of regularities of the "structure-activity-toxicity" relationship have been determined.

Experimental Part

The synthesis of methyl esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acid (1-9) was carried out by Fisher esterification in the medium of absolute methanol in the presence of concentrated sulfuric acid [8, 10]. The compounds (1-9) obtained were three times recrystallized from methanol and dried at 105°C up to the constant weight. The structure of the compounds synthesized was confirmed by elemental analysis, IR- and NMP-spectroscopy. The purity was controlled by

Table 5

Determination of isokinetic temperature β . The correlation parameters of equation $\lg k_{T_2} = \text{const} + \chi \lg k_{T_1}$ of the alkaline hydrolysis reaction of methyl esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids

Temperature, K		X	r	s	β , K
T_1	T_2				
318	328	0.9359	0.994	$6.87 \cdot 10^{-2}$	607
318	338	0.8759	0.996	$5.16 \cdot 10^{-2}$	608
318	348	0.8318	0.997	$4.37 \cdot 10^{-2}$	575
318	358	0.7926	0.996	$4.72 \cdot 10^{-2}$	622
328	338	0.9249	0.991	$7.77 \cdot 10^{-2}$	575
328	348	0.8798	0.923	$6.30 \cdot 10^{-2}$	541
328	358	0.8201	0.997	$3.78 \cdot 10^{-2}$	628
338	348	0.9206	0.995	$5.24 \cdot 10^{-2}$	613
338	358	0.8614	0.996	$4.08 \cdot 10^{-2}$	566
348	358	0.9503	0.970	$4.40 \cdot 10^{-2}$	610

the method of thin-layer chromatography in the methanol – hexane mixture (1:3).

Kinetic measurements were conducted by the screening methods [7]. The sodium hydroxide concentration in the solution was determined by potentiometric titration on an EV-74 ionomer using the standard aqueous solution of HCl. The kinetics of the reaction was studied at 55, 75 and 85°C. Experiments were repeated three times, including 6-8 measurements of each (the depth of reproduction being at least 80%). The accuracy of the results obtained was assessed by means of the methods of mathematical statistics for small sets (at 0.95% confidence interval) [4].

Conclusions

1. Kinetics of the alkaline hydrolysis reaction of methyl esters of substituted 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids has been studied in the binary solvent of dioxane-water at the temperatures of 55, 75 and 85°C.

2. The influence of the nature and position of substituents in a non-anthranilic fragment of the molecule upon the numerous kinetic ($\lg k_{318}$, $\lg k_{328}$, $\lg k_{338}$, $\lg k_{348}$, $\lg k_{358}$) and activation (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger , $\ln A$) parameters of the alkaline hydrolysis reaction has been analyzed.

3. Numerous tests have proven isokinetics of the alkaline hydrolysis reaction of methyl esters of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids with the enthalpy type of control, and its $B_{AC}2$ mechanism has been confirmed with formation of a high symmetrical intermediate.

References

1. Mashkovskiy V. D. *Lekarstvennyye sredstva (The medicaments)*. – 16-ye izd., ispr. i dop., Moscow, 2012, 1216 p.
2. Isaev S. G., Pavlyi O. O., Zupanets I. A. *Optyimizatsiia poshuku efektyvnykh likarskykh zasobiv na osnovi N-fenilantranilovykh kyslot Inform. Lyst № 193-03 – Optimization of finding effective medicines from N-phenylanthranilic acids: Inform. letter № 193-03 – Kyiv, 2003, Vol. 13, 85 p.*
3. Devjatkina A. O., Isaev S. G., Bryzitsky O. A., Yaremenko V. D. // *Materialy 5-I Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii "Farmobrazovanie 2013" – Materials of the 5th International Conference "Education Farm 2013", Voronezh, 2013, pp.279-284.*
4. Isaev S. G., Suleiman M. M., Svechnikova E. N. *Medychna khimiia – Medicinal Chemistry, 2010, Vol. 12, 2(43), pp.82-86.*
5. Isaev S. G., Svechnikova E. N., Alferova D. O. et al. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry, 2013, Vol. 13, 1(41), pp.76-81.*
6. Alferova D. O., Gritsenko I. S., Isaev S. G. *Khabarshisi (Kazakhstan), 2013, Vol. 1(62), pp.214-219.*
7. Isaev S. G., Svechnikova E. N., Devjatkina A. O. et al. *Visnik farmatsii – News of pharmacy, 2013, 2(74), pp.45-48.*
8. Asfree Gawanyanya, Regina Macianskiene, Virginie Bito, Karin R. Sipido et al. *Biochem. and Biophysical Res. Communications, 2010, Vol. 402, Issue 3, pp.531-536.*
9. Darby Schmidta, Abigail Smentona, Subharekha Raghavana, Hong Shena et al. *Bioorg. & Med. Chem. Lett., 2010, Vol. 20, Issue 11, pp.3426-3430.*
10. Isaev S. G., Svechnikova E. N., Devjatkina A. O. et al. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry, 2013, Vol. 11, Issue (43), pp.23-31.*
11. Gaidukevich A. N., Svechnikova E. N., Kazakhov G. P. et al. *Org. Reactivity, 1986, Vol. XXIII, Issue 4(84), pp.440-449.*
12. Gaidukevich A. N., Svechnikova E. N., Sim G. *Org. Reactivity, 1987, Vol. XXIV, Issue 2(86), pp.131-142.*
13. Gaidukevich A. N., Svechnikova E. N., Mikitenko E. E. *Org. Reactivity, 1987, Vol. XXIV, Issue 3(87), pp.348-357.*
14. Eiring G., Khin S. G., Lin S. M. *Osnovy khimicheskoi kinytyky (Fundamentals of Chemical Kinetics)*. Moscow, 1983. 528 p.
15. Chernykh V. P., Zymenkovskiy V. S., Gritsenko I. S., Orhanychna Khymiya (*Organic Chemistry*), 1995, pp.412-413.
16. Lvovskiy E. N. *Statysticheskie metody postroyeniya empyricheskykh formul (Statistical methods for constructing empirical formulas)*, Moscow, 1988, 125 p.

Надійшла до редакції 28.01.2014 р.

УДК 615.322.015:633.13

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМІН СТРУКТУРИ АЦИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ ТАНИДІВ У ПРОЦЕСІ СИНТЕЗУ З ВИКОРИСТАННЯМ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ УФ-СПЕКТРОСКОПІЇ

Мустафа Альхуссейн, А.В.Мартынов

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова Національної академії медичних наук України»

61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14. E-mail: imiamn@ukr.net

Ключові слова: галотанін; елаготанін; сукцинільовані та малеїнільовані похідні; диференційна електронна спектроскопія

Синтезовано ряд ацильованих похідних галотаніну промислового та елаготаніну з шишок вільхи сірої з різним ступенем заміщення фенольних гідроксилів. Синтез передбачав отримання суміші похідних з різними місцями заміщення фенольних гідроксилів та різною кількістю заміщень. Синтез ацильованих похідних проводили в умовах кип'ятіння, перекристалізацію отриманих похідних проводили з водно-етанольною сумішшю. Як модифікатори використовували бурштиновий та малеїновий ангідрид. Досліджували як первинний електронний спектр поглинання, так і першу та другу похідні спектрів – диференційні електронні спектри. В результаті вивчення електронних спектрів поглинання танідів з різним ступенем модифікації було встановлено, що значні зміни спектра із зсувом смуги поглинання ароматичних груп (250-270 нм) спостерігаються тільки для ацильованих галотанінів, а ступінь модифікації корелює зі ступенем зсуву основної смуги поглинання, що дає змогу використати вказану реакцію для ідентифікації комбінаторного похідного галотаніну. Електронні спектри поглинання різних ацильованих похідних елаготанінів фактично не відрізнялися, що свідчить про більш стабільну електронну та просторову структуру дигаллової кислоти, що не дозволяє використовувати спектроскопію в УФ-області для ідентифікації окремих похідних елаготанінів. ВЕРХ-спектр ацильованих танідів містить додаткові смуги, в тому числі в низькомолекулярній області спектра, що свідчить про появу нових похідних у комбінаторній суміші танідів. ВЕРХ – спектр ацильованих танідів містить додаткові смуги, зокрема в низькомолекулярній області спектра, що свідчить про появу нових похідних у комбінаторній суміші танідів.

INVESTIGATION OF THE STRUCTURE CHANGES OF TANNIDES ACYLATED DERIVATIVES IN THE PROCESS OF SYNTHESIS USING DIFFERENTIATING ELECTRONIC ABSORPTION SPECTROSCOPY

Mustafa Alhoussein, A.Martynov

Key words: gallotannins; ellagitannins; succinylated and maleylated derivatives; differential electronic spectroscopy
A number of acylated derivatives of industrial gallotannin and ellagitannin from alder cones with different substitution degrees of phenolic hydroxyls has been synthesized. The synthesis involved the preparation of a mixture of derivatives with different substitution places of phenolic hydroxyls and different number of substitutions. The synthesis of acylated derivatives was carried out under reflux with the mixture of the modifier with tannides in glacial acetic acid, and recrystallization of the derivatives obtained was performed from the water-ethanol mixture. Succinic and maleic anhydrides were used as modifiers. The primary electronic absorption spectrum and its first and second derivatives – differential electronic absorption spectra were studied. As the result of the study of the electronic absorption spectra of tannides with varying degrees of modification it has been found that significant changes in the spectrum shift of the absorption band of aromatic groups (250-270 nm) is observed only for the acylated gallotannins. Thus, it has been shown that the degree of modification correlates with the degree of the shift of the absorption band, and it allows to use this reaction for identification of the combinatorial derivative of gallotannin. The electronic absorption spectra of various acylated ellagitannins derivatives did not actually differ. It indicates a more stable and rigid electronic and spatial structure of digallic acid, which prevents the use of spectroscopy in the UV region to identify individual combinatorial derivatives of ellagitannins. In HPLC the spectrum of acylated tannins contains additional bands, including the low molecular weight region of the spectrum. It indicates the appearance of new acylated derivatives in the combinatorial mixture of tannides.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ АЦИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТАНИДОВ В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ УФ-СПЕКТРОСКОПИИ

Мустафа Альхуссейн, А.В.Мартынов

Ключевые слова: галлотанин; элаготанин; сукцинилированные и малеилированные производные; дифференциальная электронная спектроскопия

Синтезирован ряд ацилированных производных галлотанина промышленного и элаготанина из шишек ольхи серой с разной степенью замещения фенольных гидроксильных групп. Синтез предусматривал получение смеси производных с разными местами замещения фенольных гидроксильных групп и разным количеством замещений. Синтез ацилированных производных проводили в условиях кипячения смеси модификатора с таннидами в ледяной уксусной кислоте, а перекристаллизацию полученных производных проводили из водно-этанольной смеси. В качестве модификаторов использовали янтарный и малеиновый ангидриды. Исследовали как первичный электронный спектр поглощения, так и первую и вторую его производные – дифференциальные электронные спектры поглощения. В результате изучения электронных спектров поглощения таннидов с различной степенью модификации было установлено, что

значительные изменения спектра со смещением полосы поглощения ароматических групп (250-270 нм) наблюдаются только для ацилированных галлотанинов; было показано, что степень их модификации при этом коррелирует со степенью смещения основной полосы поглощения, что позволяет использовать указанную реакцию для идентификации комбинаторного производного галлотанина. Электронные спектры поглощения различных ацилированных производных эллаготанинов фактически не отличались, что свидетельствует о более стабильной электронной и пространственной структуре дигалловой кислоты и не позволяет использовать спектроскопию в УФ-области для идентификации отдельных производных эллаготанинов. ВЖХ-спектр ацилированных таннидов содержит дополнительные полосы, в том числе в низкомолекулярной области спектра, что свидетельствует о появлении новых производных в комбинаторной смеси таннидов.

Дослідження структури похідних високомолекулярних речовин, що проявляють властивості квазіживих систем, є вельми актуальною проблемою стандартизації лікарських препаратів цієї групи [1]. До цієї групи речовин можна віднести практично всі нерегулярні мультиакцепторні речовини природного походження: дезоксирибонуклеїнові кислоти, рибонуклеїнові кислоти, білки, полісахариди, таніди.

Метою наших досліджень було синтезувати та дослідити динаміку змін «диференційний УФ-спектр/структура» в ряду заміщених похідних ацильованих танідів та дослідити динаміку синтезу вказаних похідних з використанням ВЕРХ. У дослідженні використали похідні галотаніну промислового та елаготаніну з шишок вільхи сірої (*Alnus glutinosa L.*).

Відрізняються елаготаніни від галотанінів не тільки тим, що між мономерами (елаговою кислотою) у структурі полімера існує С-С зв'язок, а й тим, що кожен залишок галлової кислоти пов'язаний з глюкозою естерним зв'язком [2]. Крім того, галотаніни є дуже нестійкими до світла та окиснювачів речовинами, тоді як елаготаніни вже є продуктами окиснення і є стійкими до дії цих зовнішніх факторів [3]. Разом з тим елаготаніни з глюкозою утворюють більш різноманітні похідні, зокрема естерні внутрішньомолекулярні структури [4].

Фактично галотанін (VI) та елаготанін (I) є сумішами продуктів гідролізу повної молекули таніду (рис. 1, 2). Відповідно при розрахунках молекулярної маси та заряду мова буде йти про речовини з найбільшими молекулярними масами, а не про домішки – продукти гідролізу.

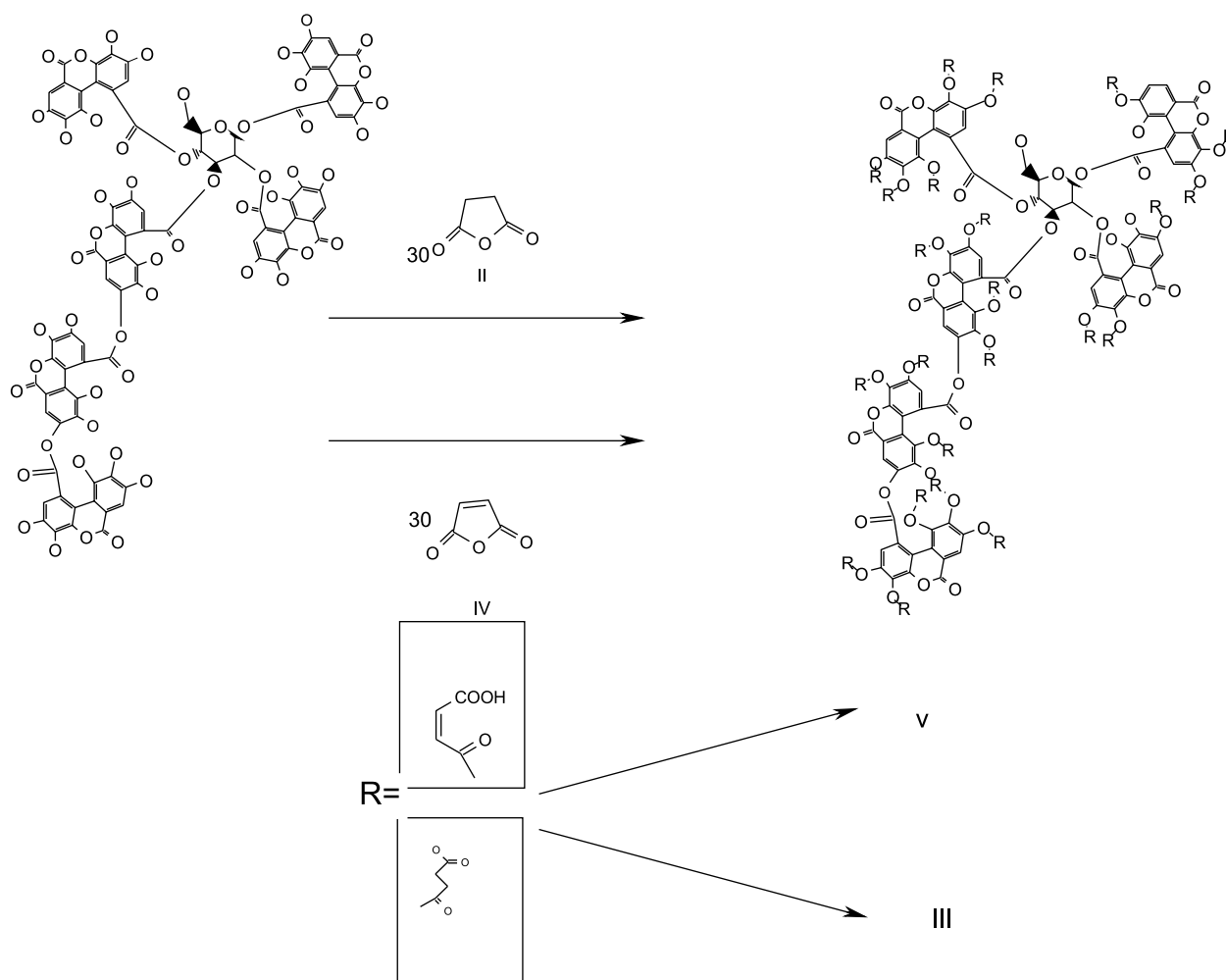


Рис. 1. Схема синтезу сукцинільованого елаготаніну (III) та малеїльованого елаготаніну (V).

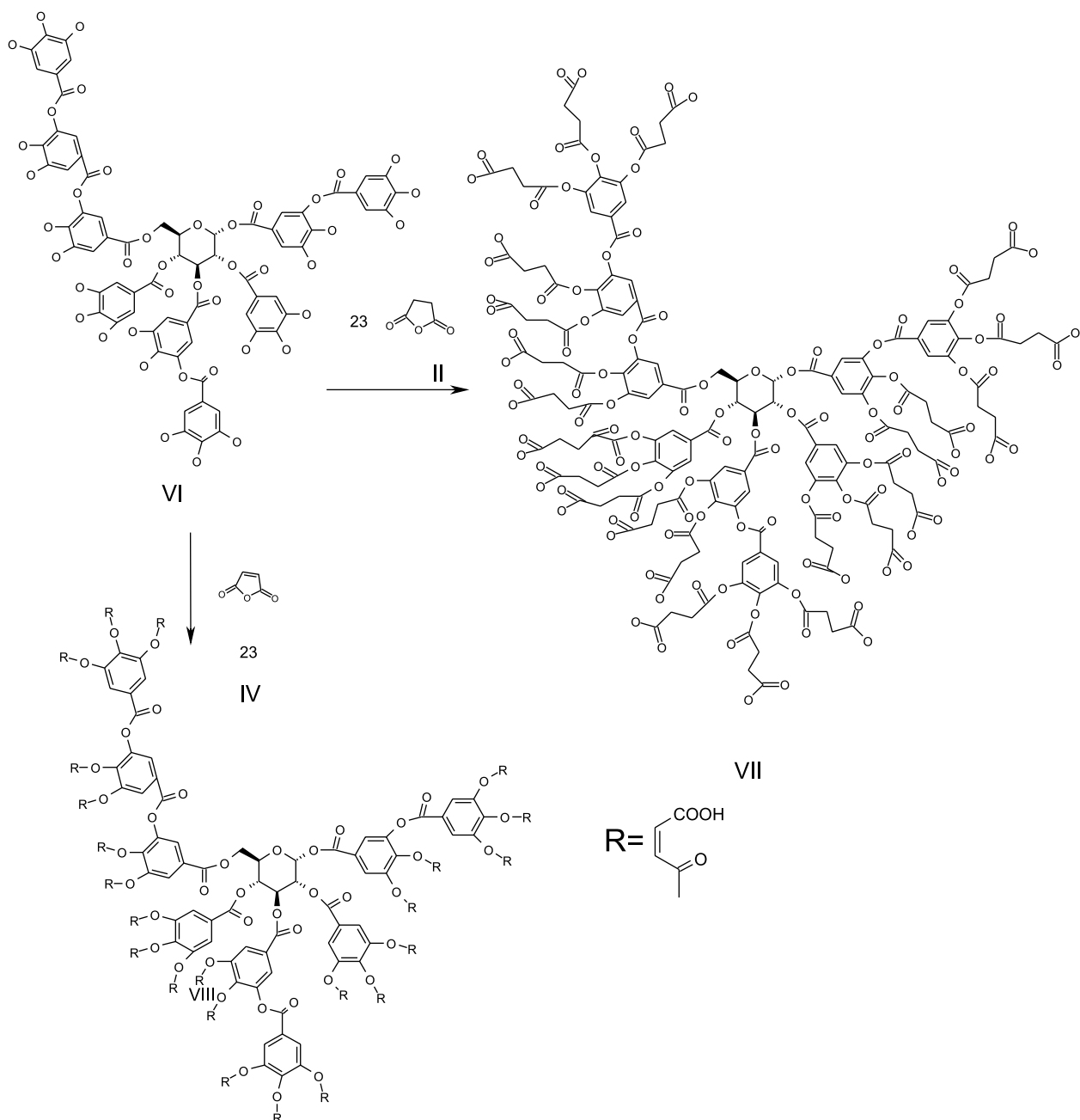


Рис. 2. Схема синтезу сукцинільованих та малейнільованих похідних галотаніну (VII, VIII).

Вказана особливість досліджень цього класу речовин спонукала нас провести дослідження в динаміці синтезу з використанням диференційної УФ-спектроскопії та ВЕРХ з метою встановлення відзнак впливу ацилюючих агентів на галове та елагове ядро танідів.

На рис. 1 та 2 представлені схеми синтезу ацильованих похідних танідів. Різного ступеня ацилювання досягали різним співвідношенням танідів та відповідних ангідридів.

Як вже ми казали раніше, реакцію ацилювання провести кількісно дуже важко у зв'язку з нечіткістю структури первинного таніду. Також практично неможливо провести процедуру валідації методик кількісного аналізу однієї речовини в складі суміші у зв'язку з різним компонентним

складом первинної сировини. Вирахувані фізико-хімічні властивості танідів прив'язані до речовини з максимальною молекулярною масою, а саме до повного таніду. У зв'язку з тим, що саме суміш похідних речовин надає нових біологічних властивостей структурам ацилтанідів, нами був проведений синтез неповністю модифікованих танідів з різним ступенем модифікації за співвідношенням модифіканта та модифікатора.

Для кожного похідного вимірювали УФ-спектри в динаміці синтезу, розраховували їх диференційні похідні першого та другого порядку.

В результаті аналізу первинного спектра поглинання фактично неможливо зробити зрозумілі висновки про структуру речовини у зв'язку з відсутністю чітко виділених смуг поглинання,

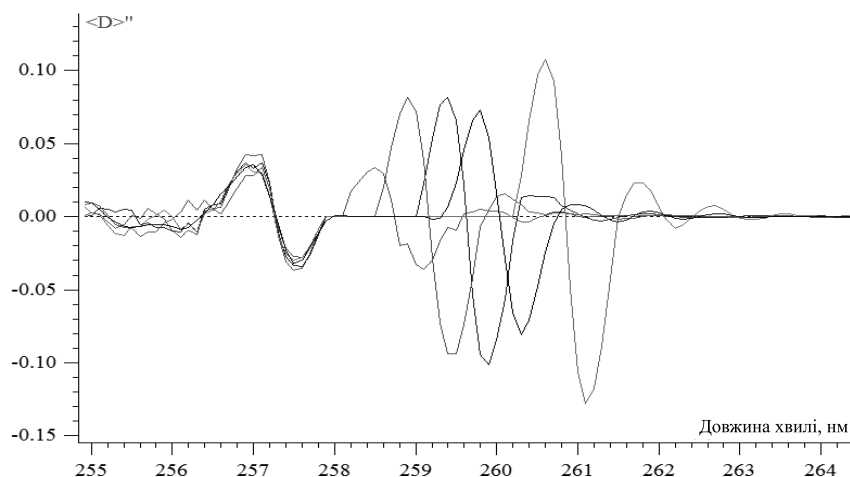


Рис. 3. Диференційний УФ-спектр похідних сукцинілгалотанінів VII (а-с) – друга похідна (смуга при 259 нм зміщується до 260,5 нм при збільшенні ступеня модифікації).

хоча динаміка збільшення ароматичної смуги в залежності від ступеня модифікації явно прослідковується.

Для більш детального аналізу нами були побудовані диференційні спектри (перша та друга похідні) та окреслені основні смуги поглинання.

Більш чіткі зміни в замісниках ароматичного ядра галової кислоти у складі галотанінів при заміщенні явно прослідковуються на спектрі другої похідної композитного спектра, який представлено на рис. 3.

Як видно з рис. 3, прослідковується чітка закономірність між ступенем заміщення фенолів у структурі галотаніну та зрушення смуги поглинання ароматичного ядра, як і було показано для попереднього графіка. При цьому область поглинання до 258 нм залишається незмінною, що свідчить про відсутність впливу ацилювання на глюкпіранозний залишок та на карбоксильні групи галової кислоти. Максимум поглинання при 258,9 нм поступово зміщувався до 259,3 нм для похідно-

го VIIa та до 259,9 нм для похідного VIIb і відповідно до 260,1 нм для похідного VIIc. Найбільш цікавою була інформація про зміни поглинання ароматичних ядер при повному ацилюванні структури (остання смуга). Смуга поглинання повністю модифікованого похідного зміщувалася до 261 нм, що свідчить про значну конформаційну обмеженість структури та підтверджує гіпотезу про повну модифікацію за всіма фенольними гідроксилами структури галової кислоти в галотанінах.

Початкові УФ-спектри як модифікованого, так і немодифікованого похідних елаготанінів Va,b фактично не відрізняються, а смуги поглинання не зрушуються в залежності від ступеня модифікації.

Скоріше за все, це пов'язано з дуже жорсткою структурою елагової кислоти та відсутністю впливу зовнішніх замісників поза ароматичним ядром на саму структуру елагової кислоти.

Для більш детального підтвердження цієї гіпотези були отримані перша та друга похідні від спектра (рис. 4).

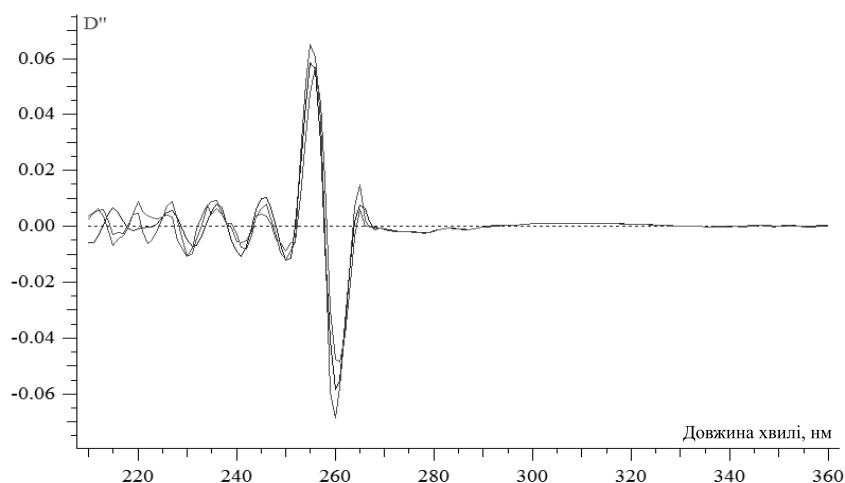


Рис. 4. Накладені УФ-спектри поглинання (друга похідна) елаготанінів Va,b з різними ступенями модифікації та немодифікований I (похідні накладаються одна на одну та практично не відрізняються, що свідчить про більшу стабільність ароматичних кілець дигалової кислоти).

Як видно з рис. 4, модифікація структури елаготанінів не чинить такого впливу на рухомість ароматичного ядра, як для галотанінів.

Відповідно, можна зробити висновки про більш жорстку структуру елаготаніну та його більшу конформаційну стійкість, що корелює з практичною нерозчинністю чистої галової кислоти ані у воді, ані у неполярних розчинниках. Ця відзнака елаготанінів від галотанінів може бути використана в методиках ідентифікації основних діючих речовин при розробці методів контролю якості елаготанінів та запропонована нами для впровадження на ПАТ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод» для контролю якості альтану та альтабору.

Експериментальна частина

Ацилювання таніну (VI) та елаготаніну (I) проводили з використанням бурштинового ангідриду (II) з утворенням сукцинілтаніну (IIIa-c) та сукцинілелаготаніну (VII) та малеїнового ангідриду (IV) [5] з утворенням малеїнілтаніну (Va-c) та малеїнілелаготаніну (VIIIa-c) (рис. 1 та 2).

УФ-спектри отримували на повністю автоматизованому спектрофотометрі Ломо СФ-56 [6]. Довжина щілини 1 мм, кювети – 10 мм, спектр знімали в 0,5% розчині речовин в ізопропанолі.

Синтез повністю сукцинільованого елаготаніну (IIIa)

10^{-4} Моль (0,1885 г) елаготаніну (I) розчиняли у 10 мл концентрованої оцтової кислоти у круглодонній колбі зі зворотним холодильником, додавали $3,0 \cdot 10^{-4}$ Моль (0,3000 г) II, який попередньо розтирали до мілкового порошку в ступці. Суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 60 хв. Відганяли концентровану оцтову кислоту. Кристали, що утворилися, зі стінок колби змивали 10 мл холодної дистильованої води та залишали у випарювальній чашці до повного висихання. Одержану речовину III перекристалізували з водно-метанольної суміші (1:1).

Синтез повністю малеїльованого елаготаніну (Va)

10^{-4} Моль (0,1885 г) елаготаніну (I) розчиняли у 10 мл концентрованої оцтової кислоти у круглодонній колбі зі зворотним холодильником, додавали $1,7 \cdot 10^{-4}$ Моль (0,6935 г) IV. Суміш гріли зі зворотним холодильником протягом 20 хв. Відганяли концентровану оцтову кислоту. Кристали,

що утворилися на стінках колби, змивали 10 мл етанолу та залишали у випарювальній чашці до повного висушування. Одержану речовину V перекристалізували з водно-етанольної суміші (1:1).

Синтез повністю сукцинільованого галотаніну (VIIa)

10^{-4} Моль (0,1549 г) галотаніну (VI) розчиняли у 10 мл концентрованої оцтової кислоти у круглодонній колбі із зворотним холодильником, додавали $1,7 \cdot 10^{-4}$ Моль (0,1700 г) II, який попередньо розтирали до мілкового порошку в ступці. Суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 60 хвилин. Відганяли концентровану оцтову кислоту. Кристали, що утворилися на стінках колби, змивали 10 мл холодної дистильованої води та залишали у випарювальній чашці до повного висихання. Одержану речовину VII перекристалізували з водно-метанольної суміші (1:1).

Синтез повністю малеїнільованого галотаніну (VIIIa)

10^{-4} Моль (0,1549 г) елаготаніну (VI) розчиняли у 10 мл концентрованої оцтової кислоти у круглодонній колбі зі зворотним холодильником, додавали $1,7 \cdot 10^{-4}$ Моль (0,3930 г) IV. Суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 20 хв. Відганяли концентровану оцтову кислоту. Кристали, що утворилися на стінках колби, змивали 10 мл етанолу та залишали у випарювальній чашці до повного висушування. Одержану речовину (VIIIa) перекристалізували з водно-етанольної суміші (1:1).

Висновки

1. У результаті вивчення електронних спектрів поглинання танідів з різним ступенем модифікації було встановлено, що значні зміни спектра зі зсувом смуги поглинання ароматичних кілець (250-270 нм) спостерігаються тільки для ацильованих галотанінів, ступінь їх модифікації пов'язаний зі ступенем зміщення основної смуги поглинання, що дає змогу використати вказану реакцію для ідентифікації похідного галотаніну.

2. Електронні спектри поглинання похідних елаготанінів з різним ступенем ацилювання фактично не відрізнялися, що свідчить про більш стабільну та жорстку електронну та просторову структуру дигалової кислоти, що не дозволяє використовувати спектроскопію в УФ-області для ідентифікації окремих похідних елаготанінів.

Література

1. Martynov A., Farber B., Farber S. *Curr. Med. Chem.*, 2011, Vol. 18, No.22, pp.3431-3436.
2. Okuda T. *New York, Springer*, 1995, 420 p.
3. Juha-Pekka Salminen, Ossipov V. *Naturforsch.*, 2002, Vol. 57, pp.248-253.
4. Haslam E. *Cambridge University Press: Cambridge, UK*, 1989, 273 p.
5. Shemchuk L. A., Chernykh V. P., Martynov A. V. *Zhurnal organichnoi khimii – Journal of Organic Chemistry*, 1997, Vol. 33, No.8, pp.1257-1258.
6. Masoud M. S., Hagagg S. S., Ali A. E., Nasr N. M. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2012, Vol. 94, pp.256-264.

Надійшла до редакції 28.01.2014 р.

УДК 615.076

ВПЛИВ НОВИХ ПОТЕНЦІЙНИХ ФУНГІСТАТИЧНИХ АГЕНТІВ НА ДЕЯКІ ФУНКЦІЇ КЛІТИН КРОВІ ЛЮДИНИ

Л.Є.Калашнікова, І.М.Коперник, І.В.Семенюта, Л.П.Голод, Д.М.Година, Л.О.Метелиця

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
02660, м. Київ, вул. Мурманська, 1. E-mail: metelitsa@bpci.kiev.ua**Ключові слова:** *in vitro* скринінг; оксазолі; азотовмісні бісфосфонати; функціональні біосенсори

Для *in vitro* скринінгу нових біологічно активних функціонально заміщених оксазолів та азотовмісних бісфосфонатів з відомою фунгістатичною активністю використовували як біосенсори еритроцити та лейкоцити крові людини. Встановлено, що жодна з досліджуваних сполук не виявила гемолітичної дії у реакції осмотичного гемолізу еритроцитів крові. Всі сполуки достовірно змінювали швидкість осідання еритроцитів крові – функціонально заміщені оксазолі знижували реакцію приблизно на 70%, а азотовмісні бісфосфонати збільшували приблизно на 30%. Встановлена реактивність може свідчити про високу тропність досліджуваних сполук до адренорецепторів мембрани клітин. Дана активність може бути використана для характеристики та прогнозування ряду інших потенційних ефектів сполук-антимікотиків, що вивчалися. Результати НСТ-тесту свідчать, що функціонально заміщені оксазолі є активаторами антимікробного потенціалу нейтрофільних лейкоцитів крові і можуть розглядатися як потенційні стимулятори реакційної здатності неспецифічного імунітету людини. Отримані експериментальні дані суттєво розширюють спектр біологічних ефектів синтезованих сполук-фунгістатиків і підтверджують перспективність їх подальшого вивчення як потенціальних антимікотичних засобів. Скринінг *in vitro* з використанням як біосенсорів клітин крові людини є важливою частиною дослідження потенційних лікарських засобів і може бути рекомендований для тестування нових біологічно активних сполук з відомою біологічною активністю.

THE EFFECT OF NEW POTENTIAL FUNGISTATIC AGENTS ON SOME HUMAN BLOOD CELLS FUNCTIONS L.E.Kalashnikova, I.M.Kopernyk, I.V.Semenyuta, L.P.Golod, D.M.Hodyna, L.O.Metelytsya

Key words: *in vitro* screening; oxazoles; nitrogen-containing bisphosphonates; functional biosensors

Erythrocytes and neutrophilic leukocytes of human blood have been used as biosensors for *in vitro* screening of new biologically active functionally substituted oxazoles and nitrogen-containing bisphosphonates with the known fungistatic activity. It has been found that none of the compounds under research do not reveal the hemolytic action in the reaction of osmotic hemolysis of human red blood cells. For all compounds tested the erythrocyte sedimentation rate is changed. The functionally substituted oxazoles decreased the reaction rate approximately by 70%, and nitrogen-containing bisphosphonates increased it approximately by 30%. The reactivity found can indicate high affinity of the compounds studied to erythrocyte membranes adrenoreceptors. It can be used for characteristics and prediction of a number of other potential effects of the antimycotical compounds tested. According to the NBT-test the functionally substituted oxazoles are activators of the antimicrobial potential of neutrophilic leukocytes and can be considered as potential stimulators of nonspecific human immunity reactivity. The experimental data obtained significantly expand the range of biological effects of the fungistatic compounds synthesized and confirm perspectiveness of their further study as antimycotic agents. *In vitro* screening with the use of human blood cells as biosensors is an important part of potential drugs research and can be recommended for testing new biologically active compounds with the known biological activity.

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФУНГИСТАТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА НЕКОТОРЫЕ ФУНКЦИИ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Л.Е.Калашникова, И.Н.Коперник, И.В.Семенюта, Л.П.Голод, Д.Н.Година, Л.А.Метелиця

Ключевые слова: *in vitro* скрининг; оксазолы; азотсодержащие бисфосфонаты; функциональные биосенсоры

Для *in vitro* скрининга новых биологически активных функционально замещенных оксазолов и азотсодержащих бисфосфонатов с известной фунгистатической активностью использовали как биосенсоры эритроциты и лейкоциты крови человека. Установлено, что ни одно из соединений не проявило гемолитического действия в реакции осмотического гемолиза эритроцитов крови. Все исследованные соединения достоверно изменяли скорость оседания эритроцитов – функционально замещенные оксазолы снижали скорость реакции приблизительно на 70%, а азотсодержащие бисфосфонаты увеличивали – приблизительно на 30%. Установленная реактивность может свидетельствовать о высокой тропности исследуемых соединений к адренорецепторам мембраны клеток. Данная активность может быть использована для характеристики и прогнозирования ряда других потенциальных эффектов изученных соединений-антимикотиков. Результаты НСТ-теста свидетельствуют о том, что функционально замещенные оксазолы являются активаторами антимикробного потенциала нейтрофильных лейкоцитов крови и могут рассматриваться как потенциальные стимуляторы реакционной способности неспецифического иммунитета человека. Полученные экспериментальные данные существенно расширяют спектр биологических эффектов синтезированных соединений-фунгистатиков и подтверждают перспективность их дальнейшего изучения как потенциальных антимикотических средств. Скрининг *in vitro* с использованием как биосенсоров клеток крови человека является важной частью исследования потенциальных лекарственных средств и может быть рекомендован для исследования новых биологически активных соединений с известной биологической активностью.

Раніше нами було синтезовано ряд нових функціонально заміщених оксазолів (ФЗО) і азотовмісних бісфосфонатів (АБФ) та встановлено їх високу фунгістатичну активність. В основі механізму дії синтезованих сполук лежить пригнічення активності ферментів біосинтезу ергостеролу гриба *Candida albicans* – С14- α -деметилази та фарнезилдифосфатсинтази [1-3, 25].

Як потенційні антимікотичні засоби досліджували ФЗО та АБФ при потрапленні до організму можуть змінювати, підвищуючи або знижуючи, показники морфофункціонального стану клітин крові людини, що необхідно враховувати при їх використанні.

Для скринінгу *in vitro* вищезазначених біологічно активних сполук були використані як біосенсори еритроцити та лейкоцити крові людини, здатні *in vitro* функціонально реагувати на будь-який досліджуваний фактор. Відомо, що клітини крові широко використовуються не лише для функціонального скринінгу біологічно активних речовин, але й для прогностичного скринінгу з метою спрямованого синтезу та визначення дії біологічно активної речовини, а також прогнозування її токсичності без проведення тестів на лабораторних тваринах [4-6].

Більше того, метаболічна активність клітин крові – еритроцитів та лейкоцитів тісно пов'язана між собою. Зміни фізико-хімічних, морфофункціональних або агрегаційних властивостей мембрани еритроцитів відображають рівень окиснювально-відновного потенціалу лейкоцитів, що, у свою чергу, є показником імунотоксичності досліджуваної речовини [4, 7-9].

Метою роботи є скринінг *in vitro* нових біологічно активних сполук – потенційних фунгістатиків на моделі клітин-біосенсорів крові людини.

Матеріали та методи

Кінцева концентрація всіх досліджуваних сполук складала $1 \cdot 10^{-4}$ М.

Для реєстрації змін показників фізико-хімічних та агрегаційних властивостей мембрани еритроцитів та окиснювально-відновного потенціалу лейкоцитів крові в роботі використовували реакцію осмотичного гемолізу еритроцитів (ОГЕ) [10-12], швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) [13-16] та тест відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) нейтрофільними лейкоцитами крові людини [17-19].

Реакцію ОГЕ крові людини проводили модифікованим методом Л.І. Ідельсона [10]. Метод полягає у кількісній оцінці ступеня гемолізу клітин у гіпотонічних розчинах хлориду натрію (NaCl). Після інкубації клітин з досліджуваною сполукою та центрифугування сформовану надосадкову рідину фотоелектроколориметрували при довжи-

ні хвилі 500-560 нм проти контрольної проби. Процент гемолізу еритроцитів визначали, порівнюючи величини екстинції надосадкової рідини у кожному зразку з екстинцією, прийнятою за 100% (контроль) за формулою:

$$\% \text{ гемолізу} = E_x \cdot 100 / E_1, \quad (1)$$

де: E_1 – екстинція надосадкової рідини у зразку з 0,1% розчином NaCl;

E_x – екстинція надосадкової рідини у зразку;

100 – % гемолізу у зразку з 0,1% розчином NaCl.

Вплив досліджуваних сполук на реакцію ШОЕ оцінювали за методом Т.П.Панченкова [13]. Для цього у капіляр із кров'ю з висотою стовпчика 100 мм додавали відповідну сполуку, зразки встановлювали в апарат Панченкова і після інкубації визначали висоту стовпчика плазми, сформованого при осіданні еритроцитів. Результат фіксували у мм/год та виражали у відсотках по відношенню до контролю – зразка без додавання досліджуваної сполуки.

Оцінку окиснювально-відновного потенціалу периферичних нейтрофілів крові людини проводили за допомогою НСТ-тесту (тесту відновлення нітросинього тетразолію) [17]. В основі тесту лежить процес піноцитозу, накопичення та відновлення із перетворенням розчинного безбарвного нітросинього тетразолію у нерозчинний темно-синій формазаза, що візуально ідентифікується у нейтрофілах – фагоцитах.

Для цього зразки крові у 0,2% водному розчині НСТ інкубували з відповідною досліджуваною сполукою, а потім із отриманої суміші готували мазки, які фарбували розчином нейтрального червоного та мікроскопували. У мазках підраховували кількість формазазаактивованих клітин (фагоцитів) на 100 підрахованих нейтрофілів (ДАН – частка активованих нейтрофілів). За кількістю формазаза у клітинах оцінювали їх активність в умовних одиницях і підраховували індекс активності нейтрофілів (ІАН) за формулою:

$$\text{ІАН} = (0 \cdot N_0 + 1 \cdot N_1 + 2 \cdot N_2 + 3 \cdot N_3) / 100, \quad (2)$$

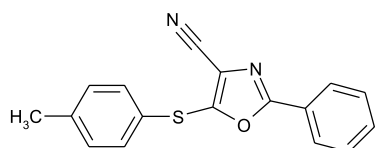
де: N_0, N_1, N_2, N_3 (%) – кількість нейтрофілів з активністю 0, 1, 2, 3 та 4 бали відповідно.

Всі отримані експериментальні результати досліджень були статистично оброблені методами варіаційного аналізу [20].

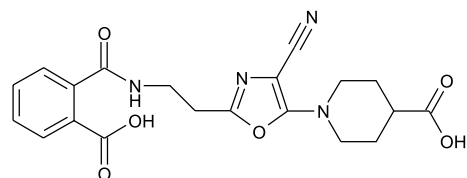
Результати та їх обговорення

На рисунку наведені структурні формули сполук – потенційних фунгістатиків, які були досліджені у роботі.

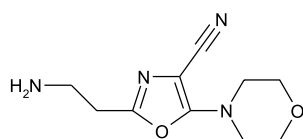
У табл. 1 представлені результати дослідження впливу нових ФЗО та АБФ на показники реакцій ОГЕ та ШОЕ.



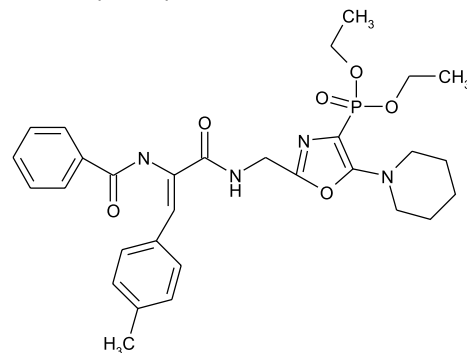
(ФЗО 1)



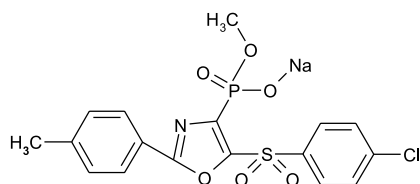
(ФЗО 2)



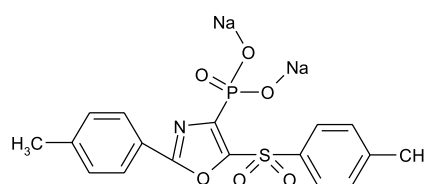
(ФЗО 3)



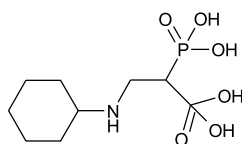
(ФЗО 4)



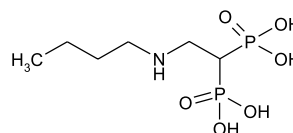
(ФЗО 5)



(ФЗО 6)



(АБФ 1)



(АБФ 2)

Рис. Структурні формули досліджуваних сполук.

Дані табл. 1 свідчать, що жодна із досліджуваних сполук не виявила достовірного впливу на реакцію ОГЕ. При цьому всі досліджені ФЗО та АБФ достовірно змінювали ШОЕ – АБФ у середньому на 35% прискорювали, а ФЗО у середньому на 70% пригнічували реакцію.

У табл. 2 представлені результати впливу досліджуваних сполук на показники НСТ-тесту. За даними табл. 2 можна зробити висновок, що АБФ не проявили достовірного впливу ані на показники ДАН, ані ІАН, тобто додавання у зразки крові досліджуваних сполук не викликало активації нейтрофільних лейкоцитів.

Всі досліджувані ФЗО виявили достовірний вплив на обидва показники НСТ-тесту – додавання у зразки крові вказаних сполук викликало не тільки збільшення кількості активованих клітин,

але й суттєво підвищувало ступінь їх активації – у середньому на 30%.

Таким чином, на основі вищезазначених фактів нами встановлено, що всі сполуки – це потенційні антимікотики, які не мають гемолітичної дії.

Отримані нами дані про достовірний, але протилежний вплив АБФ та ФЗО на реакцію ШОЕ є важливими у комплексному *in vitro* скринінгу сполук, оскільки дають можливість з високою ймовірністю спрогнозувати їх дію *in vivo*. Враховуючи той факт, що в основі реакції ШОЕ лежить здатність еритроцитів крові до агрегації, що контролюється адренорецепторами мембрани клітини, можна стверджувати, що тропність досліджених сполук до адренорецепторного апарату є однією з важливих характеристик їх потенційних біологічних ефектів [21, 22].

Таблиця 1

Вплив досліджуваних ФЗО та АБФ на реакції
ОГЕ та ШОЕ, % до контролю, $M \pm m$, (n=6)

Шифр сполуки	ОГЕ, % до контролю	ШОЕ, % до контролю
ФЗО 1	97,4±2,2	26,3±2,0*
ФЗО 2	94,2±3,1	34,0±1,7*
ФЗО 3	96,5±2,7	24,7±1,5*
ФЗО 4	95,1±2,4	31,0±2,1*
ФЗО 5	98,6±2,6	27,1±1,3*
ФЗО 6	95,7±4,3	28,4±1,4*
АБФ 1	98,8±3,3	136,2±8,0*
АБФ 2	96,3±3,8	134,4±6,6*

Примітка: * – значення достовірно відрізняється від контролю (p<0,05).

На основі експериментальних даних про вплив вивчених сполук на показники НСТ-тесту – АБФ не впливали, а ФЗО на 30% збільшували активність нейтрофілів крові – можна зробити висновок, що ФЗО є активаторами киснево-залежних внутрішньоклітинних мікробіцидних систем нейтрофілів-фагоцитів, які контролюються НАДФ-Н-оксидазою. При цьому відомо, що поява у клітині активних форм кисню може приводити не тільки до

Таблиця 2

Вплив ФЗО та АБФ на показники НСТ-тесту,
% до контролю, $M \pm m$, (n=6)

Шифр сполуки	ДАН, % до контролю	ІАН, % до контролю (n=6)
ФЗО 1	134,3±5,5*	126,6±7,1*
ФЗО 2	128,7±6,8*	116,3±6,4*
ФЗО 3	141,1±3,2*	132,2±5,7*
ФЗО 4	130,6±4,2*	126,1±7,0*
ФЗО 5	126,0±8,1*	131,4±4,9*
ФЗО 6	136,2±4,3*	124,5±6,6*
АБФ 1	102,2±0,3	104,4±0,2
АБФ 2	111,8±0,1	103,7±0,5

Примітка: * – значення достовірно відрізняються від контролю (p<0,05).

збільшення її антимікробного потенціалу, але й до активації тканинного метаболізму та реакційної здатності неспецифічного імунітету людини [23, 24].

Отримані у роботі експериментальні дані суттєво розширюють відомий спектр біологічних ефектів нових АБФ та ФЗО, що мають високу фунгістатичну активність, а також підтверджують перспективність їх подальшого вивчення як потенційних антимікотичних лікарських засобів.

Література

- Pil'о S. G., Brovarec V. S., Vinogradova T. K., Golovchenko A. V., Drach B. S. *Zhurnal obshhej khimii – Journal of general chemistry*, 2002, Vol. 72, No.11, pp.1818-1827.
- Kopernyk I. M., Blagodatnyj V. M., Petrenko O. V., Kalashnikova L. E., Prokopenko V. V., Kondratjuk K. M., Lukashuk O. I., Golovchenko O. V., Chumachenko S. A., Shablykin O. V., Metelytsia L. O., Brovarec V. S. *Ukrainica Bioorganica Acta*, 2011, Vol. 72, No.2, pp.57-68.
- Prokopenko V., Kovalishyn V., Shevchuk M., Kopernyk I., Metelytsia L., Romanenko V., Mogilevich S., Kukhar V. *Current Drug Discovery Technologies*, 2014, Vol. 11, No.2, pp.1-12.
- Kondakov S. E., Mel'nikov M. Ja., Kozachenko P. N., Alekseev K. V. *Zhurnal "Vestnik Moskovskogo Universiteta" – Journal "Vestnik Moskovskogo Universiteta"*, 2009, P. 2, Chemistry, Vol. 50, No.4, pp.153-156.
- Brigden M. L. *American Family Physician*, 1999, Vol. 60, No.5, pp.1443-1450.
- Lucantoni G., Pietraforte D., Matarrese P., Gambardella L., Metere A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, Vol. 510, pp.300-306.
- Di Masi J. A. *Journal of Health Economics*, 2003, Vol. 22, pp.151-185.
- Di Masi J. A. *Journal of Managerial and Decision Economics*, 2007, Vol.28, pp.469-479.
- Voeikov V., Asfaramov R., Bulargina Yu. S. et al. *Abstracts of Papers. III International Multi-Conference "Information Society IS'2000 New Science of Consciousness"*, Ljubljana, 2000, pp.21-28.
- Kassirskij I. A. *Spravochnik po funkcional'noj diagnostike (Handbook of functional diagnostics)*, Moscow, 1970, p.401.
- Brumen M., Glaser R., Svetina S. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1979, Vol. 6, No.2, pp.227-243.
- Potapenko A. Ja., Kvjagova A. A., Tikhomirov A. M. *RGMU (RNRMU)*, 2006, p.16.
- Voejkov V. L. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk (Advances of Physiological Sciences)*, 1998, Vol.29, No.4, pp.55-73.
- Zlonis M. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1993, Vol. 13, pp.787-800.
- Plebani M. *American Journal of Clinical Pathology*, 2002, Vol.17, No.4, pp.621-626.
- Tabuchi T., Tominaga H., Tatsumi N. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2002, Vol.33, No.2, pp.151-154.
- Viksman M. E., Majanskij A. N. *Sposob ocenki funkcional'noj aktivnosti nejtrofilov cheloveka po reakcii vosstanovlenija nitrosinogo tetrazolija. Metodicheskie rekomendacii (Method of assessing the functional activity of human neutrophils by the reduction reaction of nitroblue tetrazolium. guidelines)*, Kazan', 1979, pp.11.
- Berton G., Lowell C.A. *Cell Signaling*, 1999, Vol. 11, pp.621-635.
- Cai T. Q., Wright S. D. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, Vol. 270, pp.14358-14365.
- Komarov Ju. M. *Rukovodstvo (Handbook)*, Moscow, Med. Publ., 2001, p.352.
- Brigden M. *Postgraduate Medical Journal*, 1998, Vol. 103, No.5, pp.257-262.
- Miao G. *Archives of Medical Research*, 2002, Vol. 33, No.5, pp.506-509.
- Tret'jakova I. E. *Rol' sekretornykh produktov nejtrofilov v reguljacii local'nykh reakcij vospalenija i immuniteta (Role of neutrophil secretory products in the regulation of local inflammation and immune reactions)*, the thesis of the doctor medical Sciences, Cheljabinsk, 2003, pp.407.
- Hampton M. B., Krittler A. J., Winterbourn C. C. *Blood*, 1998, Vol. 92, pp.3007-3017.
- Lukashuk O. I., Kondratjuk K. K., Golovchenko A. V., Brovarets V. S., Kukhar V. P. *Heteroatom Chemistry*, 2013, Vol. 24, No.4, pp.289-297.

Надійшла до редакції 07.02.2014 р.

ЗМІСТ / CONTENTS / СОДЕРЖАНИЕ

(S)-(+)-1-(2-ПІРОЛІДИНИЛМЕТИЛ)ПІРОЛІДИН – ЕФЕКТИВНИЙ ОРГАНOKАТАЛІЗАТОР АСИМЕТРИЧНОГО СИНТЕЗУ / В.М.Ткачук, В.М.Шоба, В.А.Сукач, М.В.Вовк	3
(S)-(+)-1-(2-pyrrolidinylmethyl)pyrrolidine – an effective catalyst of asymmetric synthesis / V.M.Tkachuk, V.M.Shoba, V.A.Sukach, M.V.Vovk	
(S)-(+)-1-(2-пирролидинилметил)пирролидин – эффективный катализатор асимметрического синтеза / В.Н.Ткачук, В.М.Шоба, В.А.Сукач, М.В.Вовк	
SYNTHESIS AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF [(9-R ¹ -10-R ² -3-R-2-ОХО-2H-[1,2,4]-ТРИАЗИНО[2,3-с]КВИНАЗОЛИН-6-УЛ)ТНІО]АЦЕТАМИДОВІ ДЕРИВАТИВИ З ФРАГМЕНТАМИ КАРКАСНИХ АМІНІВ / І.С.Носуленко, О.Ю.Воскобойник, Г.Г.Берест, С.Л.Сафронюк, С.І.Коваленко, А.М.Кацев, Р.С.Синяк, В.О.Пальчиков.....	17
Синтез та антивірусна активність похідних [(9-R ¹ -10-R ² -3-R-2-ОКСО-2H-[1,2,4]-триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)тіо]ацетамідів з фрагментами каркасних амінів / І.С.Носуленко, О.Ю.Воскобойник, Г.Г.Берест, С.Л.Сафронюк, С.І.Коваленко, А.М.Кацев, Р.С.Синяк, В.О.Пальчиков	
Синтез и противовирусная активность производных [(9-R ¹ -10-R ² -3-R-2-ОКСО-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]ацетамидов с фрагментами каркасных аминов / И.С.Носуленко, А.Ю.Воскобойник, Г.Г.Берест, С.Л.Сафронюк, С.И.Коваленко, А.М.Кацев, Р.С.Синяк, В.А.Пальчиков	
ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАЛЕЖНОСТІ «ХІМІЧНА СТРУКТУРА – АНТИГІПОКСИЧНА ДІЯ» В РЯДУ ПОХІДНИХ ІНДОЛУ ТА 2-ОКСІНДОЛУ, ЯКІ МІСТЯТЬ ЕТИЛАМІНОВИЙ ФРАГМЕНТ / Р.Г.Редькін, В.П.Черних, Л.А.Шемчук, Н.А.Цубанова, С.Ю.Штриголь.....	28
The investigation of the “chemical structure – antihypoxic action” dependence in a series of indole and 2-oxindole derivatives containing the ethylamine fragment / R.Gr.Redkin, V.P.Chernykh, L.A.Shemchuk, N.A.Tsubanova, S.Yu.Shtrygol	
Исследование зависимости «химическая структура – антигипоксическое действие» в ряду производных индола и 2-оксиндола, содержащих этиламиноый фрагмент / Р.Г.Редькин, В.П.Черных, Л.А.Шемчук, Н.А.Цубанова, С.Ю.Штриголь	
CALIX[4]ARENE α -HYDROXYMETHYLPHOSPHONIC ACIDS AS POTENTIAL INHIBITORS OF PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASES / V.V.Trush, V.Yu.Tanchuk, S.O.Cherenok, V.I.Kalchenko, A.I.Vovk.....	39
Калікс[4]арен α -гідроксифосфонові кислоти як потенційні інгібітори протеїнтирозинфосфатаз / В.В.Труш, В.Ю.Танчук, С.О.Черенок, В.І.Кальченко, А.І.Вовк	
Каликс[4]арен α -гидроксифосфоновые кислоты как потенциальные ингибиторы протеинтирозинфосфатаз / В.В.Труш, В.Ю.Танчук, С.О.Черенок, В.И.Кальченко, А.И.Вовк	
DIRECTED SYNTHESIS OF POTENTIAL ANTITUMOR SUBSTANCES AMONG DERIVATIVES OF 3-MERCAPTO4-(PYRROL-1-YL)-5-CYCLOHEXYL-1,2,4-TRIAZOLE(4H) / N.B.Saidov, V.A.Georgiyants, A.M.Demchenko.....	43
Цілеспрямований синтез потенційних протипухлинних субстанцій в ряду похідних 3-меркапто-4-(1H-пірол-1-іл)-5-циклогексил-1,2,4-триазолу(4H) / Н.Б.Саїдов, В.А.Георгіянец, А.М.Демченко	
Целенаправленный синтез потенциальных противоопухолевых субстанций в ряду производных 3-меркапто-4-(1H-пиррол-1-ил)-5-циклогексил-1,2,4-триазола(4H) / Н.Б.Саидов, В.А.Георгиянец, А.М.Демченко	
СИНТЕЗ 7-АРИЛ-6,7-ДИГІДРОТЕТРАЗОЛО[1,5- α]ПІРИМІДИН-5(4H)-ОНІВ / Н.В.Світлична, В.В.Бородіна, В.В.Ліпсон, В.І.Мусатов.....	47
Synthesis of 7-aryl-6,7-dihydrotetrazolo[1,5- α]pyrimidin-5(4H)-ones / N.V.Svitlichna, V.V.Borodina, V.V.Lipson, V.I.Musatov	
Синтез 7-арил-6,7-дигидротетразоло[1,5- α]пиримидин-5(4H)-онов / Н.В.Светличная, В.В.Бородина, В.В.Липсон, В.И.Мусатов	
N-БЕНЗИЛ-4-ГИДРОКСИ-2-ОКСО-1-(2-ЦИАНОЭТИЛ)-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОКСАМИДЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНАЛЬГЕТИКИ / І.В.Українець, О.В.Горохова, К.В.Андреева, А.А.Давиденко	51
N-Benzyl-1-(2-cyanoethyl)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydro-3-quinolinecarboxamides as promising analgesics / I.V.Ukrainets, O.V.Gorokhova, X.V.Andreeva, A.A.Davidenko	
N-Бензил-4-гідрокси-2-оксо-1-(2-ціаноетил)-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксаміди як перспективні анальгетики / І.В.Українець, О.В.Горохова, К.В.Андреева, О.О.Давиденко	

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 1-ФЕНИЛ-5-ХЛОРО-1Н-ПИРАЗОЛ-4-КАРБОКСАМИДА И 1-ФЕНИЛ-N-ФОРМИЛ-5-ХЛОРО-1Н-ПИРАЗОЛ-4-КАРБОКСАМИДА С ГИДРАЗИНГИДРАТОМ / А.О.Гуренко, Б.М.Хутова, С.В.Ключко, А.Н.Василенко, В.С.Броварец.....	56
Interaction of 5-chloro-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazole-4-carboxamide and 5-chloro- <i>N</i> -formyl-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazole-4-carboxamide with hydrazine hydrate / A.O.Gurenko, B.M.Khytova, S.V.Klyuchko, O.M.Vasilenko, V.S.Brovarets	
Взаємодія 1-феніл-5-хлоро-1 <i>H</i> -піразол-4-карбоксаміду і 1-феніл- <i>N</i> -форміл-5-хлоро-1 <i>H</i> -піразол-4-карбоксаміду з гідразингідратом / А.О.Гуренко, Б.М.Хутова, С.В.Ключко, О.М.Василенко, В.С.Броварець	
МОДЕЛЮВАННЯ 3D ФАРМАКОФОРІВ У МОЛЕКУЛАХ ПОХІДНИХ 5,7-ДИМЕТИЛ-6-ФЕНІЛАЗО-3Н-ТІАЗОЛО[4,5- <i>b</i>]ПІРИДИН-2-ОНУ / О.В.Кленіна, Т.І.Чабан, В.В.Огурцов, І.Г.Чабан, І.Я.Голос.....	60
3 <i>D</i> Pharmacophore modeling in the molecules of 5,7-dimethyl-6-phenylazo-3 <i>H</i> -thiazolo[4,5- <i>b</i>]pyridine-2-one derivatives / O.V.Klenina, T.I.Chaban, V.V.Ogurtsov, I.G.Chaban, I.Ya.Golos	
Моделирование 3 <i>D</i> фармакофоров в молекулах производных 5,7-диметил-6-фенилазо-3 <i>H</i> -тиазоло[4,5- <i>b</i>]пиридин-2-она / Е.В.Кленина, Т.И.Чабан, В.В.Огурцов, И.Г.Чабан, И.Я.Голос	
THE REACTIVITY OF <i>N</i> -PHENYLANTHRANILIC ACIDS DERIVATIVES. XXV. KINETIC PARAMETERS OF ACTIVATION AND ISOPARAMETRICITY OF THE REACTION OF THE ALKALINE HYDROLYSIS OF METHYL ESTERS OF SUBSTITUTED 4,5-DIMETHOXY- <i>N</i> -PHENYLANTHRANILIC ACIDS IN THE BINARY DIOXANE-WATER SOLVENT / S.G.Isaev, O.M.Sviechnikova, A.O.Devyatkina, T.A.Kostina.....	69
Реакційна здатність похідних <i>N</i> -фенілантранілових кислот. XXV. Кінетичні параметри активації та ізопараметричність реакції лужного гідролізу метилових естерів заміщених 4,5-диметокси- <i>N</i> -фенілантранілових кислот у бінарному розчиннику діоксан-вода / С.Г.Ісаєв, О.М.Свєчнікова, А.О.Дев'яткіна, Т.А.Костіна	
Реакционная способность производных <i>N</i> -фенилантраниловых кислот. XXV. Кинетические параметры активации и изопараметричность реакции щелочного гидролиза метиловых эфиров замещенных 4,5-диметокси- <i>N</i> -фенилантраниловых кислот / С.Г.Исаев, Е.Н.Свечникова, А.А.Девяткина, Т.А.Костина	
ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМІН СТРУКТУРИ АЦИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ ТАНИДІВ У ПРОЦЕСІ СИНТЕЗУ З ВИКОРИСТАННЯМ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ УФ-СПЕКТРОСКОПІЇ / Мустафа Альхуссейн, А.В.Мартинов	74
Investigation of the structure changes of tannides acylated derivatives in the process of synthesis using differentiating electronic absorption spectroscopy / Mustafa Alhussein, A.Martynov	
Исследование изменений структуры ацилированных производных таннидов в процессе синтеза с использованием дифференциальной УФ-спектроскопии / Мустафа Альхуссейн, А.В.Мартынов	
ВПЛИВ НОВИХ ПОТЕНЦІЙНИХ ФУНГІСТАТИЧНИХ АГЕНТІВ НА ДЕЯКІ ФУНКЦІЇ КЛІТИН КРОВІ ЛЮДИНИ / Л.Є.Калашнікова, І.М.Коперник, І.В.Семенюта, Л.П.Голод, Д.М.Година, Л.О.Метелиця.....	79
The effect of new potential fungistatic agents on some human blood cells functions / L.E.Kalashnikova, I.M.Kopernyk, I.V.Semenyuta, L.P.Golod, D.M.Hodyna, L.O.Metelytsya	
Влияние новых потенциальных фунгистатических агентов на некоторые функции клеток крови человека / Л.Е.Калашникова, И.Н.Коперник, И.В.Семенюта, Л.П.Голод, Д.Н.Година, Л.А.Метелица	