

© Коллектив авторов, 2005

Г. Л. Русинов¹, Н. И. Латош¹, Р. И. Ишметова¹, М. А. Кравченко²,
И. Н. Ганебных¹, В. А. Соколов², О. Н. Чупахин¹

СИНТЕЗ И ТУБЕРКУЛОСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТОК СИММ-ТЕТРАЗИНА

¹ Институт органического синтеза Уральского отделения РАН, Екатеринбург;

² Уральский НИИ Фтизиопульмонологии, Екатеринбург.

Получены продукты нуклеофильного замещения 3,5-диметилпиразолильного остатка в 3,6-бис(3,5-диметилпиразол-1-ил)-5-тетразине на метиловые эфиры аминокислот. Для одного из 7 соединений уровень туберкулоцидного действия составил 0,6 мкг/мл. Напротив, два соединения в ряду стимулировали рост колоний микобактерий.

Аминокислоты являются основой для азотистого питания туберкулезных микобактерий в тканевой среде. Вследствие этого ряд аминокислот (например, аспарагин, глутамин, аланин) нашли применение при создании синтетических питательных сред [1]. В то же время, введение аргинина, метионина и некоторых других аминокислот увеличивает резистентность к туберкулезу [2], лечение которого в настоящее время осложняется распространением лекарственно устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ). Поэтому актуально создание новых туберкулостатических средств, отличающихся от известных по химическому строению и механизму действия. Полиазотсодержащие гетероциклы интересны как потенциальные туберкулостатики, поскольку среди них найдены ингибиторы ферментов микобактерии туберкулеза, в частности, ингибиторы дигидрофолатредуктазы [3]. Недавно нами были обнаружены противотуберкулезные свойства 2,5-дизамещенных тетразолов [4].

В развитие работ по поиску новых препаратов для лечения туберкулеза мы синтезировали соединения, сочетающие в своей структуре остатки аминокислот и ядро 1,2,4,5-тетразина.

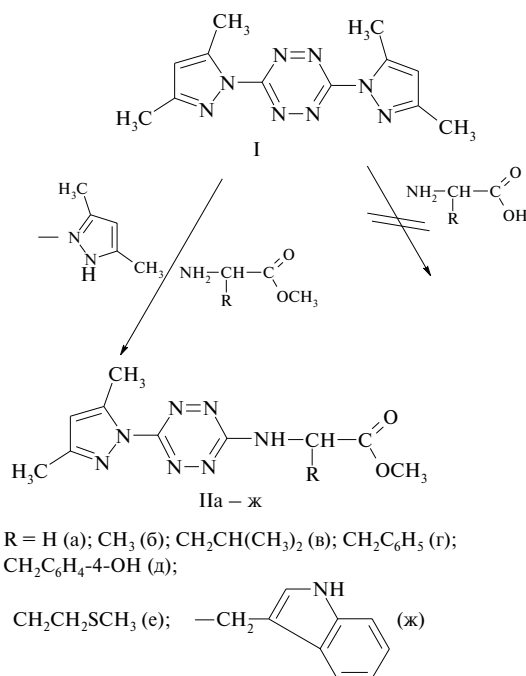
В настоящей статье сообщается о реакции 3,6-ди-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-1,2,4,5-тетразина (I) с эфирами аминокислот. Наличие хорошо уходящих пиразолильных групп делает 3,6-ди-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-1,2,4,5-тетразин (I) удобным синтоном в реакциях N,O,C-нуклеофильного замещения, открывая широкие возможности для синтеза симметричных и несимметричных 3,6-дизамещенных 1,2,4,5-тетразинов [5 – 7].

При использовании в качестве N-нуклеофилов свободных аминокислот заместить пиразолильную группу в тетразине I не удалось вследствие способности аминокислот к образованию внутренних солей. Метиловые же эфиры глицина, аланина, лейцина, фенилаланина, тирозина, метионина и триптофана легко взаимодействуют с тетразином I при комнатной темпе-

ратуре в среде ацетонитрила, приводя к соединениям Па – ж с высокими выходами.

Соединения Па – ж — кристаллические вещества ярко-красного цвета с четкими температурами плавления, хорошо растворимые в хлороформе, диметилформамиде, диметилсульфоксиде, умеренно растворимые в спиртах, нерастворимые в воде.

Изучение туберкулостатической активности тетразинов Па – ж проводилось методом вертикальной диффузии на плотной питательной среде “Новая” с использованием лабораторных штаммов H₃₇Rv, M. Fortuitium и клинического штамма МБТ, выделенного от больных туберкулезом.



Установлено, что лишь тетразин Пб, содержащий остаток аланина, проявляет выраженные туберкулоцидные свойства, подавляя рост МБТ в концентрациях 1,25 – 0,6 мкг/мл, и туберкулостатическое действие в концентрациях 0,3 – 0,15 мкг/мл. Минимальная инги-

бирующая концентрация для тетразинов Па и Пг составляет 12,5 мкг/мл, а для Пе и Пж — 25 мкг/мл. В меньших концентрациях (0,30 – 0,15 мкг/л) эти соединения проявляют стимулирующий эффект на рост МБТ. Приняв во внимание это свойство, тетразины Па, г, е, ж, в состав которых входят остатки глицина, фенилаланина, метионина и триптофана, были использованы в качестве добавок к питательным средам из расчета 0,15 мкг на 1 мл питательной среды для стимуляции роста лабораторного штамма микобактерий $H_{37}Rv$ на жидкой питательной среде Сотона. После добавления соединений Па, г в питательную среду уже на 7 сутки отмечается значительный рост колоний до (+++) по сравнению с контрольными опытами: на среде без добавок рост колоний (+); на среде с добавлением изониазида (концентрация 0,1 мкг/мл) роста нет.*

Таким образом, метиловые эфиры глицина и фенилаланина, модифицированные тетразиновым кольцом и введенные в рецептуру жидкой среды Сотона, повышают их ростовые свойства, увеличивая массивность роста МБТ в 4 раза при сокращении срока роста лабораторного штамма до семи суток вместо 21.

На плотных питательных средах Левенштейна-Йенсена и “Новая” влияние соединений Па, г на рост микобактерий оказалось другим. Определение ростовых свойств микобактерий на этих питательных средах при добавлении соединений Па, г проводили с использованием лабораторного штамма $H_{37}Rv$ и клинических штаммов, выделенных от больных туберкулезом легких. Минимальная, стимулирующая рост МБТ, концентрация соединений Па, г в питательной среде составляет 0,15 мкг/мл. Стимулирующий эффект соединений выявляется лишь на музейных штаммах $H_{37}Rv$ (65 % и 75 % роста соответственно). На клинических штаммах такого эффекта не обнаружено: количество положительных посевов на средах с препаратами и в контрольных опытах (среды без препаратов) составляет 37 – 38 %.

Полученные результаты показывают перспективность синтеза и дальнейшего исследования производных аминокислот, содержащих в своей структуре тетразиновый цикл, при конструировании новых рецептур питательных сред для ускорения культивирования микобактерий туберкулеза из патологического материала.

Экспериментальная химическая часть

Температуры плавления определяли на нагревательном столике “Бозтиус”. Спектры ЯМР 1H записаны в $CDCl_3$ на спектрометре “Bruker DRX-400” с рабочей частотой 400 МГц при использовании ТМС в качестве внутреннего стандарта. 3,6-Бис(3,5-диметилпиразол-1-ил)-1,2,4,5-тетразин (I) синтезировали по описанной методике [8]. Гидрохлориды метиловых эфиров аминокислот были использованы товарные.

Метиловый эфир N-[6-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-[1,2,4,5]тетразин-3-ил]аминоуксусной кислоты

* (+) — слабый рост, (+++) — сплошной рост МБТ.

(IIa). Растворяют 182 мг (1,45 ммоль) гидрохлорида метилового эфира глицина в 5 мл ацетонитрила, добавляют 0,3 мл триэтиламина и перемешивают в течение 0,5 ч при температуре 50 – 60° С. Выпавший гидрохлорид триэтиламина отфильтровывают. Полученный раствор эфира глицина прикапывают к 300 мг (1,1 ммоль) 3,6-бис-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-1,2,4,5-тетразина в 5 мл ацетонитрила и перемешивают при комнатной температуре в течение 0,5 ч. Выпавший при охлаждении реакционной массы осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из этанола. Получают 222 мг (83,2 %) осадка в виде игл красного цвета с т.пл. 112 – 114 °С.

$C_{10}H_{13}N_7O_2$. ПМР-спектр (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 9,07 (т, J 7,0 Гц, 1H, NH), 6,11 (с, 1H при C^4 пиразолила), 4,25 (д, J 7,0 Гц, 2H, NH-CH₂), 3,72 (с, 3H, COOCH₃), 2,44, 2,48 (оба с, 6H, 2CH₃ в пиразолиле).

Метиловый эфир 2-N-[6-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-[1,2,4,5]тетразин-3-ил]аминопропионовой кислоты (IIб). Получают аналогично соединению Па из 200 мг (1,4 ммоль) гидрохлорида метилового эфира L- α -аланина и 300 мг (1,1 ммоль) тетразина I. Выделяют 220 мг (64,7 %) тетразина IIб темно-оранжевого цвета с т.пл. 105 – 106 °С.

$C_{11}H_{15}N_7O_2$. ПМР-спектр (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 9,23 (д, J 7,0 Гц, 1H, NH), 6,20 (с, 1H при C^4 пиразолила), 4,46 – 4,75 (м, 1H, NH-CH₂), 3,68 (с, 3H, COOCH₃), 2,22, 2,41 (оба с, по 3H, 2CH₃ в пиразолиле), 1,53 (д, J 7,0 Гц, 3H, >CH-CH₃).

Метиловый эфир 2-N-[6-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-[1,2,4,5]тетразин-3-ил]амино-4-метилвалерьяновой кислоты (IIв). Получают аналогично соединению Па из 270 мг (1,48 ммоль) гидрохлорида метилового эфира лейцина и 300 мг (1,1 ммоль) тетразина I выделяют 240 мг (70,4 %) красных призм с т.пл. 101 – 102 °С.

$C_{14}H_{21}N_7O_2$. ПМР-спектр (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 9,12 (д, J 7,0 Гц, 1H, NH), 6,10 (с, 1H при C^4 пиразолила), 4,57 – 4,51 (м, 1H, NH-CH₂), 3,69 (с, 3H, COOCH₃), 2,24, 2,45 (оба с, по 3H, 2CH₃ в пиразолиле), 1,89 (м, 2H, -CH₂-), 1,66 – 1,69 (м, 1H, CH₂-CH (CH₃)₂), 0,98, 0,94 (оба д, J 6,5 Гц, 6H, -CH(CH₃)₂).

Метиловый эфир 2-N-[6-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-[1,2,4,5]тетразин-3-ил]амино-3-фенилпропионовой кислоты (IIг). Получают аналогично соединению Па из 274 мг (1,5 ммоль) гидрохлорида метилового эфира β -фенилаланина и 300 мг (1,1 ммоль) тетразина I. Выделяют 227 мг красных кристаллов с т.пл. 89 – 90 °С.

$C_{17}H_{21}N_7O_2$. ПМР-спектр (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 9,22 (д, J 8,0 Гц, 1H, NH), 6,08 (с, 1H при C^4 пиразолила), 4,76 – 4,81 (м, 1H, NH-CH₂), 3,70 (с, 3H, COOCH₃), 2,42, 2,30 (оба с, 6H, 2CH₃ в пиразолиле), 3,30 – 3,15 (м, 2H, -CH₂Ph), 7,15 – 7,19; 7,24 – 7,28 (оба м, 3H аром), 7,33 (д, J 7,5 Гц, 2H аром).

Метиловый эфир 2-N-[6-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-[1,2,4,5]тетразин-3-ил]амино-3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты (IIд). Получают анало-

гично соединению Па из 257 мг (1,5 ммоль) гидрохлорида метилового эфира тирозина и 300 мг (1,1 ммоль) тетрамина I. Выделяют 346 мг (78,8 %) оранжевых игл с т.пл. 184 – 185 °С.

C₁₇H₁₉N₇O₃. ПМР-спектр (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 9,14 (д, J 8,5 Гц, 1Н, NH), 9,00 (с, 1Н, OH), 6,63, 7,09 (оба д, J 8,5 Гц, 4Н аром.), 6,08 (с, 1Н при С⁴ пиразолила), 4,66 – 4,71 (м, 1Н, NH–CH<), 3,69 (с, 3Н, COOCH₃), 2,23, 2,42 (оба с, 6Н, 2СН₃ в пиразолиле), 3,12 – 3,17, 3,02 – 3,09 (оба м, 2Н, –СН₂).

Метилловый эфир 2-N-[6-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-[1,2,4,5]тетразин-3-ил]амино-4-метилсульфанил-масляной кислоты (Пе). Получают аналогично соединению Па из 300 мг (1,5 ммоль) гидрохлорида метилового эфира метионина и 300 мг (1,1 ммоль) тетрамина I. Выделяют 246 мг (73,2 %) красных кристаллов с т.пл. 97 – 99 °С.

C₁₃H₁₉N₇O₃S. ПМР-спектр (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 9,17 (д, J 8,5 Гц, 1Н, NH), 6,11 (с, 1Н при С⁴ пиразолила), 4,68 – 4,74 (м, 1Н, NH–СН<), 3,71 (с, 3Н, COOCH₃), 2,24, 2,45 (оба с, по 3Н, 2СН₃ в пиразолиле), 2,56 – 2,72 (м, 2Н, –СН₂–), 2,15 – 2,19 (м, 2Н, СН₂-S), 2,09 (с, 3Н, S-СН₃).

Метилловый эфир 2-N-[6-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-[1,2,4,5]тетразин-3-ил]амино-2-(индол-3-илметил)-пропионовой кислоты (Пж). Получают аналогично соединению Па из 356 мг (1,4 ммоль) гидрохлорида метилового эфира триптофана и 300 мг (1,1 ммоль) 3,6-бис-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-1,2,4,5-тетразина (I). Получают 303 мг (80,4 %) соединения Пж в виде игл красного цвета с т.пл. 190 – 191 °С.

C₁₉H₂₀N₈O₂. ПМР-спектр (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,73 (с, 1Н, NH в пиррольном цикле), 9,12 (д, J 7,5 Гц, 1Н, NH), 7,55 и 7,30 (оба д, 2Н аром при С(4) и при С(7) индолила), 6,95 – 7,04 (м, 2Н аром, при С(5) и С(6) индолила), 7,25 (д, 1Н в пиррольном цикле), 6,06 (с, 1Н при С⁴ пиразолила), 4,76 – 4,82 (м, 1Н, NH–СН<), 3,71 (с, 3Н, COOCH₃), 2,40 и 2,22 (оба с, по 3Н, 2СН₃ в пиразолиле), 3,30 – 3,43 (м, 2Н).

Экспериментальная биологическая часть

Определение ростовых свойств микобактерий туберкулеза (МБТ) под действием синтезированных метиловых эфиров аминокислот проводили методом абсолютных концентраций на жидкой среде Сотона и на плотных средах Левенштейна-Йенсена и “Новая” с использованием лабораторного штамма МБТ Н₃₇Rv и клинических штаммов от больных туберкулезом лег-

ких (методика согласно приказа МЗ России по туберкулезу № 109 от 21.03.03).

Метод определения туберкулостатической активности. Навеску культуры лабораторного штамма помещали в стерильную фарфоровую ступку, тщательно растирали до гомогенной массы, постепенно добавляя стерильный физиологический раствор. Полученную суспензию культуры стандартизировали по бактериальному стандарту мутности, соответствующему 500 млн. микробных тел (5 единиц ГКИ). Навески препарата по 10 мкг помещали в пробирки и растворяли в 1 мл ДМСО, с последующим внесением 9 мл воды. Заданные концентрации препаратов (12,8; 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 мкг/мл) готовили на дистиллированной воде.

Приготовление питательной среды с различными концентрациями соединений проводили по убывающей. Среду свертывали в наклонном положении в течение 20 мин при температуре 85 °С, а затем засекали по 0,2 мл приготовленной взвесью МБТ, закрывали резиновыми пробками и помещали в наклонном положении в термостат при температуре 37 °С. Действие каждой концентрации соединений на МБТ изучали на трех параллельных рядах. Регистрацию полученных результатов проводили через 10 – 12 дней. Для сравнения в качестве контроля использовали изониазид в концентрациях 0,1; 1,0 и 5,0 мкг/мл.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (02-03-32332а) и ISTC (проект № 708).

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. М. Модель, *Биология туберкулезных микобактерий и иммунология туберкулеза*, Медгиз, Москва (1958), сс. 72 – 80.
2. В. А. Павлов, *Материалы научной сессии “Противотуберкулезная работа в Уральском и Волго-Вятском регионах”*, Екатеринбург (2000), с. 74.
3. R. Li, R. Sirawaraporn, P. Chitnumsub, et al., *J. Mol. Biol.*, **295**(2), 307 – 323 (2000).
4. Р. И. Ишметова, Г. Л. Русинов, М. А. Кравченко и др., *Хим-фарм. журн.*, **34**(8), 23 – 24 (2000).
5. Н. И. Латош, Г. Л. Русинов, И. Н. Ганебных и др., *Ж. орган. химии*, **35**(9), 1392 – 1400 (1999).
6. C. Glidewell, P. Lightfoot, B. J. L. Royles, et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, 1167 – 1174 (1997).
7. Г. Л. Русинов, Н. И. Латош, Р. И. Ишметова и др., в сб.: “Актуальные проблемы химии и технологии органических веществ”, Екатеринбург, УрО РАН, 285 – 307 (2002).
8. M. D. Coburn, G. A. Buntain, B. W. Harris, et al., *J. Heterocyclic Chem.*, **28**, 2049 – 2050 (1991).

Поступила 07.04.03

SYNTHESIS AND TUBERCULOSTATIC ACTIVITY OF METHYL ESTERS OF SOME AMINOACIDS WITH SYM-TETRAZINE MOIETIES

G. L. Rusinov¹, N. I. Latosh², R. I. Ishmetova¹, M. A. Kravchenko², I. N. Ganebnykh¹, V. A. Sokolov², O. N. Chupakhin²

¹ Institute of Organic Synthesis of RAS (Ural Branch)

² Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Yekaterinburg

The products of nucleophilic substitution of 3,5-dimethylpyrazolyl moiety in 3,6-bis(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)-s-tetrazine by methyl esters of several aminoacids were obtained. One of seven compounds had tuberculocidal action at concentration 0.6 µg/ml. In contrast two of tested samples exhibited promotion effect on mycobacterium colonies growth.