

М. А. Марьясов¹, В. В. Давыдова¹, В. П. Шевердов¹, О. Е. Насакин¹, В. Л. Гейн²

СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ, АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ, ЖАРОПОНИЖАЮЩАЯ И ИММУНОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТИЛ-3-АЦИЛ-6-АМИНО-4-АРИЛ-5-ЦИАНО-4Н-ПИРАН-2-КАРБОКСИЛАТОВ

¹ ФГБОУ ВПО "Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова", Россия, Чебоксары; e-mail: marsikprovisor@mail.ru

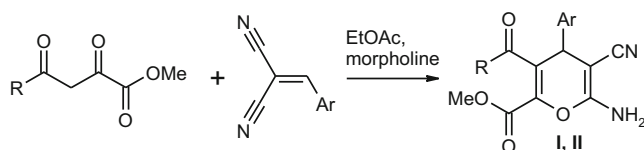
² ГБОУ ВПО "Пермская государственная фармацевтическая академия министерства здравоохранения Российской Федерации", Россия, Пермь; e-mail: geinvl48@mail.ru

Для синтеза метил-3-ацил-6-амино-4-арил-5-циано-4Н-пиран-2-карбоксилатов использована реакция метиловых эфиров 2,4-диоксобутановых кислот с арилиденмалонитрилами в этилацетате в присутствии каталитических количеств морфолина или пиперидина. Структура соединений установлена на основании данных ИК, ЯМР ¹H, ¹³C и масс-спектров. Исследованы противомикробная, анальгетическая, жаропонижающая активность полученных соединений и их влияние на антителогенез.

Ключевые слова: метил-3-ацил-6-амино-4-арил-5-циано-4Н-пиран-2-карбоксилаты; арилиденмалонитрил; 2,4-диоксобутановые кислоты; биологическая активность; антителогенез.

Известно, что многие органические цианиды обладают биологической активностью [1–4]. Одним из возможных направлений поиска новых лекарственных средств является изучение биологической активности метил-3-ацил-6-амино-4-арил-5-циано-4Н-пиран-2-карбоксилатов, описанных ранее [4, 5].

Для получения новых представителей 5-цианозамещенных пиранов была использована реакция метиловых эфиров 2,4-диоксобутановых кислот с арилиденмалонитрилами. Образование продуктов I, II происходит при перемешивании реагентов в течение 5–15 мин в этилацетате в присутствии каталитических количеств морфолина или пиперидина и последующей выдержки реакционной массы при комнатной температуре в течение 12 ч:



Ar=3,4,5-(MeO)₃C₆H₂ (I), 4-MeOCOC₆H₄ (II); R=Me (Ia, IIe), 4-MeOC₆H₄ (Ib, IIa), 2-Fu (Ic, IIc), 2-Thienyl (Id, IId), 3,4-(MeO)₂C₆H₃ (IIb), 4-MeC₆H₄ (IIf).

Полученные соединения I, II представляют собой кристаллические вещества белого цвета с высокими температурами плавления (табл. 1). Их строение доказано на основании данных ИК, ЯМР ¹H, ¹³C и масс-спектров (табл. 2).

В ИК-спектрах соединений присутствуют полосы поглощения сопряженной цианогруппы (2190–2203 см⁻¹), аминогруппы (3206–3471 см⁻¹), а также карбонила сложноэфирной группы при 1706–1741 см⁻¹ (табл. 2).

В ЯМР ¹H-спектрах регистрируются группы сигналов протонов ароматических колец (6,59–7,97 м.д.), NH₂-группы (6,38–7,30), синглет метинового протона в области 4,42–4,63 м.д. Сигналы других протонов

наблюдаются в ожидаемых областях (табл. 2). В спектрах ЯМР ¹³C сигналы цианогрупп регистрируются при 105,49–118,53 м.д.

В масс-спектрах соединений присутствует пик молекулярного иона (табл. 1) и пики фрагментных ионов, подтверждающих указанную структуру.

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры соединений снимали на спектрофотометре ИК-Фурье ФСМ1202 в вазелиновом масле. ЯМР ¹H, ¹³C спектры соединений сняты на спектрометре Bruker DRX500 (DMCO-d₆, рабочая частота 500,13 МГц, внутренний стандарт TMS). Для снятия масс-спектров использован Shimadzu GCMS-QP2010 (ЭУ, 70 эВ).

Метил-3-ацетил-6-амино-4-(3,4,5-триметоксибензил)-5-циано-4Н-пиран-2-карбоксилат (Ia). К суспензии 0,3 г (2 ммоль) метилового эфира 2-ацетилпировиноградной кислоты в 5 мл этилацетата однократно прибавляют 0,5 г (2 ммоль) 3,4,5-триметоксибензиденмалонитрила, каплю морфолина или пиперидина и перемешивают до полного растворения реагентов. Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 12 ч, образующийся при потирании стеклянной палочкой осадок отфильтровывают. Очистку проводят путем перекристаллизации из 10 мл 2-пропанола.

Соединения Ib–IIf получают по аналогичной методике (табл. 1).

Экспериментальная биологическая часть

Полученные соединения испытаны на различные виды биологической активности.

Антимикробную активность определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде исследуемого соединения и изучали активность по отно-

Физико-химические характеристики синтезированных соединений

Соединение	Выход, %	$T_{пл}$, °C	Брутто-формула	М. м. по масс-спектру
Ia	62,2	191 – 193 (<i>i</i> -PrOH)	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₇	388
Ib	67,0	206 – 208 (<i>i</i> -PrOH)	C ₂₅ H ₂₄ N ₂ O ₈	480
Ic	70,7	237 – 239 (<i>i</i> -PrOH)	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₈	440
Id	67,4	243 – 245 (<i>i</i> -PrOH)	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₇ S	456
IIa	69,1	216 – 218 (<i>i</i> -PrOH)	C ₂₄ H ₂₀ N ₂ O ₇	448
IIb	62,0	213 – 215 (<i>i</i> -PrOH)	C ₂₅ H ₂₂ N ₂ O ₈	478
IIc	61,3	253 – 255 (<i>i</i> -PrOH)	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₇	408
IId	67,8	264 – 266 (<i>i</i> -PrOH)	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₆ S	424
IIe	67,1	203 – 205 (<i>i</i> -PrOH)	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₆	356
IIf	79,3	256 – 258 (<i>i</i> -PrOH)	C ₂₄ H ₂₀ N ₂ O ₆	432

шению к грамотрицательным бактериям — кишечная палочка (*E. Coli* 25922 ATCC) и грамположительным бактериям — золотистый стафилококк (*St. Aureus* 65338P ATCC) [6]. Соединения растворяли в диметилформамиде в соотношении 1:100 и затем разводили мясopептонным бульоном (МПБ). Рабочий раствор готовили разведением бактериальной культуры с концентрацией 5 млн микробных клеток в 1 мл, который в количестве 0,1 мл вносили в 2 мл МПБ. В результате бактериальная нагрузка на 1 мл культуральной жидкости составляла 250 000 микробных клеток. Результаты опытов оценивали после 18 – 20 ч выдержки контрольных и опытных образцов в термостате при 36 – 37 °C. Регистрировали наличие роста бактериальных культур или торможения за счет бактериостатического действия соединений. Бактериостатическую активность соединений оценивали по величине минимальной подавляющей концентрации (МПК) в мкг/мл, которая задерживала рост бактериальных культур (препарат сравнения хлоргексидин, МПК 125 мкг/мл для обоих штаммов). МПК для полученных соединений по отношению к обоим штаммам во всех случаях

составила 1000 мкг/мл, что свидетельствует об отсутствии выраженной активности.

Анальгетическую активность соединений II изучали на белых мышах массой 16 – 22 г методом “горячая пластинка” [7]. Животным вводили исследуемое вещество в дозе 50 мг/кг в 2 % растворе крахмальной слизи внутривбрюшинно (в/б). Контрольным мышам вводили эквивалентные количества крахмальной слизи. Время развития оборонительного рефлекса (отдергивания лапок) оценивали через 1 ч после введения веществ. Регистрировали время с момента помещения животного на горячую поверхность (температура 50 °C) до появления поведенческого ответа мыши — отдергивания задней лапы (табл. 3) [6]. Статистическую обработку эксперимента проводили с использованием критерия Стьюдента. Эффект считали достоверным при $p < 0,05$. Наиболее активным оказалось соединение IIa, что частично можно объяснить лучшей растворимостью данного соединения и, вероятно, более высокой биологической доступностью.

Исследования жаропонижающей активности проводили на беспородных белых крысах обоего пола массой 220 – 280 г, лихорадочную реакцию вызывали

Таблица 2

Спектральные данные соединений

Соединение	R	ИК-спектры, ν , см ⁻¹					Спектры ЯМР ¹ H, δ , м.д.					ЯМР ¹³ C, δ , м.д.
		CN	NH ₂	COOMe	COOMe, c	MeO, c	CH, c	NH ₂	Ar	CH ₃ , c	CN	
Ia	CH ₃	2190	3331, 3447	1735	3,35	3,57, 3,66	4,51	6,43 c	6,90 д, 7,17 c, 7,85 д	1,97	107,89	
Ib	4-MeOC ₆ H ₄	2195	3336, 3471	1741	3,34	3,51, 3,65, 3,78	4,42	6,38 c	6,88 д, 7,18 c, 7,60 д	-	109,52	
Ic	2-Fu	2193	3334, 3421	1735	3,36	3,58, 3,66	4,51	6,46 c	6,59 д.д, 7,16 м, 7,90 д	-	105,49	
Id	2-Thienyl	2194	3333, 3422	1735	3,35	3,58, 3,67	4,49	6,45 c	7,04 т, 7,20 c, 7,45 д, 7,92 д	-	109,61	
IIa	4-MeOC ₆ H ₄	2202	3208, 3380	1735	3,34, 3,81	3,61	4,54	6,93 д	7,30 м, 7,64 д, 7,85 д	-	113,50	
IIb	3,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₃	2203	3209, 3382	1735	3,35, 3,79	3,49, 3,72	4,56	6,93 д	7,13 c, 7,26 – 7,41 м, 7,86 д	-	112,90	
IIc	2-Fu	2203	3210, 3378	1733	3,36, 3,83	3,57	4,63	7,29 c	6,59 дд, 7,17 д, 7,36 д, 7,87 м	-	115,88	
IId	2-Thienyl	2203	3208, 3374	1734	3,33, 3,82	3,54	4,62	7,30 c	7,08 т, 7,36 д, 7,54 д, 7,86 д, 7,95 д	-	118,51	
IIe	CH ₃	2203	3206, 3382	1706	3,34, 3,85	3,79	4,61	7,21 c	7,30 д, 7,38 д, 7,97 д	1,98	118,53	
IIf	4-MeC ₆ H ₄	2201	3208, 3372	1735	3,34, 3,82	3,48	4,57	7,22 д	7,30 д, 7,40 д, 7,56 д, 7,85 д	2,32	118,48	

внутримышечным введением пирогенала в дозе 400 мг/кг. Ректальную температуру измеряли цифровым электротермометром OMRON Eсо Temp (МС-203-Е) до введения пирогенала (исходная температура) и через 3 ч после него (разница этих измерений представляет собой оцениваемую гипертермическую реакцию). Исследуемые соединения вводили в/б в дозе 50 мг/кг через 3 ч после введения пирогенала, то есть на пике гипертермии. Жаропонижающее действие оценивали по уменьшению гипертермии через 30 мин, 1, 2 и 3 ч после введения исследуемого вещества (контроль – 2 % крахмальная слизь в/б). В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту в дозе 50 мг/кг при в/б введении (табл. 3). Среди изученных соединений только соединение Пс показало активность, превысившую действие препарата сравнения.

Влияние на антителиогенез соединений II оценивали по числу антителиообразующих клеток (АОК). Вещества исследовали в концентрациях 50 мг/кг. Вещества суспендировали в 2 % крахмальной слизи и вводили мышам в/б. В качестве контроля вводили 2 % крахмальную слизь. Через 1 ч животных всех групп иммунизировали эритроцитами барана в концентрации

10⁸ кл/0,2 мл в/б. На 5 сут животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом.

Селезенку помещали в заранее приготовленную полную питательную среду 199 с добавлением 10 мМ HEPES (“Sigma”), 2 мМ L-глутамин (“Sigma”). Затем орган осторожно гомогенизировали в стеклянном или пластиковом гомогенизаторе одним-двумя вертикальными движениями пестика. Полученную клеточную суспензию фильтровали через 2 слоя капроновой сетки. Подсчет клеточности каждой селезенки проводили в 25 маленьких квадратах камеры Горяева.

Для изучения интенсивности гуморального ответа на эритроциты барана использовали метод локального гемолиза в геле агарозы [8]. Готовили 0,75 % золь агарозы марки Б (Олайнский завод химреактивов) на растворе Хенкса, разливали его в пробирки по 2,5 мл и охлаждали до 47 °С в ультротермостате. Затем в пробирку вносили рабочий объем клеток (рассчитывали в предварительных опытах таким образом, чтобы количество образующихся зон гемолиза колебалось от 50 до 500 на чашку; этот объем был разным для различных клеточных суспензий) и 0,025 мл эритроцитов барана (концентрация эритроцитов при этом колебалась от 50 до 100 млн в 1 мл геля). Смесь быстро переме-

Таблица 3

Биологическая активность исследуемых соединений

Соединение	Анальгетическая активность		Влияние на антителиогенез		Жаропонижающая активность			
	Отдергивание лапы, с (n = 6)	Число АОК в селезенке (lg/орган) (n = 6)	Исходная температура, °С (n = 6)	Температура при лихорадочной реакции через 3 ч после введения пирогенала, °С	Изменение температуры (°С) под влиянием изучаемых веществ			
					3,5 ч	4 ч	5 ч	6 ч
Контроль	14 ± 0,20	4,7500	37,3 ± 0,44	37,6 ± 0,41	39,3 ± 0,21 (+ 0,6)	39,4 ± 0,19 (+ 0,7)	39,5 ± 0,39 (+ 0,8)	39,4 ± 0,32 (+ 0,7)
Па	19 ± 0,51*	4,1509*	36,5 ± 0,60	37,5 ± 0,15	37,4 ± 0,72 (- 0,5)	37,6 ± 0,75 (+ 0,2)	38,6 ± 0,53 (+ 1,2)	39,2 ± 0,28 (+ 1,7)
Пб	14,5 ± 0,49	3,9078*	37,4 ± 0,15	37,2 ± 0,35	37,4 ± 0,58 (- 0,2)	37,7 ± 0,28 (+ 0,2)	38,3 ± 0,61 (+ 0,7)	38,8 ± 0,49 (+ 1,2)
Пс	14 ± 0,68	4,5231	36,7 ± 0,25	37,5 ± 0,60	37,6 ± 0,06 (- 0,5)	37,7 ± 0,12 (- 0,4)	37,8 ± 0,11 (- 0,3)	38,1 ± 0,06 (0)
Пд	13,75 ± 0,57	4,5393	36,8 ± 0,70	37,4 ± 0,60	37,1 ± 0,35 (- 0,3)	37,2 ± 0,35 (- 0,2)	38,2 ± 0,32 (+ 0,8)	38,4 ± 0,15 (+ 1,0)
Пе	15 ± 1,11	4,1066*	37,1 ± 0,06	37,6 ± 0,19	37,0 ± 0,10 (- 0,5)	37,2 ± 0,21 (- 0,3)	37,7 ± 0,05 (+ 0,2)	38,3 ± 0,50 (+ 0,8)
Пф	14,75 ± 0,92	4,0359*	37,3 ± 0,44	37,6 ± 0,41	37,2 ± 0,20 (- 0,4)	37,6 ± 0,38 (0)	38,1 ± 0,38 (+ 0,5)	38,6 ± 0,38 (+ 1,0)
Метамизол натрия (93 мг/кг, ED ₅₀), субстанция ООО “ФармХимКомплект”	16 ± 3,02	–	–	–	–	–	–	–
Ацетилсалициловая кислота (50 мг/кг), субстанция ООО “ФармХимКомплект”	–	–	37,1 ± 0,26	37,8 ± 0,40	37,6 ± 0,32 (- 0,2)	37,7 ± 0,57 (- 0,1)	38,3 ± 0,80 (+ 0,5)	38,6 ± 0,15 (+ 0,8)

* p < 0,05 по сравнению с контролем.

шивали и вносили по 2,5 мл на предварительно подогретые до 40 °С чашки Петри. После застывания геля агарозы чашки инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Затем добавляли 2,5 мл комплемента (производство НПО “Биомед”, ампула лиофилизированного комплемента разводилась в 5 мл среды 199). Через 1 ч инкубации при 37 °С комплемент сливали. Число зон гемолиза, каждая из которых соответствует одной IgM-АОК, подсчитывали при боковом освещении. Результаты, учитывая log-нормальное распределение данных, выражали в виде \log_{10} АОК на весь орган (табл. 3) [9].

При анализе влияния соединений на количество АОК обнаружено статистически значимое угнетающее влияние на количество АОК в селезёнке мышей у соединений Па, Пб, Пе и Пф. Таким образом, данные соединения снижают выраженность антителогенеза и угнетают гуморальный иммунный ответ.

По результатам биологических испытаний можно заключить, что среди метил-3-ацил-6-амино-4-арил-5-циано-4H-пиран-2-карбоксилатов возможен поиск биологически активных веществ с аналгетическим, жаропонижающим и иммуносупрессивным действием.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 15-13-10029.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. Е. Nasakin, A. N. Lyschikov, Ya. S. Kayukov, V. P. Sheverdov, *Pharm. Chem. J.*, **34**(4), 170 – 185 (2000).
2. V. P. Sheverdov, O. E. Ershov, O. E. Nasakin, *Pharm. Chem. J.*, **42**(12), 670 – 673 (2008); В. П. Шевердов, О. Е. Ершов, О. Е. Насакин, *Хим. фарм. журн.*, **42**(12), 13 – 15 (2008).
3. В. П. Шевердов, О. В. Ершов, О. Е. Насакин, А. Н. Чернушкин, *Хим.-фарм. журн.*, **43**(12), 17 – 18 (2009); *Pharm. Chem. J.*, **43**(12), 659 – 660 (2009).
4. В. П. Шевердов, А. Ю. Андреев, О. Е. Насакин, В. Л. Гейн, *Хим.-фарм. журн.*, **48**(6), 25 – 28 (2014); *Pharm. Chem. J.*, **48**(6), 379 – 382 (2014).
5. В. П. Шевердов, А. Ю. Андреев, О. В. Ершов и др., *Химия гетероцикл. соедин.*, № 7, 1073 – 1082 (2012).
6. Р. У. Хабриев (ред.), *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005).
7. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств*, Ч. 1, Гриф и К, Москва (2012).
8. N. K. Jerne and A. A. Nordin, *Science*, **140**, 405 – 408 (1963).
9. В. П. Лозовой, В. В. Губарев, Е. Н. Наумова, Т. В. Елисеева, *Иммунология*, № 2, 50 – 53 (1989).

Поступила 02.03.16

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF METHYL-3-ACYL-6-AMINO-4-ARYL-5-CYANO-4H-PYRANO-2-CARBOXYLATES

M. A. Mar'yasov¹, V. P. Sheverdov¹, O. E. Nasakin¹, and V. L. Gein^{2**}

¹ Chuvash State University, Cheboksary, 428010 Russia

² Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, 614990 Russia

e-mail: * marsikprovisor@mail.ru; ** geinvl48@mail.ru

A series of methyl-3-acyl-6-amino-4-aryl-5-cyano-4H-pyrano-2-carboxylates were synthesized using the reaction of 2,4-dioxobutyric acid methyl esters with arylidenemalononitriles in ethyl acetate in the presence of catalytic amounts of piperidine or morpholine. The structures of obtained compounds have been established on the basis of IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, and mass spectroscopy data. The antimicrobial, analgesic, and antipyretic activities of synthesized compounds and their effect on the antibody response were studied.

Keywords: methyl 3-acyl-6-amino-4-aryl-5-cyano-4H-pyrano-2-carboxylates; arylidenemalononitriles; 2,4-dioxobutyric acids; biological activity; antibody response.