

УДК 547.518 + 547.86

СОЗДАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 2-АМИНО-5,6-ДИГИДРО-4Н-1,3-ТИАЗИНА

А.А. Левцова, В.И. Чупахин, А.Н. Прошин*, А.Н. Пушин*, Т.П. Трофимова,
О.Н. Зефирова

(кафедра радиохимии, кафедра органической химии, кафедра физической химии; e-mail:
olgaz@org.chem.msu.ru)

В работе получены два спиро-аналога известного ингибитора фермента NO-синтазы 2-амино-5,6-дигидро-4Н-1,3-тиазина. Искомые соединения синтезированы циклизацией N-2-(1-циклогексенил)этил-замещенных тиомочевин.

Одним из важнейших нейромедиаторов в организме человека и животных является оксид азота (NO) [1]. Известно, что его выработка в клетках регулируется ферментом NO-синтаза, существующим в организме человека в виде трех изоформ. Две из них являются конститутивными, а одна индуцируется в организме при некоторых патологических состояниях (например, в состояниях септического шока). Нами проводятся работы по созданию таких ингибиторов NO-синтазы, которые имеют мишенью действия индуцируемую изоформу этого фермента (iNOS).

Известно, что 2-амино-5,6-дигидро-4Н-1,3-тиазин (1) является неселективным ингибитором NO-синтазы [2], а введение в это соединение метильного заместителя в положение при C⁶ приводит к заметному увеличению как активности, так и селективности по отношению к iNOS [1].

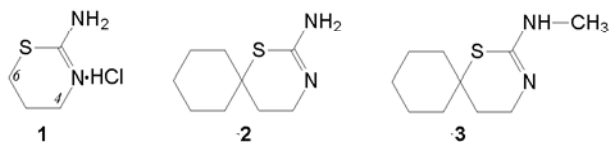
Настоящая работа посвящена синтезу 2-амино-1-тиа-3-аза-спиро[5.5]додец-2-ена (2) – спиро-аналога структуры 1, в которую в положение при C⁶ введен циклогексановый фрагмент (схема 1).

Подчеркнем, что предсказание эффективности связывания структуры 2 с активным центром фермента

затруднено. С одной стороны, известное 6,6-диметильное производное тиазина 1 обладает меньшей активностью, чем соответствующий монозамещенный аналог, поэтому активность соединения 2 может быть невысока. С другой стороны, проведенное нами компьютерное моделирование показало, что возможна такая ориентация спиро-тиазина 2 в каталитическом центре фермента, при которой их связывание оказывается эффективным за счет образования двух водородных связей с участием атомов водорода аминогруппы, а также взаимодействия неподеленной пары атома серы с атомом железа, входящего в каталитический центр гема (рисунок).

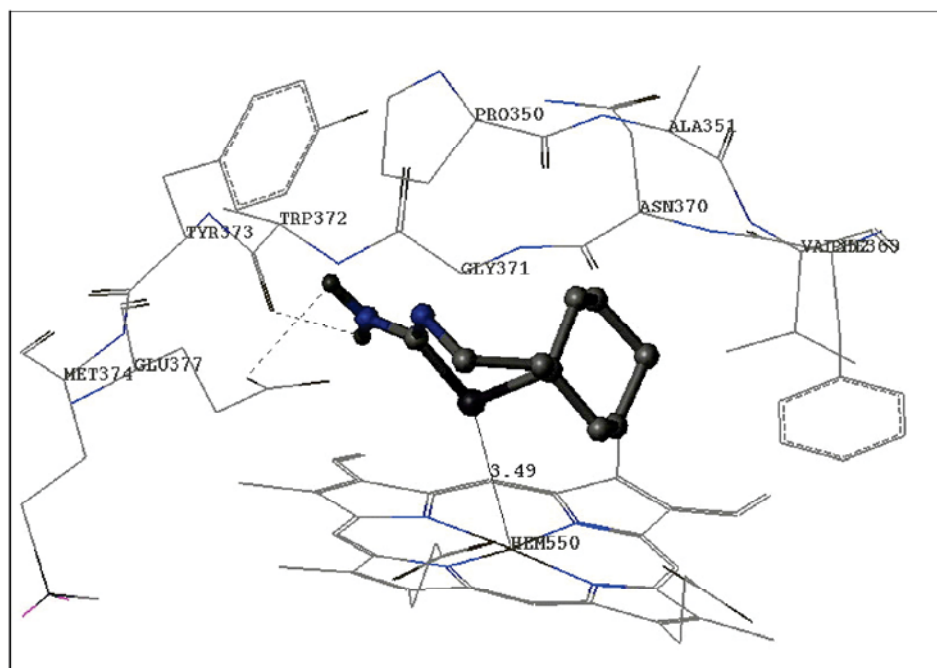
Вопрос о том, будет ли реализована именно эта ориентация соединения 2, остается открытым. Согласно литературным данным по докингу 2-этилизо-тиомочевин в область связывания эндогенного субстрата iNOS (L-аргинина) главным лиганд-ориентирующим фактором в рассматриваемой области является его взаимодействие с кислотной группировкой Glu377 iNOS [3]. Однако возможность протонирования в структуре 2 (и в базовом соединении 1) как экзоциклического атома азота, так и атома азота тиазинового кольца приводит к тому, что ориентация лиганда в активном центре существенно различается в зависимости от того, какой из этих атомов связывается с Glu377. Поэтому для получения большей информации о возможном расположении соединения 2 в каталитическом центре в данной работе было решено также синтезировать его N-метильное производное 3.

Схема 1



* Институт физиологически активных веществ РАН.

** Отметим, что в работе [2] в качестве одного из запатентованных ингибиторов NO-синтазы значится спиро-аналог соединения 1 по положению 4, хотя ни способ синтеза, ни активность этого соединения в патенте не приводятся. Очевидно, однако, что с химической точки зрения оно принципиально отличается от рассматриваемой в настоящем исследовании структуры 2.



Возможный вариант взаимодействия соединения 2 с активным центром iNOS

Неописанные ранее в литературе соединения 2 и 3 были получены нами из N-2-(1-циклогексенил)этилзамещенных тиомочевин 4 и 5, циклизация которых (кипячением в соляной кислоте) приводит к образованию соответствующих спиро соединений (схема 2).

Предложенный метод получения спиро-тиазинов 2 и 3 оказался удобным в препаративном отношении и позволил получить их в виде гидрохлоридов с общими выходами (из 2-(1-циклогексенил)этиламина) 79 и 68% соответственно. Строение соединений 2–5 доказано с помощью данных элементного анализа и ЯМР-спектроскопии (см. экспериментальную часть). Спиро-тиазины 2 и 3 переданы на испытания NO-ингибирующей активности *in vitro* и *in vivo*.

Экспериментальная часть

Для проведения молекулярного моделирования использовали модель L-аргинин-связывающей полости оксидазного домена индуцируемой изоформы NO-синтазы из банка данных кристаллических структур (PDB) и программный комплекс SYBYL7.3 фирмы "Tripos, Inc." на рабочих станциях SGI OCTANE.

Спектры ЯМР ^1H регистрировали на спектрометре "Bruker DPX-200" с рабочей частотой 200 МГц, в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Контроль за ходом реакции и чистотой исходных и конечных соединений осуществлялся методом тонкослойной хроматографии на пластинках "Silufol UV-254". Температуры плавления определяли на нагревательном блоке "Boetius".

N-бензоил-N'-2-(1-циклогексенил)этил-тиомочевина (4). К раствору 2,52 г (0,02 моль) 2-(1-циклогексенил)этиламина в 40 мл диэтилового эфира добавили по каплям 3,26 г (0,02 моль) бензоилизотиоцианата в 20 мл диэтилового эфира. Выпавший осадок отфильтровали, промыли эфиром. Получили 5,54 г соединения 4. Выход 96%. $T_{\text{пл}} = 86\text{--}88^\circ\text{C}$. Найдено (%): С (66,97); Н (6,87); N (9,88). $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{OS}$. Вычислено (%): С (66,63); Н (6,99); N (9,71).

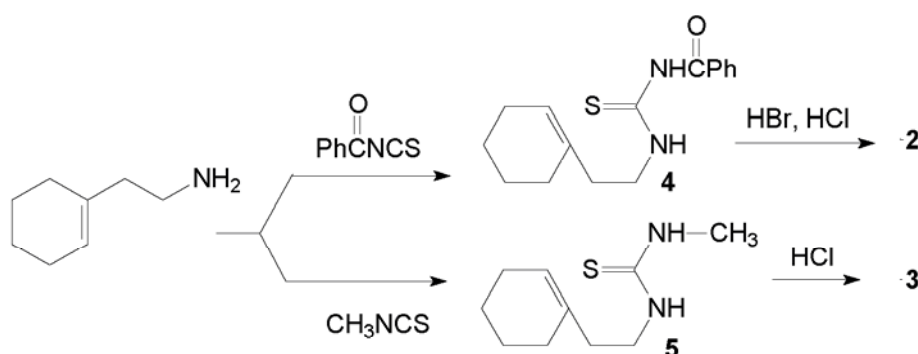
Спектр ЯМР ^1H , DMSO-d_6 , δ : 11.20 (1H, с, NH), 11.00 (1H, т, NH), 8.00 (2H, д, Ar-H), 7.50 (3H, м, Ar-H), 5.60 (1H, уш. с, C=N), 3.70 (2H, кв, CH_2N), 2.30 (2H, т, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.00 (4H, м, $(\text{CH}_2)_2$), 1.70 (4H, м, $(\text{CH}_2)_2$).

N-метил-N'-2-(1-циклогексенил)этил-тиомочевина (5) получена аналогичным способом. Выход 93%. $T_{\text{пл}} = 75\text{--}77^\circ\text{C}$. Найдено (%): С (60,83); Н (9,38); N (14,40). $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{S}$. Вычислено (%): С (60,56); Н (9,15); N (14,12).

Спектр ЯМР ^1H , CDCl_3 , δ : 6.70 (1H, уш. с, NH), 6.30 (1H, уш. с, NH), 5.15 (1H, уш. с, C=N), 3.20 (2H, кв, CH_2N), 2.40 (3H, д, CH_3), 1.80 (2H, т, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.70 (4H, м, $(\text{CH}_2)_2$), 1.30 (4H, м, $(\text{CH}_2)_2$).

Гидрохлорид 2-амино-1-гиа-3-аза-спиро[5.5]десяти-2-ена (2). К 2,88 г (0,01 моль) соединения 4 прибавляли 10 мл конц. HCl и кипятили с обратным холодильником 30 ч. Реакционную смесь охлаждали, выпавшую бензойную кислоту отфильтровывали, разбавляли холодной водой (40–50 мл), при перемешивании добавляли Na_2CO_3 до pH 8. Экстрагировали хло-

Схема 2



ристым метиленом (2×30 мл). Органический слой высушивали, упаривали и растворяли в 20 мл изопропанола. При перемешивании добавляли 1 мл концентрированной соляной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывали и высушивали. Получено 1,81 г соединения **2**. Выход 82%. $T_{\text{пл}} = 70\text{--}72^\circ\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H , D_2O , δ , м.д. (J , гц): 3,55 (2H, т, $J = 6.7$, CH_2N), 2,05 (2H, т, $J = 6.7$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,00–1,20 (10H, м, $(\text{CH}_2)_5$).

Гидрохлорид 2-метиламино-1-тиа-3-аза-спиро-[5.5]додец-2-ена (3). 1,98 г (0,01 моль) соединения **5** прибавляли 20 мл концентрированной HCl и кипятили с обратным холодильником 3 ч. Реакционную смесь

охлаждали, избыток соляной кислоты упаривали на роторном испарителе, разбавляли холодной водой (40–50 мл), при перемешивании добавляли Na_2CO_3 до pH 8. Экстрагировали хлористым метиленом (2×30 мл). Органический слой высушивали, упаривали, растворяли в 20 мл изопропанола. При перемешивании добавляли 1 мл конц. соляной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывали и высушивали. Получено 1,71 г соединения **3**. Выход 73%. $T_{\text{пл}} = 140\text{--}142^\circ\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H , DMCO-d_6 , δ , м.д. (J , гц): 10,55 (H, м, NH), 9,70 (H, м, NH), 3,60 (3H, с, NCH_3), 3,50 (2H, т, $J = 6.7$, CH_2N), 1,70–1,25 (12H, м, $(\text{CH}_2)_5$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ОХМ Российской Академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. // Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. М., 2004.
2. Shah S.K., Grant S.K., Maccoss M. et al. International Patent WO 96/14842. 23.05.1996.
3. Ji H., Li H., Flinspach M., Poulos T.L., Silverman R.B. // J. Med. Chem. 2003. **46**. P. 5700.

Поступила в редакцию 09.04.07

DESIGN OF POTENTIAL NO-SYNTASE INHIBITORS ON THE BASIS OF 2-AMINO-5,6-DIHYDRO-4H-1,3-THIAZINE DERIVATIVES

A.A. Levtsova, V.I. Chupakhin, A.N. Proshin, A.N. Pushin, T.P. Trofimova, O.N. Zefirova

(Division of Radiochemistry, Division of Organic Chemistry, Division of Physical Chemistry)

Two spiro- analogues of a known NO-synthase inhibitor 2-amino-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazine were synthesized by means of cyclization of the N-2-(1-cyclohexenyl)ethyl-substituted thioureas.