

УДК. 547.518+547.86

## СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ NOS-ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ N-АЦИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 2-АМИНО-5,6-ДИГИДРО-4H-1,3-ТИАЗИНА

Т.П. Трофимова, О.Н. Зефирова, А.А. Мандругин, В.М. Федосеев, Д.И. Перегуд\*,  
М.В. Онуфриев\*\*, Н.В. Гуляева\*\*, С.Я. Проскуряков\*\*\*

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

В работе описан синтез и результаты тестирования *in vitro* и *in vivo* 2-N-ацетиламино-, 2-N-бензоиламино-, 2-N-гексаноиламино- и 2-N-(1-адамантоил)амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазинов на проявление NOS-ингибирующей активности.

2-Амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин (**1**) является известным ингибитором фермента NO-синтазы (NOS) [1, 2] и обладает антигипотензивной активностью в экспериментах *in vivo* [3]. С целью увеличения продолжительности антигипотензивного действия этого соединения нами было предложено синтезировать его более липофильные аналоги, которые могли бы выступать в качестве пролекарств<sup>1</sup>. В данной работе синтезированы и протестированы *in vitro* и *in vivo* четыре N-ацильных производных тиазина **1** со структурно разнообразными заместителями, а именно: 2-N-ацетиламино-, 2-N-бензоиламино-, 2-N-гексаноиламино- и 2-N-(1-адамантоил)амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазины (**2a–г**, схема 1). Отметим, что выбор заместителей определялся не только их липофильны-

ми характеристиками, но и возможным влиянием на скорость гидролиза амидной связи *in vivo*.

Для синтеза соединений **2a–г** была реализована схема 1. На первом этапе получали базовое соединение **1** из гидробромида 3-бромпропиламина и тиомочевины через циклизацию дигидробромида S-аминопропилизотиомочевины [4]. Затем проводили реакцию ацилирования уксусным ангидридом (для **2a**, схема 2) или хлорангидридами соответствующих кислот (для **2б–г**)<sup>2</sup>. Состав и структура полученных веществ подтверждены на основании данных элементного анализа, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. На следующем этапе нами были проведены эксперименты по приблизительной оценке ингибирующей активности соединений **2a–г** по отношению к двум изофор-

Схема 1

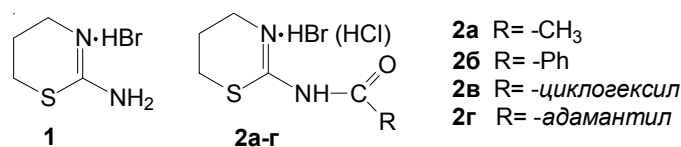
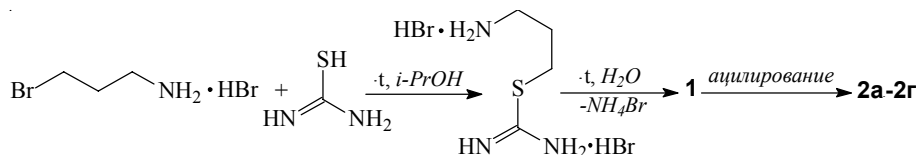


Схема 2



\* Федеральное государственное учреждение Национальный научный центр наркологии Росздрава.

\*\* Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук.

\*\*\* Государственное учреждение Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук.

<sup>1</sup>Пролекарство – соединение, которое претерпевает биотрансформацию перед тем, как произвести фармакологический эффект (до биотрансформации такое соединение обычно неактивно или малоактивно).

<sup>2</sup>Для получения соединения **2г** хлорангидридом адамантанкарбоновой кислоты ацилировали основание 2-амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазина.

мам NO-синтазы – индуцибельной *i*NOS и нейрональной *n*NOS (рис. 1). Тестирование проводили *in vitro* радиометрическим методом с использованием [ $^3\text{H}$ ]-L-аргинина (природного субстрата NO-синтазы). Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтезированные соединения **2а–г** ингибируют NO-синтазу в заметно меньшей степени по сравнению с базовым соединением **1** (рис. 1, 2).

На заключительном этапе исследования для соединений **2а–г** были проведены испытания физиологической активности в экспериментах на лабораторных животных. Изначально оценивали влияние синтезированных соединений на выработку оксида азота (NO) в печени мышей. Тестирование *ex vivo* показало, что соединения **2а** и **2б** обладают примерно таким же ингибирующим эффектом на выработку оксида азота в печени мышей, как и базовый тиазин (**1**) [(доза, необходимая для ингибирования продукции NO на 50% (ИД<sub>50</sub>), составляет около 3 мкмоль/кг]. NO-ингибирующая активность *ex vivo* ацильных производных **2в** и **2г** оказалась существенно более низкой (на

один-два порядка), чем у базового тиазина. Исследование антигипотензивной активности соединений **2а,б**, проведенное *in vivo* на крысах, в том числе и на модели септического шока, показало, что антигипотензивный эффект **2а** приблизительно в два раза более длителен по сравнению с таковым для тиазина **1**.

Таким образом, наилучший результат из серии синтезированных веществ был достигнут для соединения **2а**, которое действительно оказалось эффективным пролекарством тиазина **1**. Учитывая, что определенная *in vivo* токсичность соединения **2а** очень мала, 2-ацетиламино-5,6-дигидро-4*H*-1,3-тиазин (**2а**) стал предметом патентной заявки в качестве потенциального антигипотензивного средства [5].

### Экспериментальная часть

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  регистрировали на спектрометрах «Bruker WP-100SY» с рабочей частотой 100 МГц и «Bruker CXP-200» с рабочей частотой 200 МГц с использованием ТМС в качестве внутреннего стандарта. Контроль протекания реакций прово-

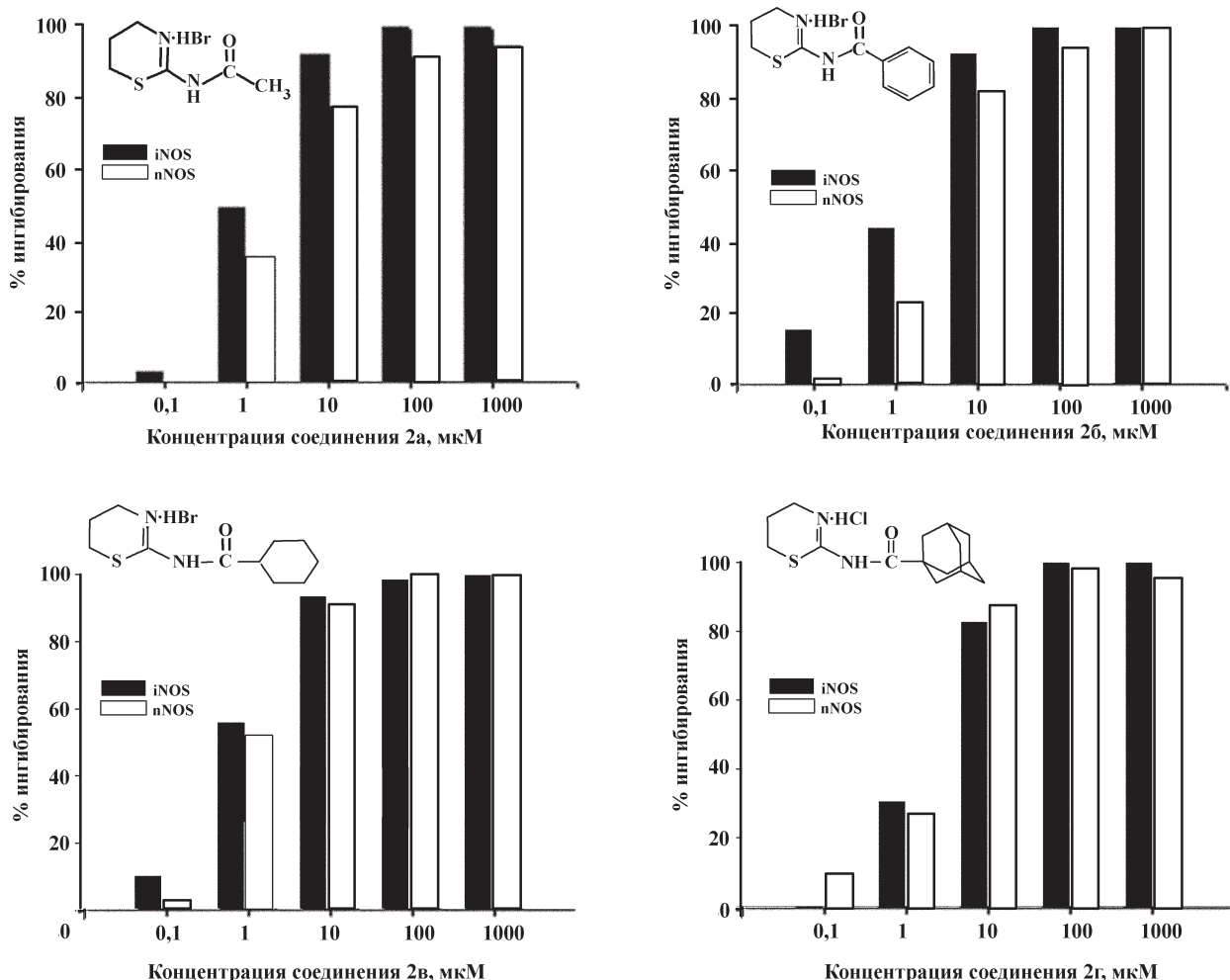


Рис. 1. Зависимости процента ингибирования активности изоформ NOS от концентрации тестируемых соединений **2а–г** (методику см. в экспериментальной части)

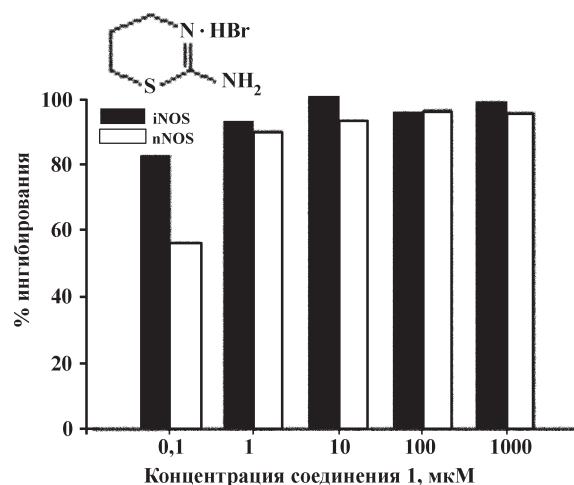


Рис. 2. Зависимости процента ингибирования активности изоформ NOS от концентрации базового тиазина 1

дили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах *Silufol UV-254*, хроматографическая система *бутанол–ацетон–муравьиная кислота* (1:1:1). Масс-спектры регистрировали на квадрупольном масс-спектрометре “*Shimadzu LCMS-2010 A*” с ионизацией в электроспрее.

**2-N-ацетиламино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин гидробромид (2а).** К 0,7 г (0,0036 моль) 2-аминотиазина гидробромидом добавили 5 мл (0,053 моль) уксусного ангидрида и нагревали при 90°C, перемешивая магнитной мешалкой в течение 10,5 ч. После охлаждения выпавший осадок отфильтровывали и промывали эфиром. Получено 0,72 г соединения **2а**. Выход: 84%.  $T_{пл} = 192–194^{\circ}\text{C}$ . (лит. [4] 179–180°C). Найдено, %: С 30.25, 30.32; Н 4.39, 4.52; N 11.62, 11.86.  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{OS}$ . Вычислено, %: С 30.14; Н 4.64; N 11.71. Масс-спектр: 117 ( $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_2\text{S}^+$ ), 159 ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{SO}^+$ ). Спектр  $^{13}\text{C}$  (ДМСО- $d_6$ - $\text{CCl}_4$  (1:4),  $\delta$ , м.д.): 172,39 ( $\text{C}^7$ ); 166,42 ( $\text{C}^2$ ); 41,97 ( $\text{C}^4$ ); 26,80 ( $\text{C}^6$ ); 24,30 ( $\text{C}^8$ ), 19,22 ( $\text{C}^5$ ). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ - $\text{CCl}_4$ (1:4),  $\delta$ , м.д., J, Гц): 2,15 (м., 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,32 (с., 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3,40 (т., 2H,  $J=5.6$ ,  $\text{CH}_2\text{S}$ ); 3,75 (т., 2H,  $J=5.6$ ,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 12,10 (ш. с., 2H,  $\text{NH}+\text{N}^+\text{H}$ ).

**2-N-бензоиламино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин гидробромид (2б).** К 0,3 г (0,0015 моль) 2-аминотиазина гидробромидом добавили 2 мл (0,017 моль) хлорангидрида бензойной кислоты и нагревали при 140°C, перемешивая магнитной мешалкой в течение 15–20 мин. После охлаждения выпавший осадок отфильтровывали и промывали эфиром. Получено 0,35 г соединения **2б**. Выход: 76%.  $T_{пл} = 220–223^{\circ}\text{C}$  (лит. [4] 218–220°C). Найдено %: С 43.62, 43.98; Н 4.46, 4.28; N 9.48, 9.32.  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{OS}$ . Вычислено %: С 43.86;

Н 4.35; N 9.30. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ - $\text{CCl}_4$  (1:4),  $\delta$ , м.д., J, Гц): 2,15 (м., 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,35 (т., 2H,  $J=5.6$ ,  $\text{CH}_2\text{S}$ ); 3,80 (т., 2H,  $J=5.6$ ,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 7,78–8,45 (5H, м,  $\text{H}_{аром}$ ); 12,10 (ш. с., 2H,  $\text{NH}+\text{N}^+\text{H}$ ).

**2-N-циклогексениламино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин гидробромид (2в).** К 0,5 г (0,0025 моль) 2-аминотиазина гидробромидом прибавили 4 мл (0,017 моль) хлорангидрида циклогексанкарбоновой кислоты и нагревали при 170°C, перемешивая магнитной мешалкой 20–25 мин. После охлаждения добавили 10 мл диэтилового эфира, выпавший осадок отфильтровывали и промыли эфиром. Получено 0,67 г соединения **2в**. Выход: 86%.  $T_{пл} = 153–154^{\circ}\text{C}$ . Найдено %: С 43.16, 43.32; Н 6.34, 6.28; N 8.94, 9.18.  $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{OS}$ . Вычислено %: С 43.00; Н 6.23; N 9.12. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ - $\text{CCl}_4$  (1:4),  $\delta$ , м.д., J, Гц): 1,40 (м., 5H,  $\text{C}_6\text{H}_{11}$ ); 1,85 (м., 3H,  $\text{C}_6\text{H}_{11}$ ); 1,95 (м., 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,20 (м., 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,65 (м., Н,  $\text{CH}-\text{CO}$ ); 3,35 (т., 2H,  $J=6$ ,  $\text{CH}_2\text{S}$ ); 3,70 (т., 2H,  $J=6$ ,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 12,10 (ш. с., 2H,  $\text{NH}+\text{N}^+\text{H}$ ).

**2-N-(1-адамнтаноил)амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин гидрохлорид (2г).** К раствору 0,5 г (0,0025 моль) 2-аминотиазина гидробромидом в 5 мл воды прибавляли при перемешивании 1 мл 10%-го раствора NaOH. Через 5 мин приливали 10 мл  $\text{CHCl}_3$  и перемешивали 1 ч. Органический слой отделяли, сушили над  $\text{MgSO}_4$ , затем упаривали растворитель. К остатку прибавили 0,33 мл триэтиламина и 0,48 г (0,017 моль) хлорангидрида адамантан-1-карбоновой кислоты. Перемешивали 1 ч, затем отфильтровывали осадок гидрохлорида триэтиламина и упарили на роторном испарителе. Остаток растворили в 3 мл изопропилового спирта и прибавили по каплям при перемешивании 5 мл конц. HCl. Выпавший осадок отфильтровывали, растворили в ацетоне, повторно отфильтровывали и упарили фильтрат. Получили 0,27 г соединения **2г** в виде белых кристаллов. Выход: 36%.  $T_{пл} = 243–245^{\circ}\text{C}$ . Найдено %: С 57.38, 57.45; Н 9.07, 8.99; N 8.94, 9.18.  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{OS}$ . Вычислено %: С 57.22; Н 7.36; N 8.90. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ - $\text{CCl}_4$  (1:4),  $\delta$ , м.д., J, Гц): 2,20–1,75 (м., 15H, каркасн.); 2,40 (м., 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,65 (м., Н,  $\text{CH}-\text{CO}$ ); 3,4 (т., 2H,  $J=6.5$ ,  $\text{CH}_2\text{S}$ ); 3,85 (т., 2H,  $J=6.5$ ,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 12,30 (ш. с., 2H,  $\text{NH}+\text{N}^+\text{H}$ ).

**Тестирование in vitro.** Активность NO-синтазы измеряли в двух препаратах: iNOS, выделенной из стимулированных липополисахаридом макрофагов мыши производства “*Cayman chemical*”, США (22,43 Ед/мг; 4,97 мг/мл; 111,5 Ед/мл, каталожный номер 60862) и в растворимой фракции гомогената мозжечка крыс (NO-синтазная активность, детектируемая

в данном образце, представлена преимущественно кальций-зависимой *n*NOS). Активность NOS определяли радиометрическим методом (“Wollac-1414”, “Vinspectral”, Финляндия) по скорости накопления [<sup>3</sup>H]-цитруллин в катализируемой NOS-реакции окисления [<sup>3</sup>H]-L-аргинина (0,37 Ки/ммоль) [6] в собственной экспериментальной модификации [7]. Результаты представлены (см. рис. 1, 2) в виде процента ингибирования (т.е. разности активностей между пробами без ингибиторов и содержащих ингибиторы, выраженной в процентах от активности в пробах без ингибиторов).

**Тестирование *in vivo*.** Оценку выработки оксида азота в печени лабораторных животных проводили *ex vivo* на белых неинбредных мышцах-самках (возраст 5 мес., 27–30 г, исходный генотип – линия *Swiss*). За 4 ч до эвтаназии эфиром животным (и тестируемой и контрольной группам) инъецировали липополисахарид *E. coli* (ЛПС) (1,5 мг/кг, 0,5 мл физиологического раствора на одну мышшь). Через 3 ч после инъекции опытной группе животных внутрибрюшинно вводили препараты **2a–г** (контрольная группа получала физио-

логический раствор), через 1 ч извлекали пробы печени и замораживали в жидком азоте. Продукцию NO<sup>•</sup> определяли с помощью ЭПР-спектроскопии спиновой ловушки по методу А.Ф. Ванина [8, 9].

Изучение антигипотензивной активности проводили *in vivo* на группах крыс (“Wistar”, самцы и самки, 200–310 г). Животных наркотизировали внутрибрюшинным введением нембутала (55 мг/кг) и регистрировали фоновые показатели систолического и диастолического давления из устья левой сонной артерии, частоту сердечных сокращений и частоту дыхательных движений. Затем вводили препараты **2a,б** в 0,9%-м водном растворе NaCl и продолжали регистрацию вышеуказанных параметров (до устойчивого и выраженного снижения артериального давления). Тестирование препаратов **2a,б** проводили аналогично на экспериментальных животных с устойчивой гипотонией – модель септического шока, вызванного ЛПС (18 мг/кг раствора ЛПС вводили животному в яремную вену в течение 2–3 мин сразу после записи фоновых показателей).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 05-04-48794а) и гранта НШ-2552.2006.3. Авторы выражают благодарность доценту МГУ Г.А. Бадуну и студентке V курса МГУ А.А. Левцовой за синтез [<sup>3</sup>H]-L-аргинина.

#### 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., Shankaran K., Guthikonda R.N. International Patent WO 96/14842. 23.05.1996.
3. Прокуряков С.Я., Филимонова М.В., Верховский Ю.Г., Коноплянников А.Г., Мандругин А.А., Федосеев В.М., Скворцов В.Г. // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2004. **138**. С. 446.
4. Schuberl A., Magosch K.H. // Ann. Chem. 1970. **742**. P. 74.
5. Мандругин А.А., Прокуряков С.Я., Трофимова Т.П., Зефирова Н.С., Верховский Ю.Г., Зефирова О.Н., Федосеев В.М. Заявка № 20071049993 (патент РФ на изобретение) от 09.02.2007.
6. Bredt D.S., Snyder S.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. **86**. P. 9030.
7. Онуфриев М.В., Семенова Т.П., Колаева С.Г., Мусеева Ю.В., Егорова Л.К., Гуляева Н.В. // Нейрохимия. 2002. **19**. С. 264.
8. Vanin A.F., Mordvintsev P.I., Kleschev A.L. // Studia Biophys. 1984. **102**. P. 135.
9. Коноплянников А.Г., Прокуряков С.Я., Штейн Л.В. и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1999. **127**. С. 648.

Поступила в редакцию 01.11.2007.

## SYNTHESIS AND STUDY OF NOS-INHIBITING ACTIVITY OF N-ACYL-2-AMINO-5,6-DIHYDRO-4H-1,3-THIAZINES

T.P. Trofimova, O.N. Zefirova, A.A. Mandrugina, V.M. Fedoseev, D.I. Peregud, M.V. Onufriev, N.V. Gulyaeva, S.Ya. Proskuryakov

(Division of Radiochemistry, Division of Physical Chemistry)

Synthesis and the results of *in vivo* and *in vitro* biological tests for NOS inhibiting activity of 2-N-acetylamino-, 2-N-benzoylamino-, 2-N-cyclohexylamino- and 2-N-(1-adamantoyl)amino-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazines are presented in the paper.