

УДК 547.786

КОВГАНКО Н.Н.*¹, КОВГАНКО В.Н.²,

СИМОНЕНКО Л.И.¹, СЛАБКО И.Н.¹

**СИНТЕЗ И АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
ФТОРАРИЛ-2-ИЗОКСАЗОЛИНОВ**

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

²Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»

По данным Всемирной организации здравоохранения туберкулез легких остается одним из серьезнейших инфекционных заболеваний человека даже в XXI веке. По числу смертельных исходов туберкулез «уступает» только малярии и СПИДу [1]. Развитие туберкулеза в организме человека связано с патогенным действием микобактерий [1,2]. Поэтому основное направление в лечении этого заболевания связано с применением антимикобактериальных препаратов различных классов.

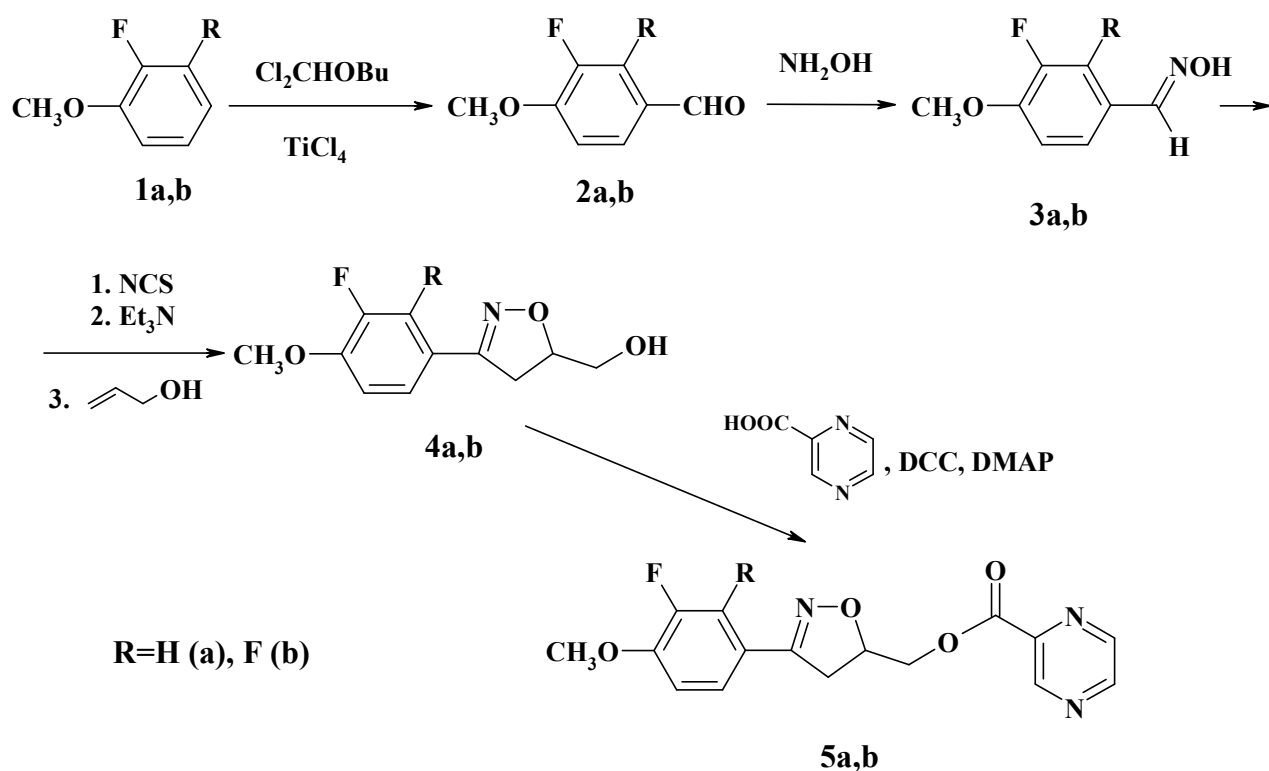
В настоящее время известно много лекарственных средств, пригодных для терапии туберкулеза. Однако поиск новых антимикобактериальных препаратов является актуальной задачей. Это в первую очередь связано с высокой резистентностью микобактерий к различным антибиотикам [1,2].

Один из подходов получения новых веществ с антимикобактериальной

активностью является модификация противотуберкулезного препарата пиразинамида [3-7]. Активная форма этого препарата – пиразинкарбоновая кислота, которая образуется внутри клеток микобактерий под действием фермента пиразинамидазы. Возникновение резистентности к пиразинамиду связывают с нарушением работы этого фермента [8]. Таким образом, пиразинамид является транспортной формой противобактериального препарата [8]. Хорошим подтверждением такого механизма действия пиразинамида является то, что ряд других производных пиразинкарбоновой кислоты обладает антимикобактериальными свойствами. Так, в работах [8,9] показано, что хорошими противотуберкулезными свойствами обладают сложные эфиры пиразинкарбоновой кислоты. При этом соответствующие сложные эфиры обладают высокой активностью и в отношении к резистентным к пиразинамиду штаммам микобактерий.

При проведении исследований по получению новых веществ с антимикобактериальной активностью наше внимание привлекли сообщения о высокой противотуберкулезной активности соединений, содержащих в своей структуре 2-изоксазолиновый цикл [10,11]. Нами предположено, что перспективные антимикобактерициды могут быть получены на основе различных производных пиразинкарбоновой кислоты, которые содержат 2-изоксазолиновый цикл. При этом эффективность таких соединений, по нашему предположению, может оказаться высокой в связи с комбинированным действием пиразинкарбоновой кислоты и замещенного 2-изоксазолина.

В качестве первоначальных объектов исследований нами выбраны сложные эфиры пирозинкарбоновой кислоты и спиртов **4**, содержащих 2-изоксазолиновый гетероцикл. Соединения **4** относятся к ряду 3-арил-2-изоксазолинов, арильный заместитель которых содержит атомы фтора. Показано, что введение атома фтора может улучшать противотуберкулезные свойства [4-6] антимикобактерицидов.



Для получения ключевых промежуточных 2-изоксазолинов **4** нами выбрана реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения фторсодержащих ароматических нитрилоксидов к аллиловому спирту. Соответствующие нитрилоксиды могут быть получены из оксимов фторсодержащих бензальдегидов [12].

На первой стадии синтеза фторанизолы **1a,b** подвергли формилированию по Рихе [13]. В качестве формилирующего агента использован

дихлорметилбутиловый эфир, легко получаемый из бутилформиата и пентахлорида фосфора. Выход целевых фторсодержащих альдегидов **2a** и **2b** составил 73 и 61% соответственно. Строение полученных соединений подтверждено ИК и ПМР спектрами. Кроме того, температуры плавления синтезированных альдегидов совпадают с описанными в литературе [14,15].

Дальнейшим взаимодействием альдегидов **2a,b** с гидрохлоридом гидроксилamina получены соответствующие оксимы **3a,b**. Хлорирование оксимов **3a,b** с помощью *N*-хлорсукцинимида и последующее дегидрохлорирование под действием триэтиламина привело к соответствующим нитрилоксидам. Без выделения нитрилоксида вводили в реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения с аллиловым спиртом. Такая последовательность превращений привела к образованию необходимых 2-изоксазолинов **4a,b**, которые выделены с выходами 72 и 77% соответственно. Строение полученных соединений подтверждено данными ИК и ПМР спектров. Так, в ИК спектрах синтезированных веществ присутствуют характерные полосы поглощения гидроксильной группы в области 3700-3200 см⁻¹. В спектре ПМР соединений **4a,b** присутствуют сигналы протонов бензольных циклов и гидроксиметиленовой группы. Также в спектре ПМР присутствуют характерные сигналы, соответствующие протонам, расположенным при C-4 и C-5 атомах гетероцикла. Это подтверждает образование 2-изоксазолинового цикла на стадии 1,3-диполярного циклоприсоединения.

Дальнейшая этерификация полученных соединений **4a,b** с пиазин-2-

карбоновой кислотой в присутствии дициклогексилкарбодиимида привела к соответствующим сложным эфирам **5a,b**. Строение полученных веществ также подтверждено с помощью ПМР спектров, в которых в дополнение к сигналам, характерным для исходных спиртов **4a,b**, появляются сигналы протонов пиразинового цикла.

Исследование противотуберкулезных свойств полученных соединений проведено на штамме *Micobacterium terrae*. Данный штамм является непатогенным и рекомендован для использования в качестве модельного для определения противотуберкулезной активности [16].

Антимикобактериальные свойства полученных соединений оценены на основании минимальной ингибирующей концентрации (МИК, мкг/мл), которые приведены в таблице. В качестве эталонов использованы известные противотуберкулезные препараты: пиразинамид, изониазид, циклосерин [1].

Таблица Антимикобактериальная активность синтезированных соединений

Соединение	4a	4b	5a	5b	Пиразин-амид	Цикло-серин	Изониазид
МИК, мкг/мл	>200	>200	>200	>200	200	100	200

В результате проведенных экспериментов установлено, что 2-изоксазолины **4a,b** и сложные эфиры **5a,b** обладают антимикобактериальной активностью, которая, однако, значительно ниже в сравнении с используемыми в настоящее время противотуберкулезными средствами. Тем

не менее, наше предположение о том, что 2-изоксазолин содержащие производные пиразинкарбоновой кислоты могут обладать высокой антибактериальной активностью требует дополнительной экспериментальной проверки. Работа в данном направлении продолжается, и о ее результатах будет сообщено дополнительно.

Экспериментальная часть.

Температуры плавления определены с помощью нагревательного столика, соединенного с поляризационным микроскопом. ИК спектры получены в растворов в хлороформе (если не указано иначе) на приборе Specord 75 IR. УФ спектры – в растворах в этаноле на спектрофотометре Specord M500. Спектры ПМР растворов в дейтерохлороформе (если не указано иначе) записаны на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 400 (400 МГц). Химические сдвиги приведены относительно ГМДСО (гексаметилдисилоксана) как внутреннего стандарта. Ход реакций и чистоту полученных соединений контролировали с помощью пластинок Kieselgel 60 F₂₅₄ фирмы "Merck".

3-Фтор-4-метоксибензальдегид 2a и **2,3-дифтор-4-метоксибензальдегид 2b** получены формилированием соответствующих анизолов по Рихе по методике, аналогичной [14].

Оксим 3-фтор-4-метоксибензальдегида 3a. К кипящему раствору 20.0 г альдегида **2a** в 100 мл 2-пропанола добавили по каплям раствор 10 г гидрохлорида гидроксилamina и 19.5 г ацетата натрия в 70 мл воды. Реакционную смесь дополнительно кипятили с обратным холодильником 1 ч, после чего добавили 200 мл воды и оставили кристаллизоваться. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой и сушили на воздухе. Получили 22.7 г оксима **3a** в виде смеси *син*-/*анти*-изомеров (1:10). Выход 99%. Т. пл. 123-124.5°C (толуол). ИК спектр (THF, см⁻¹): 3475–3150 (O-H), 1615 (C=N). Спектр ПМР ((CD₃)₂CO, δ, м.д.): *анти*-изомер: 3.82 (3H, с, OCH₃), 7.14 (1H, т,

J 8.4 Гц, аром. протон), 7.33 (2H, иск. д, J 8.4 Гц, аром. протон), 7.41 (1H, дд, J₁ 2.0 Гц, J₂ 12.0 Гц, аром. протон), 8.06 (1H, с, СН), 10.30 (1H, с, ОН); *син*-изомер: 3.83 (3H, с, ОСН₃), 7.18 (1H, т, J 8.4 Гц, аром. протон), 7.29 (1H, с, СН), 7.67 (2H, иск. д, J 8.4 Гц, аром. протон), 8.00 (1H, дд, J₁ 2.0 Гц, J₂ 13.2 Гц, аром. протон), 10.76 (1H, с, ОН).

Оксим 2,3-дифтор-4-метоксибензальдегида 3b получен аналогичным образом из альдегида **2b**. Выход 66.8%. ИК спектр (СНCl₃, см⁻¹): 3515-3135 (О-Н), 1630 (С=N), 1585, 1510 (С=C_{аром.}). Спектр ПМР ((CD₃)₂СО, δ, м.д.): 3.91 (3H, с, СН₃О), 6.97 (1H, м, J₁ 2.0 Гц, J₂ 7.2 Гц, аром. протон), 7.47 (1H, м, J₁ 2.0 Гц, J₂ 7.2 Гц, аром. протон), 8.15 (1H, с, С-Н), 10.58 (1H, с, NO-Н).

3-(3-Фтор-4-метоксифенил)-5-гидроксиметил-2-изоксазолин 4a. К раствору 5.0 г оксима **3a** в 70 мл диметилформамида добавили порциями 4.34 г *N*-хлорсукцинимиды (после добавления первой порции реакцию смесь продули воздухом, собранным над концентрированной соляной кислотой). Реакционную смесь перемешивали дополнительно 1.5 ч при 15°C, затем охладили до 0-5°C. Далее последовательно добавили 4.0 мл аллилового спирта и раствор 4.5 мл триэтиламина в 30 мл диметилформамида. Перемешивали 3 ч при 0-5°C и затем 15 ч при комнатной температуре, после чего реакцию смесь разбавили 50 мл воды. Продукт реакции экстрагировали метилхлоридом. Объединенный органический слой промыли дважды насыщенным раствором хлорида натрия. Большую часть растворителя удалили при пониженном давлении, остаток вылили в разбавленный раствор хлорида натрия. Выпавший осадок отфильтровали,

промыли на фильтре водой. После перекристаллизации из этилацетата получили 4.47 г 2-изоксазолина **4a**. Выход 72.3%. Т. пл. 145.5°C (этилацетат). ИК спектр (THF, cm^{-1}): 3640–3210 (O-H), 1625 (C=N). Спектр ПМР ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ , м.д.): 3.23 (1H, дд, J_1 7.6 Гц, J_2 16.8 Гц, 4-CH), 3.38 (1H, дд, J_1 10.8 Гц, J_2 16.8 Гц, 4-CH), 3.64 (2H, м, J_1 4.8 Гц, J_2 6.0 Гц, CH_2OH), 3.91 (3H, с, OCH_3), 4.02 (1H, т, J 6.0 Гц, OH), 4.75 (1H, м, J_1 4.8 Гц, J_2 7.6 Гц, J_3 10.8 Гц, 5-CH), 7.17 (1H, т, J 8.4 Гц, аром. протон), 7.41 (1H, тд, J_1 2.0 Гц, J_2 8.4 Гц, аром. протон), 7.46 (1H, дд, J_1 2.0 Гц, J_2 10.4 Гц, аром. протон).

3-(2,3-Дифтор-4-метоксифенил)-5-гидроксиметил-2-изоксазолин 4b получен аналогичным образом из оксима **3b**. Выход 77.1%. Т. пл. 121°C (этилацетат). ИК спектр (THF, cm^{-1}): 3700–3200 (O-H), 1625 (C=N). Спектр ПМР ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ , м.д.): 3.30 (1H, ддд, J_1 2.0 Гц, J_2 8.0 Гц, J_3 17.2 Гц, 4-CH), 3.45 (1H, ддд, J_1 2.0 Гц, J_2 10.8 Гц, J_3 17.2 Гц, 4-CH), 3.67 (2H, м, CH_2OH), 3.96 (3H, с, OCH_3), 4.13 (1H, т, J 5.6 Гц, OH), 4.75 (1H, м, 5-CH), 7.05 (1H, м, аром. протон), 7.49 (1H, м, аром. протон).

3-(3-Фтор-4-метоксифенил)-2-изоксазолин-5-ил-метилловый эфир пиазин-2-карбоновой кислоты 5a. К смеси 0,016 г пиазин-2-карбоновой кислоты, 0.031 г спирта **4a** и 0.028 г дициклогексилкарбодиимида в 5 мл метиленхлорида добавили каталитические количества 4-*N,N*-диметиламино-пиазина. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Образовавшийся осадок дициклогексилмочевины отделили фильтрованием через слой оксида алюминия. Сорбент дополнительно промыли метиленхлоридом. Растворитель удалили при пониженном

давлении, остаток перекристаллизовали из 2-пропанола. Получили 0.016 г сложного эфира **5a**. Выход 38%. Т.пл. 133-134°C (2-пропанол). Спектр ПМР (дейтеродиоксан, δ , м.д.): 3.20 (1H, дд, J_1 8.3 Гц, J_2 17.0 Гц, 4-CH), 3.46 (1H, дд, J_1 11.0 Гц, J_2 17.0 Гц, 4-CH), 3.88 (3H, с, OCH₃), 4.47 (2H, д, J 5.5 Гц, OCH₂), 5.03 (1H, м, 5-CH), 7.07 (1H, т, J 9.0 Гц, аром. протоны), 7.44-7.48 (2H, м, аром. протоны) {фенил}, 8.64-8.73 (2H, м, аром. протоны), 9.22 (1H, д, J 1.0 Гц, аром. протон) {пиразин}. УФ спектр (λ_{\max} , нм): 269 (этанол).

3-(2,3-Дифтор-4-метоксифенил)-2-изоксазолин-5-ил-метилвыйл эфир пиразин-2-карбоновой кислоты 5b получен аналогично взаимодействием пиразин-2-карбоновой кислоты со спиртом **4b**. Выход 73%. Т.пл.135-136°C (2-пропанол). УФ спектр (λ_{\max} , нм): 269 (этанол). Спектр ПМР (дейтеродиоксан, δ , м.д.): 3.29 (1H, ддд, J_1 2.2 Гц, J_2 7.1 Гц, J_3 17.3 Гц 4-CH), 3.57 (1H, ддд, J_1 2.2 Гц, J_2 11.0 Гц, J_3 17.3 Гц 4-CH), 3.92 (3H, с, OCH₃), 4.44 (1H, дд, J_1 6.0 Гц, J_2 12.0 Гц OCH), 4.49 (1H, дд, J_1 4.0 Гц, J_2 12.0 Гц OCH), 5.06 (1H, м, 5-CH), 6.93 (1H, дт, J_1 1.5 Гц, J_2 10.0 Гц, аром. протоны), 7.62 (1H, дт, J_1 2.0 Гц, J_2 10.0 Гц, аром. протоны) {фенил}, 8.65-8.73 (2H, м, аром. протоны), 9.21 (1H, с, аром. протон) {пиразин}. УФ спектр (λ_{\max} , нм): 269 (этанол). ИК спектр, см⁻¹ (KBr): 3325, 3274 (N-H), 2930, 2851 (C-H), 1721 (C=O), 1573, 1627, 1650 (C=N, C=C_{аром.}), 1297, 1066 (C-O).

Для изучения антимикобактериальных свойств полученных соединений по отношению к *M.terrae* 15755 был использован метод разведений в плотной питательной среде в чашках Петри. Исходный раствор образца в диметилсульфоксиде (концентрация 2 мг/мл) добавляли в питательную среду

Миддлбрука 7Н9 с глицерином (Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol) для получения требуемых концентраций (200, 100, 50, 25, 12,5 и 6.25 мкг/мл) и высевали культуру микобактерий в анализируемых чашках Петри. В качестве контроля использовали два образца. В первый добавляли диметилсульфоксид, в количестве, равном как в образцах с максимальной концентрацией анализируемого вещества – 200 мкг/мл (контроль влияния растворителя). Второй образец не содержал никаких добавок (контроль роста культуры). Образцы выдерживали в термостате при 37°C в течение трех недель (до появления роста на контрольном образце) и анализировали полученные результаты. МИК определяли как концентрацию, при которой роста микобактерий в чашке Петри не наблюдалось.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ботева А. А., Красных О. П., Ван Б., Францблау С. Г. *Фармация*. 2008. №7. С. 49-52.
2. Janin Y. L. *Bioorg. Med. Chem.* 2007. Vol. 15. № 7. P. 2479–2513.
3. Doležal M., Zitko J., Kešetovičová D., Kuneš J., Svobodová M. *Molecules*. 2009. Vol. 14. № 10. P. 4180-4189.
4. Dolezal M., Miletin M., Kunes J., Kralova K. *Molecules*. 2002. Vol. 7. № 3. P. 363-373.
5. Dolezal M., Vicik R., Miletin M., Kralova K. *Chem. Pap.* 2000. Vol. 54. № 4. P. 245–248.
6. Dolezal M., Cmedlova P., Palek L., Vinsova J., Kunes J., Buchta V., Jampilek J., Kralova K. *Eur. J. Med. Chem.* 2008. Vol. 43. № 5. P. 1105–1113.
7. Chung W. J., Kornilov A., Brodsky B. H., Higgins M., Sanchez T., Heifets L. B., Cynamon M. H., Welch J. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008. Vol. 88. № 5. P. 410-419.
8. Speirs R. J., Welch J. T., Cynamon M. H. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995. Vol. 39. № 6. P. 1269-1271.
9. Cynamon M. H., Klemens S. P., Chou T. S., Gimi R. H., Welch J. T. *J. Med. Chem.* 1992. Vol. 35. № 7. P. 1212–1215.
10. Sun R. D., Lee R. B., Tangallapally R. P., Lee R. E. *Eur. J. Med. Chem.* 2009. Vol. 44. № 2. P. 460-472.
11. Tangallapally R. P., Sun D. R., Budha N., Lee R. E., Lenaerts A. J., Meibohm B., Lee R. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. Vol. 17. № 23. P. 6638-6642.
12. Grundmann C., Grünanger P. *The Nitrile Oxides. Versatile Tools of Theoretical and Preparative Chemistry.* – Berlin u. a. Springer-Verlag, 1971. – 236 p.
13. Rieche A., Gross H., Höft E. *Chem. Ber.* 1960. Vol. 93. № 1. P. 88–94.

14. Lawrence N. J., Hepworth L. A., Rennison D., McGown A. T., Hadfield J. A. *J. Fluor. Chem.* 2003. Vol. 123. № 1. P. 101–108.
15. English J., Mead J. F., Niemann C. *J. Am. Chem. Soc.* 1940. Vol. 62. № 2. P. 350–354.
16. Методы изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств. Методические указания. МУ 3.5.2596-10: утв. Роспотребнадзором 20.03.2010. – М., 2010.

Реферат

УДК 547.786

Ковганко Н.Н., Ковганко В.Н., Симоненко Л.И., Слабко И.Н. **Синтез и антимикобактериальные свойства фторарил-2-изоксазолинов.**

Синтезированы новые вещества ряда фторарил-2-изоксазолинов и изучены их антимикобактериальные свойства. Ключевой стадией синтеза является 1,3-диполярное циклоприсоединение нитрилоксидов, полученных из оксимов 4-метокси-3-фторбензальдегида и 4-метокси-2,3-дифторбензальдегида, к аллиловому спирту.

Библиогр. 16 назв., табл. 1

KAUHANKA M. M., KAUHANKA U. M.

SIMANENKA L.I., SLABKO I.N.

SYNTHESIS AND ANTIMYCOBACTERIAL PROPERTIES OF FLUORO-ARYL-2-ISOXAZOLINES

Summary

Substances with fluoroaryl-2-isoxazoline moiety were synthesized and the antimycobacterial properties were studied. The key stage in the synthesis was 1,3-dipolar cycloaddition of corresponding nitrile oxide derived from 4-methoxy-3-fluorobenzaldehyde or 4-methoxy-2,3-difluorobenzaldehyde to allyl alcohol.