

**СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ АМИДОВ
N⁷-АРИЛ- ω -(8-ОКСО-7,8-ДИГИДРО[1,2,4]ТРИАЗОЛО[4,3-*a*]ПИРАЗИН-
3-ИЛ)АЛКИЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ**

Куликовская К.Ю., Журавель И.А.

*Национальный фармацевтический университет,
кафедра токсикологической химии, г. Харьков*

Ключевые слова: [1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-8-оны, противомикробная активность, противогрибковая активность.

Резюме: как один из вариантов усиления антибактериального действия нами осуществлена реакция амидирования N⁷-арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)алкилкарбоновых кислот алкил/арил/гетериламинами. В результате проведенного микробиологического скрининга выявлено, что все синтезированные амиды проявляют противомикробную и противогрибковую активность к стандартным тест-штаммам микроорганизмов.

Resume: as an option of the gain of antibacterial action we performed the reaction of amidation of N⁷-aryl- ω -(8-oxo-7,8-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazin-3-yl)alkylcarboxylic acids with alkyl/aryl/heterylamines. As a result of microbiological screening discovered that all synthesized amides exhibit antimicrobial and antifungal activity to the standard test strains of microorganisms.

Актуальность. Разработка лекарственных препаратов на основе новых химических субстанций – актуальная задача медицинской химии. Перспективным, на наш взгляд, является поиск потенциальных фармацевтических агентов среди производных [1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразина.

Из литературных данных известно, что производные [1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразина проявляют широкий спектр биологического действия. Наше внимание привлекли работы, где изучалась противомикробная активность некоторых соединений данного ряда [1] и их противогрибковое действие [2].

Цель: разработать методики целенаправленного синтеза биологически активных соединений в ряду производных N⁷-арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)алкилкарбоновых кислот с последующим изучением противомикробной и противогрибковой активности полученных соединений.

Задачи: 1. Разработать подходы и провести синтез N⁷-арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)алкилкарбоновых кислот; 2. Провести реакцию амидирования синтезированных соединений; 3. Доказать структуру полученных веществ; 4. Исследовать противомикробную и противогрибковую активность амидов N⁷-арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)алкилкарбоновых кислот.

Материалы и методы. В ходе синтеза новых перспективных биологически активных соединений – производных [1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразина, которые являются объектами исследования, нами использовались общепринятые методы органического синтеза.

*Общая методика синтеза N^7 -арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)пропановой/бутановой кислот **2**{1-4}. Раствор 0.05 ммоль соответствующего N^1 -арил/бензил-3-гидразинопиперазин-2(1*H*)-она **1**{1-4} и 0.2 ммоль янтарного, глутарового или алкилглутарового ангидрида в 100 мл безводного диметилформамида кипятят в течение 12 ч. После охлаждения раствор разбавляют 100 мл воды. На следующий день, осадок, который образовался, отфильтровывают, промывают два раза 30 мл ацетона и сушат при 100°C в течение 20 ч.*

*Общая методика синтеза амидов N^7 -арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)алкилкарбоновых кислот **3**{1-20}. Суспензию 0.005 ммоль соответствующей N^7 -арил-3-(8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)алкилкарбоновой кислоты **2**{1-4} в 3 мл безводного диоксана, нагревают при перемешивании до 90°C и по каплям добавляют 0.0055 ммоль *N,N*-карбонилдиимидазола (КДИ) в 1 мл безводного диоксана. Полученную смесь кипятят при перемешивании в течение 1 ч и добавляют 0.005 ммоль соответствующего амина. Реакционную смесь нагревают при температуре 90°C в течение 12 ч. После охлаждения смесь разбавляют водой и оставляют на 2 суток для образования осадка, который отфильтровывают, промывают водой и кРис. таллизуют из смеси диметилформамида (ДМФА) и пропанола-2.*

*Методика определения противомикробной и противогрибковой активности синтезированных соединений. Готовят раствор исследуемых соединений в ДМФА в концентрации 1 мг/мл. Питательную среду разливают по 2 мл в 10 стерильных пробирок. Далее в первую из пробирок каждого ряда вносят по 2 мл раствора исследуемого соединения, тщательно перемешивают и 2 мл переносят в следующую пробирку. Процесс совершают в стерильных условиях с полным рядом пробирок. Из последней пробирки 2 мл жидкости выливают. В каждом ряду одну пробирку с 2 мл питательной среды оставляют как контроль. Таким образом получают последовательные разведения анализируемых веществ в жидкой среде в концентрациях от 400 до 0.02 мкг/мл. Далее в пробирки вносят тест-культуры в количестве $2 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл и пробирки инкубируют 18-24 ч при температуре 37°C. Микробная нагрузка для *Candida albicans* составляет $5 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл, пробирки с данной культурой инкубируют 48 ч при температуре 30°C.*

Результаты и их обсуждение. Синтез N^7 -арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]-триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)алкилкарбоновых кислот проводили путем взаимодействия N^1 -замещенного 3-гидразинопиперазин-2-она **1**{1-4} с янтарным, глутаровым и алкилзамещенными глутаровыми ангидридами в соотношении 1:4 в среде безводного ДМФА.

Систематический ряд амидов N^7 -арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)алкилкарбоновых кислот **3**{1-20} синтезирован с использованием КДИ как активатора карбоксильной группы по известной методике [3] (Рис. 1, Таблица1). Структуру полученных амидов **3**{1-20} доказывали элементным анализом и ^1H ЯМР-спектроскопией.

Изучение противомикробной и противогрибковой активности синтезированных соединений проводили на базе лаборатории противомикробных средств Государственного учреждения «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова» Национальной академии медицинских наук Украины. Было исследовано 20 соединений по широкому спектру патогенных микроорганизмов. Как препараты сравнения были выбраны пипемидовая кислота (Палин, «Lek» Pharmaceutical Company d.d., Словения) – современное противомикробное средство класса фторхинолонов, налидиксовая кислота (Невиграмон, «CHINOIN», Pharmaceutical and Chemical Works Co.Ltd., Венгрия) – производное налидиксовой кислоты и флуконазол (Флуконазол, ООО ФК «Здоровье», Украина) – противогрибковое средство. Пересчет минимальной бактерицидной/фунгицидной (МБ_цК/МФ_цК) и минимальной бактериостатической/фунгистатической (МБ_{ст}К/МФ_{ст}К) концентрации проведен по содержанию действующей субстанции.

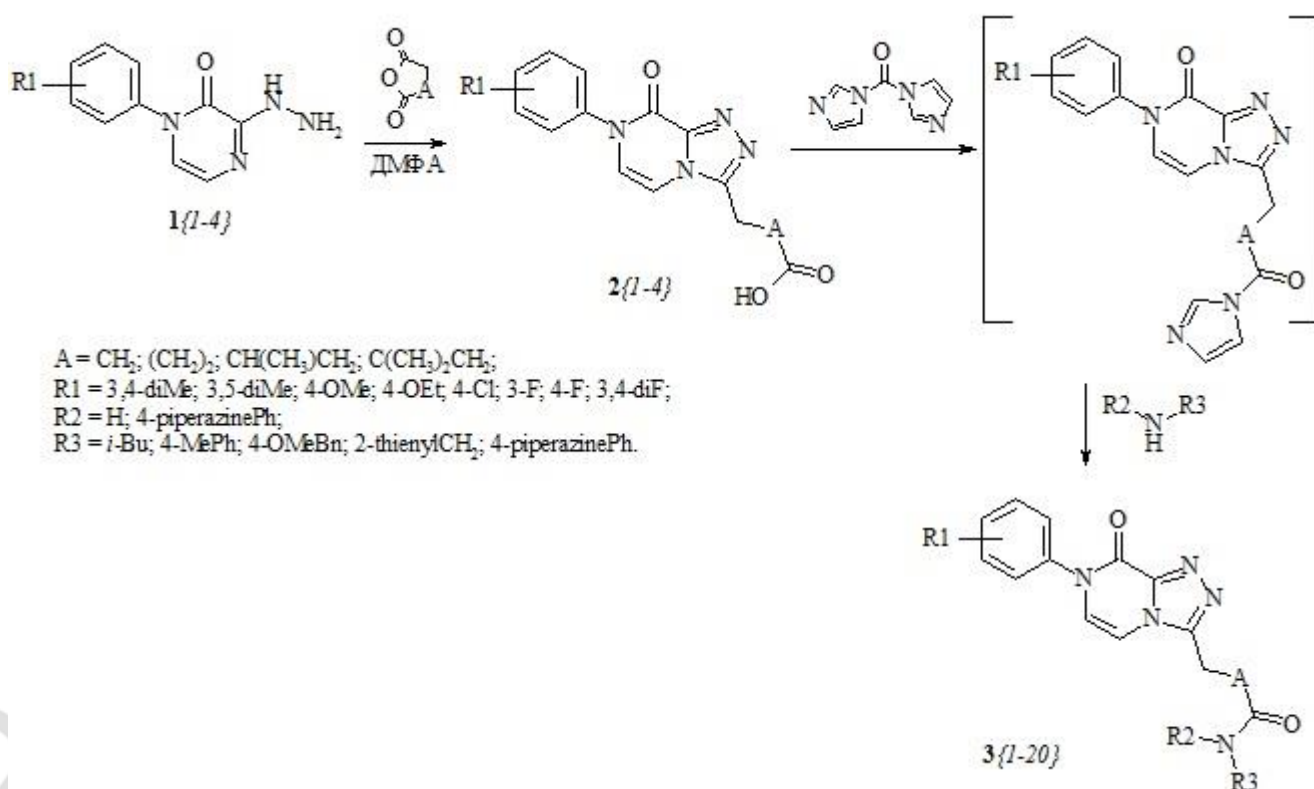


Рис. 1 – Схема синтеза амидов 3 {1-20}

Таблица 1. Амиды N^7 -арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиразин-3-ил)алкилкарбоновых кислот

Соединение	A	R1	R2	R3
3{1}	CH ₂	3,4-diMe	H	<i>i</i> -Bu
3{2}	CH ₂	3,4-diMe	H	4-OMeBn
3{3}	CH ₂	3,4-diMe	H	2-thienylCH ₂
3{4}	CH ₂	3,5-diMe	4-piperazinePh	4-piperazinePh
3{5}	CH ₂	4-OMe	H	4-MePh
3{6}	CH ₂	3-F	H	4-OMeBn
3{7}	(CH ₂) ₂	3,4-diMe	H	<i>i</i> -Bu
3{8}	(CH ₂) ₂	3,5-diMe	4-piperazinePh	4-piperazinePh
3{9}	(CH ₂) ₂	4-OEt	H	2-thienylCH ₂
3{10}	(CH ₂) ₂	4-Cl	H	4-MePh
3{11}	(CH ₂) ₂	4-F	H	<i>i</i> -Bu
3{12}	(CH ₂) ₂	3,4-diF	H	<i>i</i> -Bu
3{13}	CH(CH ₃)CH ₂	4-OEt	H	4-MePh
3{14}	CH(CH ₃)CH ₂	4-OEt	H	4-OMeBn
3{15}	CH(CH ₃)CH ₂	4-OEt	H	2-thienylCH ₂
3{16}	CH(CH ₃)CH ₂	3-F	H	<i>i</i> -Bu
3{17}	CH(CH ₃)CH ₂	3-F	H	4-OMeBn
3{18}	CH(CH ₃)CH ₂	3-F	4-piperazinePh	4-piperazinePh
3{19}	C(CH ₃) ₂ CH ₂	3-F	H	4-OMeBn
3{20}	C(CH ₃) ₂ CH ₂	3-F	H	2-thienylCH ₂

Все тестируемые вещества в эксперименте показали противомикробную и противогрибковую активность к стандартным тест-штаммам микроорганизмов в пределах концентраций МБ_{стК} (МФ_{стК}) – 12.5-25.0 мкг/мл, МБ_{цК} (МФ_{цК}) – 25.0-50.0 мкг/мл (Таблица 2, 3).

Таблица 2. Протимикробное действие амидов 3{1-20} по отношению к стандартным тест-штаммам *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*

Соединение	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	МБ _{стК}	МБ _{цК}	МБ _{стК}	МБ _{цК}	МБ _{стК}	МБ _{цК}
Pipemidic acid	6.25	12.5	25.0	50.0	12.5	50.0
Nalidixic acid	50.0	100.0	50.0	100.0	50.0	100.0
3{1}	12.5	50.0	25.0	50.0	25.0	50.0
3{2}	50.0	200.0	25.0	100.0	50.0	100.0
3{3}	12.5	50.0	25.0	100.0	25.0	100.0
3{4}	12.5	50.0	25.0	50.0	50.0	100.0
3{5}	25.0	100.0	50.0	200.0	50.0	100.0
3{6}	25.0	50.0	12.5	25.0	25.0	100.0
3{7}	25.0	50.0	25.0	50.0	25.0	50.0
3{8}	25.0	50.0	25.0	100.0	50.0	100.0
3{9}	12.5	50.0	50.0	100.0	25.0	50.0

Инновации в медицине и фармации 2015

3{10}	25.0	25.0	25.0	50.0	25.0	50.0
3{11}	12.5	25.0	12.5	50.0	25.0	50.0
3{12}	12.5	25.0	25.0	50.0	25.0	50.0
3{13}	25.0	50.0	50.0	200.0	50.0	100.0
3{14}	25.0	50.0	25.0	50.0	25.0	50.0
3{15}	25.0	50.0	50.0	100.0	25.0	50.0
3{16}	12.5	50.0	25.0	50.0	25.0	50.0
3{17}	25.0	50.0	50.0	100.0	25.0	50.0
3{18}	12.5	25.0	25.0	50.0	25.0	50.0
3{19}	25.0	50.0	25.0	50.0	50.0	100.0
3{20}	12.5	50.0	25.0	50.0	25.0	50.0

Таблица 3. Протимикробное действие амидов 3{1-20} по отношению к стандартным тест-штаммам *Pr.vulgaris*, *B.anthracooides*, *C.albicans*

Соединение	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636		<i>Bacillus anthracoides</i> ATCC 1312		<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	
	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МФ _{ст} К	МФ _ц К
Pipemidic acid	12.5	25.0	12.5	50.0	12.5	25.0
Nalidixic acid			6.25			
Fluconazolium					50.0	
3{1}	12.5	50.0	25.0	50.0	25.0	50.0
3{2}	50.0	100.0	25.0	50.0	50.0	100.0
3{3}	25.0	50.0	50.0	100.0	50.0	100.0
3{4}	25.0	50.0	50.0	100.0	25.0	100.0
3{5}	25.0	50.0	100.0	200.0	25.0	100.0
3{6}	50.0	100.0	25.0	50.0	25.0	50.0
3{7}	25.0	50.0	12.5	25.0	25.0	50.0
3{8}	25.0	50.0	25.0	100.0	25.0	50.0
3{9}	25.0	100.0	25.0	50.0	25.0	100.0
3{10}	25.0	50.0	12.5	50.0	25.0	50.0
3{11}	25.0	50.0	12.5	25.0	12.5	25.0
3{12}	25.0	50.0	12.5	50.0	25.0	50.0
3{13}	25.0	50.0	50.0	100.0	25.0	100.0
3{14}	25.0	50.0	25.0	50.0	50.0	100.0
3{15}	25.0	50.0	25.0	50.0	25.0	100.0
3{16}	25.0	50.0	25.0	50.0	12.5	25.0
3{17}	25.0	50.0	50.0	100.0	12.5	50.0
3{18}	25.0	100.0	12.5	50.0	25.0	50.0
3{19}	25.0	50.0	25.0	100.0	25.0	100.0
3{20}	25.0	50.0	25.0	50.0	25.0	50.0

Наибольший интерес представляет соединение 3{11} – 4-[(7-фторфенил)-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиазин-3-ил]-*N*-изобутилбутанамид – который показал наилучшие результаты противомикробной и противогрибковой

активности среди синтезированных амидов, и может быть рекомендован для дополнительных фармакологических исследований.

Выводы. 1. Разработаны препаративные методики получения N^7 -арил- ω -(8-оксо-7,8-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пирозин-3-ил)алкилкарбоновых кислот и амидов на их основе; 2. Синтезированы и идентифицированы 20 амидов, методами элементного анализа и ^1H ЯМР-спектроскопии доказана их структура; 2. По результатам микробиологического скрининга для дальнейшей разработки отобран 4-[(7-фторфенил)-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пирозин-3-ил]-*N*-изобутил-бутанамид.

Литература.

1. Taher, A. Synthesis of certain 1,2,4-triazolo[4,3-*a*]quinoxalinone derivatives for evaluation of in vitro antitumor and antimicrobial activities / A. Taher, N. A. Khalil, E. M. Ahmed // Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University). – 2009. – №1 (47). – P. 19–26.
2. Bhattacharya, B. K. Synthesis of some new 5-chloro-7-mercapto-1-methyl/phenyl-1,2,4-triazolo[4,5-*b*]pyrazin-2(1*H*)-ones and 5-chloro-3-thiopyrazin-2(1*H*)-one derivatives as possible antibacterial and antifungal agents / B. K. Bhattacharya // Journal of Heterocyclic Chemistry. – 1986. – № 23 (1). – P. 113–118.
3. Armstrong, A. N,N' -Carbonyldiimidazole. e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. – 2001.