Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

|  |
| --- |
| МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ |

***Петрушова Лідія Олександрівна***

*УДК* 54.057:542.951.1:547.831.9:615.28:616.441:616-002.5

**СИНТЕЗ, ХІМІЧНІ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТІАЗОЛІЛ-2-АМІДІВ 1-R-2-ОКСО-4-ГІДРОКСИ-ХІНОЛІН-3-КАРБОНОВИХ КИСЛОТ**

15.00.02 — фармацевтична хімія і фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2006

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, Міністерство охорони здоров’я України.

**Науковий керівник:** доктор хімічних наук, професор

**Українець Ігор Васильович**

*Національний фармацевтичний університет, професор кафедри фармацевтичної хімії*

**Офіційні опоненти:** доктор хімічних наук, професор

**БОЛОТОВ Валерій Васильович**

Національний фармацевтичний університет, завідувач кафедрою аналітичної хімії

доктор фармацевтичних наук, професор

**КОВАЛЕНКО Сергій Іванович**

*Запорізький медичний університет,*

*професор кафедри фармацевтичної хімії*

**Провідна установа:** Київська медична академія після-дипломної освіти ім. П.Л.Шупика, кафедра фармацевтичної хімії та фармакогнозії

Захист відбудеться “24” березня 2006 року о 12.00 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий “23” лютого 2006 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

професор МАЛОШТАН Л.М.

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Проблема пошуку нових протитуберкульозних препаратів на сьогодні стала настільки актуальною і очевидною, що не потребує якогось особливого обґрунтування. Цікавими об’єктами дослідження в цьому плані є похідні тіазолу. Ера медичного застосування цієї гетероциклічної системи розпочалася в 1935 році, коли була відкрита наявність тіазольного ядра в молекулі вітаміну В1. Незабаром в хіміотерапії бактеріальних інфекцій під назвою сульфатіазол з’явився перший синтетичний сульфаніламідний препарат, створений на основі тіазоліл-2-аміну. Біологічне значення тіазолу значно виросло після встановлення його присутності в структурі антибіотику пеніциліну, переоцінити роль якого в світовій медицині досить важко. В основі актитіазової кислоти – високоспецифічного протитуберкульозного антибіотику, ніридазолу та нітазолу – протимікробних препаратів, також лежить тіазольне кільце.

Широкі дослідження в ряду тіазоліл-2-амідів дикарбонових кислот вже тривалий час проводяться в Національному фармацевтичному університеті. В результаті було виявлено багато нових біологічно активних речовин з широким спектром дії. Особливу увагу привертає здатність деяких з них, наприклад алкіл-амідів тіазоліл-2-оксамінової кислоти активно пригнічувати розмноження мікобак-терій туберкульозу. З іншого боку, такий же ефект виявляють численні амідовані похідні 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот. Враховуючи це, уявляється доцільним залучити в коло досліджень з пошуку потенційних протитуберку-льозних засобів і тіазоліл-2-аміди. Поєднання в одній молекулі таких активних по відношенню до багатьох мікроорганізмів молекулярних систем як хінолін та тіазол дозволяє припустити, що й одержані тіазоліл-2-аміди 2-оксо-4-гідрокси-хінолін-3-карбонових кислот будуть активно впливати на мікобактерії туберкульозу.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету з проблеми МОЗ України “Хімічний синтез, виділення та аналіз но-вих фармакологічно активних речовин, встановлення зв'язку “структура-дія”, ство-рення нових лікарських препаратів” (номер державної реєстрації 0198 U 007011).

**Мета і задачі дослідження.** Виходячи з наведеного вище, метою даної роботи є пошук в ряду тіазоліл-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот нових біологічно активних речовин антимікобактеріальної дії.

Для досягнення зазначеної мети необхідно було вирішити такі задачі:

– розробити препаративний метод одержання та здійснити синтез серії тіазоліл-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот з використан-ням доступних 2-амінотіазолів;

– вивчити фізико-хімічні властивості одержаних сполук;

– піддати всі одержані тіазоліл-2-аміди мікробіологічному скринінгу на визначення протитуберкульозних властивостей;

– при виявленні речовин, перспективних для подальших поглиблених фарма-кологічних випробовувань, запропонувати методики визначення їх доброякісності.

*Об’єкт дослідження* – синтетичні амідовані похідні 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот.

*Предмет дослідження* – 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонові кислоти та їх складні ефіри; продукти їх реакцій з 2-амінотіазолами з потенційною протитуберкульозною активністю.

*Методи дослідження* – синтез на основі 2-амінотіазолів та похідних 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот відповідних гетериламідів та їх галоген-заміщених у бензольній частині молекули аналогів з використанням різноманітних хімічних реакцій: амідування, ацилювання, бромування, гідроліз, рециклізація та ін.; аналіз структурних особливостей одержаних речовин за допомогою сучасних фізико-хімічних методів дослідження: спектроскопії ЯМР, хроматомас-спектрометрії і рентгеноструктурного аналізу; вивчення протитуберкульозних властивостей з використанням стандартних методик.

**Наукова новизна одержаних результатів** Амідуванням 1-R-2-оксо-3-етоксикарбоніл-4-гідроксихінолінів 2-амінотіазолами в умовах термолізу здійснено синтез великої серії тіазоліл-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот. Показано, що у випадку термолабільних 5-нітротіазоліл-2-амінів цільові сполуки слід одержувати в більш м’яких умовах – через 1-R-2-оксо-4-гідрокси-хінолін-3-карбонові кислоти.

Вперше експериментально встановлено, що етилові ефіри 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот в середовищі безводної оцтової кислоти молекулярним бромом галогенуються в положення 6 хінолонового циклу, а напрямок даної реакції визначається присутністю чи відсутністю в реакційній суміші води. На підставі детального вивчення спектрів ЯМР 1Н виявлено, що в зазначених умовах поведінка N-алкіл- та N-фенілзаміщених ефірів абсолютно однакова, причому для останнього випадку розрахунки свідчать про взаємно перпендикулярну орієнтацію хінолінового та фенольного ядер. Проведене рентгеноструктурне дослідження етилового ефіру 6-бром-1-феніл-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти повністю підтвердило зроблене припущення. Досліджена мас-спектрометрична поведінка ізомерних етилових ефірів 3-бром-2,4-діоксо- та 6-бром-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот.

Зроблено порівняльний аналіз декількох варіантів синтезу етилових ефірів галогензаміщених 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот, на основі яких одержані 4-метилтіазоліл-2-аміди. Показано, що такі сполуки найбільш раціонально синтезувати рециклізацією відповідних 2-етоксикарбонілметил-3,1-бензоксазин-4-онів.

В результаті проведених досліджень одержано біля 100 неописаних в літературі сполук. Комплексне використання спектроскопії ЯМР, хроматомас-спектрометрії та рентгеноструктурного аналізу дозволило вперше встановити особливості просторової будови нових похідних 2-оксо-4-гідроксихінолінів.

Вивчена протитуберкульозна активність синтезованих сполук, на підставі чого в їх структурі виявлені фрагменти, які найбільш активно впливають на антимікобактеріальні властивості.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблені препаративні методики одержання та здійснено синтез нової групи біологічно активних речовин – тіазоліл-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот та їх галогензаміщених в бензольній частині хінолінового ядра аналогів. Запропоновано простий спосіб синтезу 6-бром-2-оксо-4-гідроксихінолінів.

Виявлені закономірності зв’язку “хімічна структура – протитуберкульозна дія”, які представляють інтерес для подальшого цілеспрямованого синтезу антимікобактеріальних речовин.

Для поглибленого вивчення як перспективний протитуберкульозний препарат рекомендовано тіазоліл-2-амід 1-октил-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбоновї кислоти. Запропоновані методики визначення тотожності і кількісного вмісту основної речовини в субстанції цієї сполуки, які можуть бути використані при створенні аналітичної нормативної документації.

**Особистий внесок здобувача:**

* експериментальна синтетична частина роботи, викладена у дисертації, виконана особисто автором;
* результати синтетичних, фізико-хімічних та біологічних досліджень оброблені, систематизовані та проаналізовані дисертантом.

**Апробація результатів дисертації.** Основний зміст дисертаційної роботи доповідався на міжнародній конференції Хімія азотовмісних гетероциклів (Харків, 2003); на II Всеукраїнській конференції молодих вчених з актуальних питань хімії (Дніпропетровськ, 2004); на XX Українській конференції з органічної хімії (Одеса, 2004); на III Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії (Харків, 2005).

**Публікації.** Матеріали дисертації опубліковані в 3 статтях у фахових виданнях і 4 тезах доповідей.

**Структура дисертації.** Дисертаційна робота складається з вступу, чотирьох розділів, висновків та списку літературних джерел. Загальний об’єм дисертації складає 121сторінку. Робота ілюстрована 9 схемами, 7 рисунками і 28 таблицями. Перелік використаних літературних джерел містить 165 найменування.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

1. **Синтез та фізико-хімічні властивості тіазолів-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідрокси-хінолін-3-карбонових кислот (розділ 2)**

Раніше було показано, що аніліди та гетериламіди 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот найбільш раціонально одержувати шляхом термолізу еквімолярних кількостей відповідних амінів та ефірів **1**. Саме цей метод і був використаний нами в синтезі цільових тіазолів-2-амідів (**2)**, їх 4- (**3**) та 5- (**4**) метил, 4-етоксикарбонілметил- (**5**) та 4-арил- (**6-9**) заміщених аналогів (Схема 1). Слід все ж таки відмітити, що з урахуванням високої схильності до піролітичного розкладу тіазоліл-2-амінів з одного боку, а також здатності висхідних етилових ефірів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот (**1**) при підвищених температурах конденсуватися в 5,9-ди-R-6,7,8-триоксодихіноліно-[3,4-b;3,4-e]-4Н-пірани – з другого, означені синтези доцільно проводити в присутності невеликої кількості висококиплячого розчинника, наприклад ДМФА. Така незначна модифікація в більшості випадків дозволяє уникнути вищеназваних недоліків і тим самим значно підвищити чистоту кінцевих продуктів.

Схема 1



***1-9:*** *R = H, С1-С10 Alk, All, i-Alk*

Разом з тим, в синтезі 5-нітротіазоліл-2-амідів (**10**) дана методика виявилась мало прийнятною, хоча в принципі і дозволяє одержати цільові сполуки традиційно, тобто амідуванням 1-R-2-оксо-3-етоксикарбоніл-4-гідроксихінолінів (**1**) в умовах термолізу (Метод **А**). Висока термолабільність 5-нітротіазоліл-2-аміну призводить до того, що одержані таким чином аміди мають буре забарвлення, позбавитися якого не вдається навіть після багаторазової кристалізації. Беручи до уваги дану обставину, виправдовує себе тристадійна синтетична схема, яка передбачає проведення ацилювання в більш м’яких умовах (Схема 2).

1-R-2-Оксо-3-етоксикарбоніл-4-гідроксихіноліни (**1**), як відомо, надзвичайно стійкі до лужного гідролізу, тому першу стадію синтезу – їх перетворення у відповідні кислоти **11** –

Схема 2



***10-12:*** *R = H, С1-С6 Alk, i-Alk*

здійснювали в розчині хлористоводневої кислоти в оцтовому ангідриді (тобто фактично врозчині HCl в оцтовій кислоті з низьким вмістом води). Наступна активація кислотної компоненти сполук **11** N,N'-карбонілдіімідазолом (CDI) дозволяє через проміжні ацилімідазоли **12** вийти на цільові 5-нітротіазоліл-2-аміди 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот (**10**) з препаративно високими виходами та значно вищим ступенем чистоти (метод **Б**). Досить зазначити, що одержані таким чином 5-нітротіазоліл-2-аміди **10** мають вже не темно буре забарвлення, як після методу **А**, а світло-жовте.



*Рис. 1. Спектр ЯМР 1Н (сигнали ароматичних протонів) аміду* ***5****, R = Bu*



*Рис. 2. Спектр ЯМР 1Н (сигнали аліфатичних протонів) аміду* ***5****, R = Bu*

Всі одержані аміди **2-10** являють собою безбарвні або світло-жовті кристалічні речовини, помірно розчинні в ДМФА та ДМСО (особливо перші представники гомологічних рядів), малорозчинні в спирті, практично нерозчинні у воді. Для підтвердження їх будови використані елементний аналіз та спектроскопія ЯМР 1Н.

В переважній більшості випадків інтерпретація спектрів ЯМР 1Н синтезованих речовин ускладнень не викликає, оскільки перекривання сигналів в них, як правило, не спостерігаються і всі наявні в структурі протонвмісні функціональні групи легко визначаються за інтенсивністю та мультиплетністю відповідних сигналів. Так, наприклад, протони хінолінового кільця 4-етоксикарбонілметил-тіазоліл-2-амідів (**5**) дають типовий для ABCD-систем спектр і проявляються в „ароматичній” ділянці у вигляді: Н-5 – дублет при 8,20; Н-7 – триплет при 7,75; Н-8 – дублет при 7,50 і Н-6 – триплет при 7,30 м.д., тоді як синглетний сингал єдиного ароматичного протона тіазолу (Н-5) зміщений у більш сильне поле – 6,95 м.д. (Рис. 1). Досить просто – за відповідною інтенсивністю та мультиплетністю – робляться віднесення і при аналізі „аліфатичної” частини спектра, в якій знаходяться сигнали протонів залишку етилацетату тіазольного фрагмента та N-алкільних замісників хіноліну. При цьому ізольована метиленова група оцтової кислоти дає синглетний сигнал інтенсивністю 2Н при 3,66 м.д., а складноефірна етоксигрупа – характеристичні квартет (2Н, ОСН2) та триплет (3Н, Ме) відповідно при 4,15 і 1,30 м.д. За умови, що спектри зареєстровані на приладах з робочою частотою 300 МГц і вище, в більшості випадків вдається інтерпретувати також і окремі сигнали протонів всіх метиленових та метильних груп N-алкільних вуглеводневих ланцюжків (Рис. 2).

Певні труднощі виникають лише при інтерпретації сигналів протонів алкільних замісників [5-тетрадецил-4-феніл-тіазоліл-2]-амідів з великими 1-N-алкільними ланцюжками (**7**). В цих випадках за хімічними зсувами достовірно зробити віднесення вдається тільки для сигналів протонів перших метиленових ланок: 1-N-CH2- та Th-5-CH2-. Всі інші метиленові та кінцеві метильні групи можна ідентифікувати лише за загальною інтегральною інтенсивністю.

1. **Синтез та будова тіазолів-2-амідів галогензаміщених 1-R-2-оксо-4-гідрокси-хінолін-3-карбонових кислот (розділ 3)**

3-Заміщені 2-оксо-4-гідроксихіноліни здатні галогенуватися молекулярним бромом в середовищі льодяної оцтової кислоти з утворенням відповідних 3-бром-2,4-діоксохінолінів. Дуже легко в таку реакцію вступають також і 1-R-2-оксо-3-етоксикарбоніл-4-гідрокси-хіноліни. Разом з тим, подальше вивчення показало, що основним фактором, який визначає напрямок досліджуваної реакції, є наявність чи відсутність в реакційній суміші води.

Для 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот та їх складних ефірів, як відомо, характерна наявність міцних внутрішньомолекулярних водневих зв’язків, утворених 4-ОН і COOR-групами. Присутня в льодяній оцтовій кислоті вода, очевидно, руйнує такі водневі зв’язки і тим самим сприяє протіканню бромування саме в α-положення до складноефірної чи карбоксильної групи. Ретельне зневоднення розчинника та реагентів дозволяє зберегти у розчині відмічений внутрішньомолекулярний водневий зв’язок, доступ до С-3 при цьому залишається стерично ускладненим, в результаті етилові ефіри 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот (**1**) бромуються вже не в піридинову, а виключно в бензольну частину молекули (Схема 3). Зіставлення спектрів ЯМР 1Н синтезованих сполук та їх аналога, одержаного з 5-бромантранілової кислоти – речовини з відомим положенням атома брому – показує, що електрофільній атаці піддається атом вуглецю в положенні 6 хінолонового ядра. Лише в деяких окремих випадках було помічене утворення 3-бромзаміщених ізомерів. Однак їх слідові кількості свідчать, ймовірно, тільки про те, що в реакційній суміші були присутні залишки води.

Схема 3



***13****: R = H, Et, Pr, CH2Ph, Ph*

Цікавим прикладом є бромування 1-N-фенілзаміщеного ефіру **1** (R = Ph), оскільки в його структурі з’являється ще один можливий реакційний центр – N-фенільне ядро. Однак, як виявилось, він також бромується в хінолоновий фрагмент. В спектрі ЯМР 1Н одержаного при цьому етилового ефіру 6-бром-1-феніл-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти (**13**, R = Ph) сигнал одного з ароматичних протонів знаходиться в аномально сильному полі – 6,43 м.д. (Рис. 3). В досліджуваній структурі такий сильний діамагнітний зсув можливий тільки для протона Н-8, який зазнає впливу з боку фенільного замісника при атомі азоту. Залежно від просторової орієнтації цього замісника відносно хінолонового ядра, сигнал Н-8 може зсуватися в сильне чи слабке поле, причому за величиною експериментального хімічного зсуву можна зробити висновок про конформацію N-фенільного замісника. Порівняння зі спектром ЯМР 1Н модельного етилового ефіру 6-бром-1-етил-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти (**13**, R = Et), сигнал протона Н-8 якого знаходиться при 7,52 м.д. (Рис. 3), показує, що діамагнітний зсув сигналу Н-8 N-фенілзаміщеного ефіру **13**, R = Ph складає 1,09 м.д.

При побудові молекулярної моделі цього ефіру виявилось, що найбільший розрахований зсув сигналу Н-8 в сильне поле – 0,96 м.д., що досить близько до практичного – можна очікувати при умові взаємно перпендикулярної орієнтації площин N-фенільного та гетероциклічного фрагментів. У випадку скошеної конформації діамагнітний зсув цього сигналу суттєво зменшується, з чого можна припустити, що хінолоновий та фенільний фрагменти в структурі ефіру **13**, R = Ph взаємно перпендикулярні. Дійсно, проведене нами рентгеноструктурне дослідження підтвердило зроблене припущення і дозволило встановити, що N-фенільний замісник повернутий практично перпендикулярно відносно площини біциклу – торсійний кут С(10)-N(1)-C(11)-C(12) дорівнює 96,8° (Рис. 4).









*Рис. 3. Спектри ЯМР 1Н (сигнали ароматичних протонів) етилових ефірів 1-феніл- (****а****)*

*та 1-етил- (****б****) 6-бром-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот (****13****).*

Мас-спектрометрична поведінка 6-бромзаміщених ефірів **1** вивчена на прикладі 1Н-похідного **13**. Для порівняння наведені також дані по його ізомеру – 3-бром-3-етокси-карбоніл-2,4-діоксохіноліну (Схема 4). Виявилось, що обидві ці речовини під впливом

u22

*Рис. 4. Розміщення атомів в молекулі ефіру* ***13****, R = Ph* *та їх нумерація. Еліпсоїди*

*теплових коливань представлені з ймовірністю 30%*

електронного удару утворюють нестійкі молекулярні іони – відносна інтенсивність їх піків не перевищує 5%. Попередній розпад молекулярних іонів обох сполук однотипний – елімінування молекули етанолу, причому інтенсивність утворених при цьому осколкових іонів свідчить про більш високу стійкість 6-бромпохідного. Подальша фрагментація має суттєві відмінності. 6-Бромзаміщений ацилійкатіон зазнає розщеплення хінолонової структури, після чого слідує послідовна втрата СО та Br. 3-Бромзаміщений ізомер в мас-спектрометрі спочатку дебромується, а потім вже розпадається за типом свого 6-бромізомера.

Схема 4



Примітка. Значення *m/z* наведені тільки для ізотопу 79Br.

З моменту появи на ринку лікарських засобів перших фторхінолонових антибіотиків проводяться широкі дослідження по синтезу та вивченню біологічних властивостей їх численних структурних аналогів. Результатом таких досліджень стало регулярне впровадження у медичну практику нових препаратів даної групи, більш ефективних та безпечних. При цьому неодноразово відмічалось, що атом галогену в бензольній частині молекули хінолонів, особливо в положенні 6, завжди позитивно впливає на рівень протимікробної дії. Виходячи з цього, шляхом введення галогенів в хіноліновий фрагмент молекули нами зроблена спроба модифікувати описані вище 4'-метилзаміщені тіазоліл-2-аміди 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот, які в дослідах *in vitro* показали високу протитуберкульозну активність.

Схема 5



***19:*** *R = 6-F; 6,7-F2; 6-Cl; 7-Cl; 6-Br; 6-I*

Синтез 4-метилтіазоліл-2-амідів галоїдзаміщених 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот (**19**) можливий декількома шляхами (Схема 5), принципіальні відмінності між якими криються в методах одержання висхідних складних ефірів відповідних хінолін-3-карбонових кислот (**13**, **18**), які потім вже легко можуть бути перетворені в цільові гетериламіди. Перш за все, це традиційний спосіб, який передбачає етерифікацію галоїдзаміщених антранілових кислот **20**, ацилювання одержаних при цьому алкілантранілатів **21** етоксималонілхлоридом та циклізацію утворених етилових ефірів 2-карбалкоксималонанілових кислот (**22**) в хінолони **13**, **18** в умовах реакції Дікмана (метод **А**). Даний метод добре відтворюється і дозволяє одержувати 3-етоксикарбоніл-2-оксо-4-гідроксихіноліни (**13**, **18**) із задовільними виходами. Однак трудомістка етерифікація антранілових кислот, на жаль, рідко дає високі виходи. З урахуванням високої вартості галоїдзаміщених антранілових кислот дана обставина суттєво знижує ефективність методу в цілому.

Позбутися цього недоліку дозволяє інша синтетична схема, при реалізації якої антранілові кислоти безпосередньо ацилюються етоксималонілхлоридом. Одержані таким чином етилові ефіри 2-карбоксималонанілових кислот (**23**) під дією оцтового ангідриду конденсуються в 2-етоксикарбонілметил-3,1-бензоксазин-4-они (**24**), які, в свою чергу, при обробці триетиламіном в абсолютному етанолі рециклізуються в ефіри хінолін-3-карбонових кислот **13**, **18** (метод **Б**). Весь ланцюжок відмічених хімічних перетворень можна здійснити без виділення проміжних сполук при збереженні високих виходів кінцевих продуктів, що дозволяє рекомендувати даний спосіб як препаративний.

Можливий також ще один варіант синтезу ефірів **13**, **18** – галогенування попередньо одержаного незаміщеного етилового ефіру 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти (**1,** R = H). Досить суттєва перевага цього способу – можливість гетероциклізації діефіру **25** під впливом гідроксидів лужних металів у водному середовищі, тоді як його заміщені в ароматичному кільці аналоги **22** в таких умовах гідролізуються. Тим не менш, на наступній стадії ця перевага зводиться нанівець, оскільки, як було показано вище, галогенування ефірів **1** можливе тільки в положення6 хінолонового ядра, вивчене поки що тільки на прикладі бромування і тому як альтернатива методам **А** і **Б** нами не розглядалось.

1. **Біологічні властивості синтезованих тіазолів-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідрокси-хінолін-3-карбонових кислот (розділ 4)**

Здатність метилзаміщених 2-амінотіазолів вибірково накопичуватись в щитовидній залозі добре відома. Зважаючи на високу антитиреоїдну активність похідних 2-оксо-4-гідроксихіноліну, уявлялось доцільним вивчити вплив синтезованих нами 4- та 5-метилтіазоліл-2-амідів **3** і **4** на функцію щитовидної залози. Наявність в структурі таких сполук двох “блоків”: лікарського 2-оксо-4-гідроксихінолінового, відповідального за антитиреоїдні властивості, та транспортного метилтіазольного, який повинен забезпечувати надходження ліків з переважним транспортом в орган-мішень, дозволяла сподіватись на покращення фармакологічних характеристик у амідів **3** і **4** порівняно з іншими похідними гідроксихінолінів. На жаль наш розрахунок не виправдався, оскільки згідно з проведеними експериментами аміди **3** і **4** на функцію щитовидної залози зовсім не впливають.

Більш цікаві результати одержані при вивченні протитуберкульозних властивостей синтезованих нами речовин. Мікробіологічні випробовування проведені *in vitro* радіометричним методом в Національному інституті алергії та інфекційних захворювань США. Відбір перспективних речовин здійснюється поетапно. На ***першому рівні досліджень*** – первинний мікробіологічний скринінг – всі сполуки тестуються в початковій концентрації 12,5 мкг/мл (останнім часом вона знижена до 6,25 мкг/мл) на штамах *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.

Речовини, які в концентрації 12,5 чи 6,25 мкг/мл затримують розвиток міко-бактерій туберкульозу не менш, ніж на 90%, переводяться на ***другий рівень*** – для визначення дійсної мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Слід зазначити, що

Таблиця 1

**МІК та цитотоксичність найбільш активних тіазоліл-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот (2-19)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Сполука | МІК,  мкг/мл | IC50,  мкг/мл | SI |
| **2** R = C4H9 | 3,13 | 1,30 | 0,42 |
| **2** R = C5H11 | 0,78 | 1,00 | 1,28 |
| **2** R = *i*-C5H11 | 0,78 | 1,50 | 1,92 |
| **2** R = C6H13 | 0,39 | 0,83 | 2,13 |
| **2** R = C7H15 | 0,20 | 1,70 | 8,50 |
| **2** R = C8H17 | 0,20 | 2,20 | 11,00 |
| **3** R = H | 1,56 | Не розчинний | Не розчинний |
| **3** R = *i*-C4H9 | 1,56 | Не розчинний | Не розчинний |
| **3** R = C5H11 | 1,56 | Не розчинний | Не розчинний |
| **3** R = *i*-C5H11 | 1,56 | Не розчинний | Не розчинний |
| **3** R = C6H13 | 0,39 | 0,24 | 0,62 |
| **4** R = CH3 | 1,56 | Не розчинний | Не розчинний |
| **4** R = C5H11 | 1,56 | Не розчинний | Не розчинний |
| **4** R = *i*-C5H11 | 1,56 | Не розчинний | Не розчинний |
| **4** R = C6H13 | 0,39 | 1,00 | 2,56 |
| **5** R = C4H9 | 3,13 | 3,60 | 1,00 |
| **5** R = *i*-C4H9 | 3,13 | 4,30 | 1,00 |
| **5** R = C5H11 | 1,56 | 1,00 | 1,00 |
| **5** R = *i*-C5H11 | 1,56 | 1,80 | 1,00 |
| **5** R = C6H13 | 0,78 | 0,37 | 0,50 |
| **6** R = C5H11 | 0,78 | Не розчинний | Не розчинний |
| **8** R = C4H9 | 1,56 | Не розчинний | Не розчинний |
| **9** R = C4H9 | 3,13 | Не розчинний | Не розчинний |
| **10** R = C6H13 | 0,78 | Не розчинний | Не розчинний |
| **19** R = 6-F | 0,39 | 0,42 | 1,00 |
| **19** R = 6,7-F2 | 0,39 | 0,28 | 0,72 |
| **19** R = 6-Cl | 0,39 | Не розчинний | Не розчинний |
| **19** R = 7-Cl | 0,78 | 0,78 | 1,00 |
| **19** R = 6-Br | 0,39 | Не розчинний | Не розчинний |
| **19** R = 6-I | 0,78 | 0,78 | 1,00 |

з 94 тіазоліл-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот, підданих первинному скринінгу, тільки 51 сполука переведена на наступний етап. Після визначення дійсної МІК число перспективних об’єктів дослідження скоротилося до 30, оскільки перспективними, як правило, вважаються зразки з МІК < 1 мкг/мл (Таблиця 1). Щоправда часом, коли мова йде про маловивчені класи хімічних сполук, в цю групу потрапляють речовини, МІК яких дещо перевищує 1 мкг/мл.

Одночасно з визначенням МІК на другому рівні відібрані сполуки піддаються випробовуванням на цитотоксичність (ІС50). Результати представ-ляються у вигляді індексу селективності (SI), що визначається як відношення цитотоксичності до МІК. Задовільними звичайно вважаться речовини, індекс селективності яких складає не менше 10. З наведених в Таблиці 1 даних слідує, що коло досліджуваних об’єктів взагалі скоротилося до однієї сполуки – тіазоліл-2-аміду 1-октил-2-оксо-4-гідрокси-хінолін-3-карбонової кислоти (**2** R = C8H17), яка змогла успішно пройти даний тест. Цитотоксичність інших речовин виявилась надто високою, хоча в багатьох випадках її просто не вдалось визначити з причини недостатньої розчинності досліджуваних зразків у водному ДМСО.

Таблиця 2

**Протитуберкульозна активність тіазоліл-2-аміду 1-октил-2-оксо-4-гідрокси-хінолін-3-карбонової кислоти на моделі уражених туберкульозом макрофагів**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Сполука | МІК, мкг/мл | ЕС90, мкг/мл | ЕС99, мкг/мл | ЕС90 / МІК |
| **2** R = C8H17 | 0,20 | 1,00 | > 1,00 | 5,00 |

На ***третьому рівні*** сполуки випробовуються на здатність затримувати ріст мікобактерій туберкульозу, розміщених внутрішньоклітинно (тобто в макрофагах). Результати наводяться у вигляді ЕС90 та ЕС99 – концентрації досліджуваної речовини, які викликають затримку росту мікобактерій в макрофагах відповідно на

90 і 99% (Таблиця 2). Сполуки, ЕС90 яких складає понад 16 х МІК (ці дані для зручності подаються у вигляді співвідношення ЕС90/МІК) вважаються на даній моделі неактивними. Експериментальні дані підтверджують здатність тіазоліл-2-аміду 1-октил-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти досить активно стримувати розмноження внутрішньоклітинних мікобактерій, що вигідно відрізняє його від багатьох відомих протитуберкульозних препаратів.

Характерною особливістю мікобактерій туберкульозу є їх надзвичайна мінливість, завдяки якій вони здатні швидко звикати до антибактеріальних препаратів. В результаті останнім часом все частіше з’являються хворі, яким класичне лікування вже не допомагає. З цієї причини, третій рівень мікробіологічного скринінгу передбачає обов’язкове підтвердження протитуберкульозних властивостей відібраних сполук, але вже на двох штамах: повторно на *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv АТСС 27294 і додатково на *Mycobacterium tuberculosis* *Erdman* ATCC 35801. Паралельно визначається МІК на штамах, стійких до одного з відомих лікарських препаратів. Звичайно це штами, резистентні до ізоніазиду, рифампіцину, етамбутолу, канаміцину та ципрофлоксацину (в таблиці 3 вони позначені символом R). Одержані результати свідчать про високу антимікобактеріальну активність тіазоліл-2-аміду 1-октил-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти.

Таблиця 3

**Мік тіазоліл-2-аміду 1-октил-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти відносно різних штамів *mycobacterium tuberculosis***

|  |  |
| --- | --- |
| Штам *M.tuberculosis* | МІК, мкг/мл |
| H37Rv | 0,2 |
| Erdman | 0,2 |
| Ізоніазид-R | 0,2 |
| Рифампіцин-R | 0,2 |
| Етамбутол-R | 0,1 |
| Канаміцин-R | 0,1 |
| Ципрофлоксацин-R | 1,56 |

Завершальною сходинкою третього рівня досліджень *in vitro* є визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБК) речовин, які перебороли попередні етапи. Випробовування проводяться на штамах *Mycobacterium tuberculosis* і, крім того, на штамах, резистентних до деяких лікарських препаратів. Встановлено, що МБК тіазоліл-2-аміду 1-октил-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти відносно *Mycobacterium tuberculosis* перевищує МІК лише вдвічі, а відносно штамів резистентних до ізоніазиду та рифампіцину взагалі дорівнює МІК. Такі дані дозволяють зробити висновок про те, що його дію на мікобактерії туберкульозу можна кваліфікувати як бактерицидну.

Таким чином, за результатами проведених *in vitro* комплексних мікробіологічних досліджень одна сполука – тіазоліл-2-амід 1-октил-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти рекомендована як кандидат на подальші випробовування *in vivo*. У зв’язку з цим, нами розроблені методики визначення тотожності (спектральні та хімічні методи) та кількісного вмісту (алкаліметричне титрування в неводному середовищі) основної речовини в субстанції даної сполуки, які можна буде використати в підготовці аналітичної нормативної документації.

**ВИСНОВКИ**

1. Вперше з метою виявлення нових біологічно активних речовин протитуберкульозної дії здійснено синтез серії тіазолів-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот.
2. Показано, що найбільш раціональним методом одержання зазначених сполук є термоліз складноефірної та амінної компонент, тоді як у випадку термічно нестійких похідних слід застосовувати взаємодією 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот з аміном в середовищі безводного ДМФА в присутності N,N'-карбонілдіімідазолу.
3. Експериментально встановлено, що вода є основним фактором, який визначає напрямок бромування етилових ефірів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбо-нових кислот молекулярним бромом. В середовищі безводної оцтової кислоти реакція проходить в положення 6 хінолонового циклу, тоді як присутня в реакційній суміші вода призводить до утворення виключно 3-бромзаміщених ізомерів.
4. Проведено порівняльний аналіз декількох варіантів синтезу складних ефірів галогензаміщених 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот, на підставі чого один з них рекомендований як препаративний.
5. Хімічна будова синтезованих речовин підтверджена елементним аналізом, даними спектроскопії ЯМР 1Н, хроматомас-спектрометрії, а в окремих випадках – зустрічним синтезом і рентгеноструктурним аналізом. В результаті виявлені особливості просторової будови нових 4-гідроксихінолін-2-онів, зокрема їх N-фенілзаміщених похідних.
6. Всі синтезовані тіазоліл-2-аміди 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот піддані мікробіологічному скринінгу на виявлення протитуберкульозної активності, що дало змогу виявити певні закономірності взаємозв’язку між їх структурою та антимікобактеріальною дією.
7. Для подальших біологічних досліджень рекомендовано тіазоліл-2-амід 1-октил-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти як потенційний протитуберкульозний препарат. Запропоновані методики визначення тотожності та кількісного вмісту основної речовини в субстанції цієї сполуки, які можуть бути використані при підготовці аналітичної нормативної документації.

**Список опублікованих праць за темою дисертації:**

1. 4'-Карбетоксиметилтіазоліл-2-аміди 1R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості. / І.В.Українець, Л.О.Петрушова, О.В.Горохова, Л.В.Сидоренко, С.Г.Леонова // Вісник фармації. – 2003. – № 3 (35). – С. 24-28. (Особисто здобувачем зроблено: здійснено синтез, встановлено зв’язок між біологічною активністю та будовою синтезованих речовин).
2. Бромирование этиловых эфиров 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот / И.В.Украинец, Л.А.Петрушова, Л.В.Сидоренко, В.Б.Рыбаков, В.В.Чернышев // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2004. – Т. 2, вип. 3(7). – С. 26-31. (Особисто здобувачем зроблено: здійснено синтез, участь у написанні статті).
3. 4-Гидроксихинолоны-2. 90. Синтез и противотуберкулезная активность 4-метил-тиазолил-2-амидов галоидзамещенных 4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидро-хинолин-3-карбоновых кислот / И.В.Украинец, Л.В.Сидоренко, Л.А.Петрушова, О.В.Горохова // Химия гетероцикл. соединений. – 2006. – № 1. – С. 71-76. (Особисто здобувачем зроблено: здійснено синтез, участь у написанні статті).
4. The prospect for designing new anti-tuberculosis drugs based on 4-methylthiazolyl-2-amides of halogen substituted 1H-2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids / L.A.Petrushova, L.V.Sidorenko, S.G.Leonova // International conference chemistry of nitrogen containing heterocycles: Abstracts, September 30 – October 3, 2003. – Kharkiv, 2003.- P. 253.
5. Петрушова Л.А., Украинец И.В., Сидоренко Л.В. Бромирование 1-R-2-оксо-3-карбэтокси-4-гидроксихинолинов // XX Украинская конференция по органической химии: Тез. докл., 20-24 сентября 2004. – Одесcа, 2004. – С.300.
6. Петрушова Л.О. Синтез та біологічні властивості 4'-карбетоксиметилтіазоліл-2-амідів 1R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот // II Всеукраїнська конференція молодих вчених з актуальних питань хімії: Тез. доп., 7-12 червня 2004 р. – Дніпропетровськ, 2004. – С. 52.
7. Петрушова Л.А. Бромирование этиловых эфиров 1-R-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновых кислот // III Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії: Тез. доп., 17-20 травня 2005 р. – Харків, 2005. – С. 64.

**Петрушова Л.О.** ”Синтез, хімічні та біологічні властивості тіазолів-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот”. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія і фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет, Харків, 2006.

З метою подальших біологічних досліджень здійснено синтез великої групи тіазолів-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот, та їх галоген-заміщених в бензольній частині хінолінового ядра аналогів. Експериментально встановлено, що напрямок бромування молекулярним бромом етилових ефірів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот в середовищі оцтової кислоти визначає вода. Її присутність приводить до 3-бромпохідних, тоді як після зневоднення розчинника та реагентів утворюються 6-бромзаміщені ізомери.

Для підтвердження структури одержаних сполук використані елементний аналіз, спектроскопія ЯМР 1Н, хроматомас-спектрометрія, зустрічний синтез та рентгеноструктурний аналіз.

Проведено мікробіологічний скринінг синтезованих речовин. Для поглиблених досліджень рекомендовано тіазоліл-2-амід 1-октил-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти як потенційний лікарський препарат, придатний для лікування туберкульозу.

**Ключові слова:** тіазоліл-2-аміди, синтез, 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонові кислоти, гетероциклізація, протитуберкульозна активність.

**Петрушова Л.А.** ”Синтез, химические и биологические свойства тиазолил-2-амидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот”. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2006.

Диссертация посвящена синтезу, изучению физико-химических и биологических свойств гетериламидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот. С целью установления закономерностей связи “химическое строение – противотуберкулезное действие” амидированием 1-R-2-оксо-3-этоксикарбонил-4-гидроксихинолинов 2-аминотиазолами получена большая группа тиазолил-2-амидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот. Показано, что синтез рационально проводить термолизом эквимолярных количеств аминной и сложноэфирной компонент, тогда как в случае термолабильных полупродуктов (например, 5-нитротиазолил-2-аминов) целевые амиды следует получать в более мягких условиях – через 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновые кислоты.

Экспериментально установлено, что этиловые эфиры 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот в среде безводной уксусной кислоты молекулярным бромом галогенируются в положение 6 хинолонового цикла, тогда как в присутствии воды образуются исключительно 3-бромизомеры. На основании изучения спектров ЯМР 1Н выявлено, что в указанных условиях поведение N-алкил- и N-фенилзамещенных эфиров абсолютно одинаково, причем для последнего случая расчеты свидетельствуют о взаимно перпендикулярной ориентации хинолинового и фенольного ядер. Проведенное рентгеноструктурное исследование этилового эфира 6-бром-1-фенил-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновой кислоты полностью подтвердило сделанное предположение.

Изучено масс-спектрометрическое поведение 6-бромзамещенных этиловых эфиров 2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот в сравнении с изомерными им – 3-бром-3-карбэтокси-2,4-диоксохинолинами. Установлено, что эти вещества под воздействием электронного удара образуют неустойчивые катион-радикалы (молекулярные ионы). Первоначальный распад молекулярных ионов этих соединений однотипен – элиминирование молекулы этанола, причем интенсивность образующихся при этом осколочных ионов свидетельствует о более высокой устойчивости 6-бромпроизводных. В дальнейшем фрагментация имеет существенные различия. 6-Бромзамещенные ацилийкатионы претерпевают ретродиеновое расщепление хинолоновой структуры, после чего следует последовательная потеря СО и Br. 3-Бромзамещенные изомеры в масс-спектрометре вначале дебромируются, а затем уже распадаются по типу своих 6-бромизомеров.

Проведен сравнительный анализ нескольких вариантов синтеза этиловых эфиров галогензамещенных 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот. Предложено указанные соединения синтезировать рециклизацией соответствующих 2-этоксикарбонилметил-3,1-бензоксазин-4-онов.

Все синтезированные тиазолил-2-амиды 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот подвергнуты микробиологическому скринингу на выявление противотуберкулезной активности. По результатам испытаний *in vitro* для углубленного фармакологического исследования отобрано одно соединение – тиазолил-2-амид 1-октил-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновой кислоты. При низкой цитотоксичности это вещество активно подавляет рост микобактерий туберкулеза (включая внутриклеточные и резистентные к известным препаратам), проявляя при этом бактерицидный эффект.

Разработаны методики определения подлинности и количественного содержания основного вещества в субстанции этого соединения, которые могут быть использованы при подготовке аналитической нормативной документации.

**Ключевые слова:** тиазолил-2-амиды, синтез, 2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновые кислоты, гетероциклизация, противотуберкулезная активность.

**Petrushova L.A. “**Synthesis, chemical and biological properties of 1-R-2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids thiazol-2-yl amides”. – A manuscript.

The thesis for Candidate’s Degree in Pharmacy in Speciality 15.00.02 – Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Kharkov, 2006.

The synthesis of a big class of 1-R-2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids thiazol-2-yl amides and their halogen-substituted analogues in the benzene ring of the quinoline nucleus has been carried out with the aim of the further biological research. It has been experimentally found that water determines the bromination direction of ethyl 1-R-2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylates by a molecular bromine. Its presence leads to 3-bromoderivatives while after dehydration of the solvent and reagents 6-bromosubstitued isomers have been formed.

To confirm the structure of the compounds obtained the ultimate analysis, NMR spectroscopy, chromatographic mass spectrometry, counter synthesis and X-ray diffraction analysis have been used.

The microbiological screening the substances synthesized has been conducted. 1-Octyl-2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acid thiazol-2-yl amide has been recommended for profound research as promising drugs suitable for treating tuberculosis.

**Key words:** thiazolyl-2-amides, synthesis, 4-hydroxy-2-oxoquinoline-3-carboxylic acids, hetero-cyclization, anti-tuberculosis activity.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>