

А. В. Великородов<sup>1</sup>, Н. Г. Урляпова<sup>2</sup>, А. Д. Даудова<sup>2</sup>**СИНТЕЗ И АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ  
КАРБАМАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2-ОКСАЗИНА**<sup>1</sup> Астраханский государственный университет;<sup>2</sup> НИИ по изучению лепры МЗ России, Астрахань

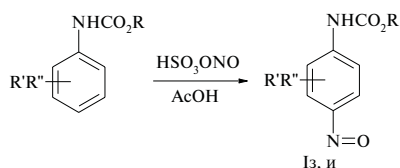
Реакцией [2+4]-циклоприсоединения 1,3-диенов к С-нитрозо-алкил-N-арилкарбаматам получены карбаматные производные 1,2-оксазина и исследована *in vitro* их антимикобактериальная активность в отношении *Micobacterium tuberculosis* и *Micobacterium lufu* в сравнении с изониазидом и дапсоном. Установлено, что активность соединений существенно зависит от природы и положения заместителей в оксазиновом ядре и мало зависит от природы заместителей карбаматной группировки. Наиболее активным среди них является 4,5-диметил-2-(*n*-метоксикарбониламино)фенил-3,6-дигидро-1,2-оксазин.

В связи с ростом заболеваемости туберкулезом вопросы синтеза новых противотуберкулезных препаратов не теряют своей актуальности. В России увеличивается число больных, выделяющих штаммы микобактерии туберкулеза, устойчивые к воздействию известных противотуберкулезных препаратов, в то время как основной проблемой за рубежом являются микобактериозы, вызываемые атипичными штаммами микобактерий. Указанные проблемы могут быть решены разработкой и внедрением в медицинскую практику новых противотуберкулезных препаратов, отличающихся от известных препаратов механизмом действия и малой токсичностью.

Ранее мы сообщили [1], что взаимодействие метил-N-(*n*-нитрозофенил)карбамата (Ia) с 2,3-диметилбутадиеном-1,3, этил-2,4-гексадиеноатом и бициклогексенилом в метиленхлориде при 25 °С протекает как реакция [2+4]-циклоприсоединения и приводит к получению соответствующих производных 1,2-оксазина с карбаматной функцией (II – IV).

Возможная противотуберкулезная активность карбаматных производных 1,2-оксазина была определена по системе PASS [2].

В данной работе с целью расширения ряда соединений для исследования их противотуберкулезной активности по той же схеме на основе других С-нитрозоалкил-N-арилкарбаматов Ib – ж [3] были получены карбаматные производные 1,2-оксазина V – IX. Кроме того, изучена возможность получения новых С-нитрозоалкил-N-арилкарбаматов нитрозированием аллил-, пропаргил-N-фенилкарбаматов, метил-N-[3-[(метоксикарбонил)амино]-4-метилфенил]карбамата и последующего их введения в диеновую конденсацию с 2,3-диметилбутадиемом-1,3.

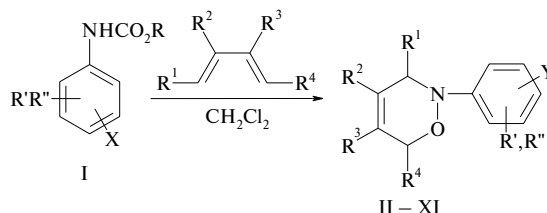


R = CH<sub>2</sub>C≡CH, R' = R'' = H (I3), R = Me, R' = 2-Me, R'' = 5-NHCO<sub>2</sub>Me (Iii)

Установлено, что нитрозирование пропаргил-N-фенилкарбамата и метил-N-[3-[(метоксикарбонил)амино]-4-метилфенил]карбамата нитрозилсерной кислотой в ледяной уксусной кислоте при 0 – 5 °С завершается образованием пропаргил-N-(*n*-нитрозофенил)карбамата (I3) и метил-N-[5-[(метоксикарбонил)амино]-2-метил-4-нитрозофенил]карбамата (Iii).

Попытки получения аллил-N-(*n*-нитрозофенил)карбамата, как и ранее *трет*-бутил-N-фенилкарбамата [3] оказались безуспешными; наблюдалось выделение диоксида углерода и образование гидросульфата фенилламмония, несмотря на эффективное охлаждение реакционной смеси.

Как и ожидалось, [2+4]-циклоприсоединение 2,3-диметилбутадиена по нитрозогруппе гетеродиенофилов Ib – и приводит к получению соответствующих карбаматных производных 1,2-оксазина V – XI.



Ia, R = Me, R' = R'' = H, здесь и далее X = 4-N=O

Iб, R = Me, R' = 3-NHCO<sub>2</sub>Me, R'' = H;

Iв, R = Et, R' = R'' = H;

Iг, R = *i*-Pr, R' = R'' = H;

Iд, R = PhCH<sub>2</sub>, R' = R'' = H;

Iе, R = *цикло*-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, R' = R'' = H;

Iж, R = Me, R' = 2-Me, R'' = H, X = 5-N=O;

Iз, R = CH<sub>2</sub>C≡CH, R' = R'' = H;

Iи, R = Me, R' = 5-NHCO<sub>2</sub>Me, R'' = 2-Me;

II, R' = R'' = R<sup>1</sup> = R<sup>4</sup> = H, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = Me, Y = 4-NHCO<sub>2</sub>Me

III, R<sup>1</sup> = Me, R' = R'' = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = CO<sub>2</sub>Et, Y = 4-NHCO<sub>2</sub>Me

IV, R' = R'' = H, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, Y = 4-NHCO<sub>2</sub>Me

V, Y = 4-NHCO<sub>2</sub>Et, здесь и далее R' = R'' = R<sup>1</sup> = R<sup>4</sup> = H, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = Me

VI, Y = 4-NHCO<sub>2</sub>Pr-*i*

VII, Y = 4-NHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph

VIII, Y = 4-NHCO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>-*цикло*

IX, Y = 3-NHCO<sub>2</sub>Me, R' = 4-Me, R'' = R<sup>1</sup> = R<sup>4</sup> = H, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = Me

X, Y = 4-NHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡CH, R' = R'' = R<sup>1</sup> = R<sup>4</sup> = H, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = Me

XI, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = Me, R' = 2-NHCO<sub>2</sub>Me, R'' = 4-Me, R<sup>1</sup> = R<sup>4</sup> = H,  
Y = 3-NHCO<sub>2</sub>Me

Таблица 1

Карбаматные производные 1,2-оксазина

Соединения	Выход, %	Т.пл., °С	Брутто формула	$\nu$ , см <sup>-1</sup>
V	65	201	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3335 (NH), 1720 (C=O), 1620, 1555 (C=C, C---C <sub>аром.</sub> )
VI	65	171	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3360 (NH), 1710 (C=O), 1610, 1540 (C=C, C---C <sub>аром.</sub> )
VII	62	130	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3310 (NH), 1705 (C=O), 1605, 1535 (C=C, C---C <sub>аром.</sub> )
VIII	54	163	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3360 (NH), 1705 (C=O), 1600, 1550, 1535 (C=C, C---C <sub>аром.</sub> )
IX	60	138	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3310 (NH), 1710 (C=O), 1630, 1605, 1545, 1530 (C=C, C---C <sub>аром.</sub> )
X	48	152	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3345 (NH), 2140 (C≡CH), 1740 (C=O), 1620, 1590 (C=C, C---C <sub>аром.</sub> )
XI	60	169	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	3330 (NH), 1740 (C=O), 1610, 1565, 1555, 1525 (C=C, C---C <sub>аром.</sub> )

Состав и структура соединений Iз, и, V – XI подтверждены элементным анализом и ИК спектрами, а соединения Iи, V — дополнительно ПМР спектрами.

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры записаны на приборе ИКС-29 в суспензии вазелинового масла и в СНCl<sub>3</sub>. ПМР-спектры регистрировали на спектрометре Bruker AC-200 в растворе ДМСО-d<sub>6</sub>, используя в качестве внутреннего стандарта ТМС. Индивидуальность соединений контролировали методом ТСХ на пластинах Silufol UV-254 в системе хлороформ — эфир, 1:1, проявление в парах иода. Методики синтеза соединений Iа – ж, II – IV и их физико-химические константы приведены в работах [1, 3]; свойства новых веществ — в табл. 1.

Пропаргил-N-(*n*-нитрозофенил)карбамат (Iз).

Раствор 1,75 г (10 ммоль) пропаргил-N-фенилкарбамата в 20 мл ледяной уксусной кислоты добавляют по каплям при перемешивании к нитрозилсерной кислоте, полученной из 2 г (29 ммоль) нитрита натрия и 10 мл концентрированной серной кислоты, поддерживая температуру реакционной массы 5 – 10 °С. Смесь выдерживают при 0 °С 0,5 ч и выливают на лед. Осадок отделяют, промывают водой до нейтральной реакции, сушат на воздухе и очищают методом колоночной жидкостной хроматографии (сорбент — оксид алюминия 90, нейтральный, 63 – 200 мкм, элюент — диэтиловый эфир). Получают 1,8 г (89%) соединения Iж в виде кристаллов светло-зеленого цвета. Т.пл. 184 °С. ИК спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 3305 (NH), 2145 (C≡CH), 1745 (C=O), 1555 (NO), 1605, 1510 (C---C<sub>аром.</sub>), 1105 (C-N). C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Метил-N-[5-(метоксикарбонил)амино]-2-метил-4-нитрозофенил]карбамат (Iи) получают по аналогичной методике нитрозированием 2,38 г (10 ммоль) метил-N-[3-[(метоксикарбонил)амино]-4-метилфе-

нил]карбамата. Выход соединения Iи — 1,76 г (66%) в виде кристаллов зеленого цвета. Т. пл. 156 °С (из диэтилового эфира). Спектр ПМР,  $\delta$ , м.д.: 8,11 с (H<sup>6</sup>), 7,75 с (H<sup>3</sup>), 7,52 уш. с (NH), 5,08 уш. с (NH), 3,82 с (3H, OMe), 3,70 с (3H, OMe). ИК спектр (CHCl<sub>3</sub>),  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 3435 (NH), 1745 (C=O), 1525 (NO), 1620, 1590, 1560 (C---C<sub>аром.</sub>), 1115 (C-N). C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>.

Этил-N-[4-(4,5-диметил-3,6-дигидро-2H-1,2-оксазин-2-ил)фенил]карбамат (V). К раствору 3,1 г (16 ммоль) этил-N-(*n*-нитрозофенил)карбамата (Iв) в 30 мл дихлорметана добавляют 1,8 мл (16 ммоль) свежеперегнанного 2,3-диметилбутадиена-1,3. Смесь выдерживают при 25 °С до образования осадка. Продукт отделяют, промывают эфиром (10 мл) и дважды кристаллизуют из этанола. Спектр ПМР,  $\delta$ , м.д.: 1,23 т (3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, J 7 Гц), 1,64 с (3H, Me), 1,71 с (3H, Me), 4,10 к (2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, J 7 Гц), 3,52 с (2H, CH<sub>2</sub>), 4,22 с (2H,

Таблица 2

Антимикробактериальная активность и острая токсичность карбаматных производных 1,2-оксазина

Соединение	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг	Тест-штаммы			
		<i>M. lufu</i>		<i>M. tuberculosis</i>	
		МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл
II	1350	4,0 ± 1,15	12,1 ± 2,14	3,8 ± 1,05	10,0 ± 2,21
III	1320	25,0 ± 8,62	47,4 ± 9,41	54,8 ± 13,24	136,4 ± 20,34
IV	1215	19,3 ± 6,43	36,3 ± 5,72	52,4 ± 12,31	129,6 ± 19,45
V	1120	4,2 ± 2,32	12,8 ± 2,20	4,5 ± 1,17	11,1 ± 2,04
VI	998	4,3 ± 2,17	13,5 ± 2,94	5,1 ± 2,13	12,3 ± 2,41
VII	992	5,6 ± 2,41	14,4 ± 3,51	7,2 ± 2,17	17,4 ± 4,32
VIII	1005	4,4 ± 1,78	12,5 ± 2,93	5,7 ± 2,07	13,9 ± 2,31
IX	850	6,5 ± 2,32	17,2 ± 2,31	5,2 ± 2,11	22,4 ± 2,41
X	810	5,1 ± 1,54	13,1 ± 2,04	4,7 ± 1,61	13,4 ± 2,33
XI	827	4,8 ± 1,61	13,8 ± 2,13	5,1 ± 1,97	15,5 ± 2,34
Дапсон		3,2 ± 0,55	4,4 ± 1,10	28,8 ± 10,43	89,6 ± 17,53
Изониазид		8,8 ± 2,19	11,2 ± 2,19	2,4 ± 0,45	7,2 ± 0,89

CH<sub>2</sub>), 6,91 д (2Н<sub>аром.</sub>, J 7 Гц), 7,18 д (2Н<sub>аром.</sub>, J 7 Гц), 9,20 уш. с (1Н, NH).

По аналогичной методике получают другие карбаматные производные 1,2-оксазина (табл. 1).

#### Экспериментальная биологическая часть

Антимикобактериальную активность соединений V – XI исследовали *in vitro* на культурах микобактерий *Micobacterium tuberculosis* (лабораторный штамм H<sub>37</sub>Rv) и *Micobacterium lufu* (предложена для предварительного отбора средств с противолепрозной активностью [4]), которые высевали на ряд серийных разведений препарата в жидкой питательной среде Школьниковой с добавлением 10% бычьей сыворотки и 20 ед/мл пенициллина. Препаратами сравнения служили дапсон и изониазид.

Исследование включало пять серий экспериментов. Ряды пробирок, содержащих разведения в диметилсульфоксиде каждого соединения от 256 до 1 мг/мл, засеивали по  $1 \cdot 10^6$  *M. tuberculosis* и *M. lufu*. Посевы инкубировали в термостате в течение 12 дней при температуре 37 °С, извлекали из термостата. Из каждой пробирки производили пересев на плотную среду Левенштейна-Йенсена 0,1 мл образовавшейся взвеси микобактерий. Посевы вновь инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 12 дней и подсчитывали количество колоний, выросших на косяке среды Левенштейна-Йенсена.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) определяли методом серийных разведений, минимальные бактерицидные концентрации (МБК) оценивали по подавлению роста микобактерий на 50% [5].

#### SYNTHESIS AND ANTIMICOBACTERIAL ACTIVITY OF CARBAMATE DERIVATIVES OF 1,2-OXAZINE

A. V. Velikorodov<sup>1</sup>, N. G. Urlyapova<sup>2</sup>, and A. D. Daudova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Astrakhan State University, Astrakhan, Russia;

<sup>2</sup> Leprosy Research Institute, Astrakhan, Russia

A series of carbamate derivatives of 1,2-oxazine were obtained by [2+4] cycloaddition of 1,3-dienes to C-nitroso-alkyl-N-arylcarbamates. The antimicrobial activity of the synthesized compounds was studied *in vitro* with respect to *M. Tuberculosis* and *M. Lufu* species in comparison to isoniazid and dapsone. The activity of the newly synthesized compounds significantly depends on the nature and position of substituents in the oxazine nucleus and weakly depends on the nature of substituents in the carbamate moiety. Among the compounds tested, the maximum antimicrobial activity was observed for 4,5-dimethyl-2-(*p*-methoxycarbonylamino)phenyl-3,6-dihydro-1,2-oxazine.

Острую суточную токсичность (ЛД<sub>50</sub>) соединений V – XI определяли на белых беспородных мышах массой 20 – 25 г при внутривентральном введении в трех дозах. Группы животных были составлены из шести особей, продолжительность наблюдения 6 суток. Перед опытом животные находились в одинаковых условиях кормления и содержания в течение 10 дней. При определении острой суточной токсичности доза соединений составляла от 400 до 5000 мг/мл. ЛД<sub>50</sub> рассчитывали по методу Миллера и Тейтнера [6].

Результаты подвергали статистической обработке с использованием *t*-критерия Стьюдента.

#### Результаты и их обсуждение

Установлено, что большинство изученных карбаматных производных 1,2-оксазина обладают антимикобактериальной активностью, сопоставимой с таковой дапсона и изониазида (табл. 2).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Великородов, *Ж. орган. химии*, **36**(8), 1242 – 1244 (2000).
2. V. Poroikov and D. Filimonov, in: *Rational Approaches to Drug Design*, H.-D. Holtje and W. Sippl (eds.), Prous Science, Barcelona (2001), pp. 403 – 407.
3. А. В. Великородов, *Ж. орган. химии*, **36**(2), 256 – 262 (2000).
4. О. А. Иргуганова, Н. Г. Урляпова, *Актуальные вопросы лепрологии*, Астрахань (1984), сс. 147 – 150.
5. Ф. Герхард, *Методы общей бактериологии*, Мир, Москва (1983), Т. 2, с. 29.
6. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, ИИА “Ремедиум”, Москва (2000), сс. 360 – 385.

Поступила 24.11.03