

© Коллектив авторов, 2017

Л. П. Сидорова<sup>1</sup>, Т. А. Цейтлер<sup>1</sup>, В. В. Емельянов<sup>1</sup>, Е. А. Саватеева<sup>1</sup>,  
Н. Е. Максимова<sup>1</sup>, Н. Н. Мочульская<sup>1</sup>, В. А. Черешнев<sup>2</sup>, О. Н. Чупахин<sup>1,3</sup>

## 2-ТИОМОРФОЛИНО-5-АРИЛ-6Н-1,3,4-ТИАДИАЗИН ГИДРОБРОМИДЫ И ИХ СПОСОБНОСТЬ К ИНГИБИРОВАНИЮ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

<sup>1</sup> ФГАУ ВО "Уральский федеральный университет им/ первого Президента России Б. Н. Ельцина", Россия, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19, e-mail: vlapp@isnet.ru

<sup>2</sup> ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 620219, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, e-mail: v.chereshnev@iip.uran.ru

<sup>3</sup> ФГБУН Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 620137, Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской, 22/20, e-mail: chupakhin @ ios.uran.ru

Циклоконденсацией  $\alpha$ -галогенацетофенонов с оригинальным 4-морфолин-тиосемикарбазидом синтезирована группа новых соединений класса 1,3,4-тиадиазина, содержащих тиоморфолиновый фрагмент в положении 2 тиадиазинового цикла. Выявлена способность 2 представителей этой группы соединений эффективно ингибировать неферментативное гликозилирование белков в модельной системе *in vitro*. Полученные результаты испытаний позволяют рекомендовать соединения, содержащие фенильный и фторфенильный фрагмент IIIa и IIIb, для дальнейших испытаний в эксперименте *in vivo*.

**Ключевые слова:** 1,3,4-тиадиазин; циклоконденсация;  $\alpha$ -галогенацетофеноны; 4-морфолин-тиосемикарбазид; неферментативное гликозилирование белков.

За последнее десятилетие на кафедре органической и биомолекулярной химии УрФУ (Екатеринбург) получены новые ряды соединений класса 1,3,4-тиадиазина, содержащие в качестве заместителей в 1,3,4-тиадиазиновом кольце самые разнообразные циклоалкиламины. При исследовании эти соединения показали широкий спектр биологической активности, что позволяет рассматривать их в качестве основы для создания фармакологических препаратов.

По результатам испытаний в этих рядах выявлены вещества, обладающие сердечно-сосудистым и гипометаболическим действием [1], соединения с гипоподемическим и гипергликемическим эффектами [2]; показана способность некоторых тиадиазинов снижать агрегацию тромбоцитов [3], действовать на течение системного воспаления при остром инфаркте миокарда [4] и остром панкреатите [5].

Такое разнообразие биологической активности у разных групп 1,3,4-тиадиазинов, отличающихся в рядах циклоалкиламинами, свидетельствует о решающем влиянии этих заместителей на взаимосвязь "структура — биологическая активность".

В связи с этим можно предположить, что делокализация электронной пары N-атома в циклоалкиламинах на тиадиазиновое кольцо будет разной в зависимости от величины цикла циклоалкиламинов или наличия в нем других гетероатомов (как в морфолоне или в тиоморфолоне). Эти различия могут определять степень лабильности тиадиазинового цикла и возможность его трансформации в соответствующие тиольные соеди-

нения типа пиразолов [6, 7]. Аналогичные наблюдения также отмечены нами в предыдущей статье, касавшейся исследований для 1,3,4-тиадиазинов, содержащих в качестве заместителей в положении 2 алициклические амины [8]. В дальнейшем с помощью математических расчетов планируется интерпретировать влияние на стабильность тиадиазинового кольца как различных циклоалкиламинов, так и алициклических аминов.

Ранее нами установлено, что 1,3,4-тиадиазины с морфолиновым фрагментом в качестве заместителя в положении 2 обладают хорошей способностью ингибирования неферментативного гликозилирования белков (НГБ), играющего важную роль в развитии осложнений сахарного диабета [9]. Учитывая схожесть электронного строения морфолинового и тиоморфолинового фрагментов, а также более высокую основность тиоморфолинового цикла, по сравнению с морфолиновым, получена группа ранее запатентованных тиоморфолиновых производных 1,3,4-тиадиазинов [10], с целью изучения их способности блокирования реакции НГБ в модельной системе *in vitro*. Синтез осуществлялся по усовершенствованной схеме 1 получения тиоморфолинида тиокарбазиновой кислоты (II).

Синтез 2-тиоморфолино-5-арил-6Н-1,3,4-тиадиазина, гидробромидов, приведенный на схеме 2, осуществляли циклоконденсацией  $\alpha$ -галогенацетофенонов I(a – g) и тиоморфолинида тиокарбазиновой кислоты (II).

Схема 1

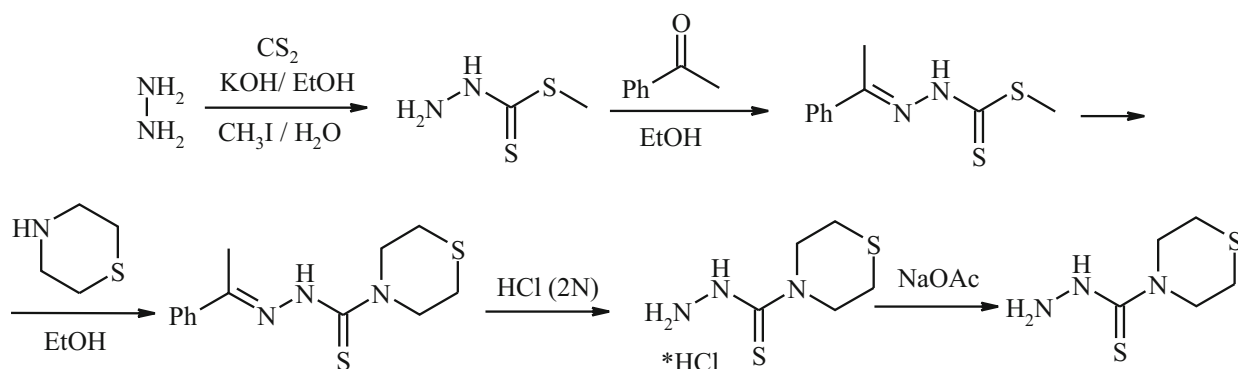
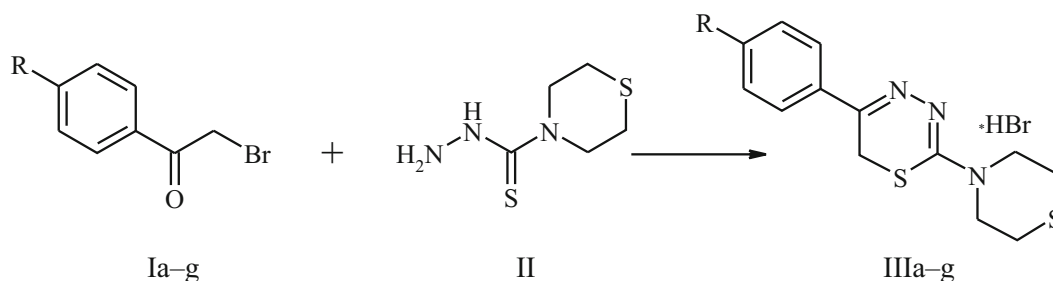


Схема 2



R = H (a), F (b), Cl (c), OH (d), OCH<sub>3</sub> (e), OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (f), Br (g).

### Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР <sup>1</sup>H соединений зарегистрированы на спектрометре “Bruker DRX-400” с рабочей частотой 400,13 МГц в ДМСО-d<sub>6</sub>. В качестве внутреннего стандарта использовали ТСМ. Контролировали протекание реакции и чистоту продуктов методом ТСХ на пластинках “Silufol UV-254” в системе растворителей бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5). Данные элементного анализа соответствуют брутто-формулам.

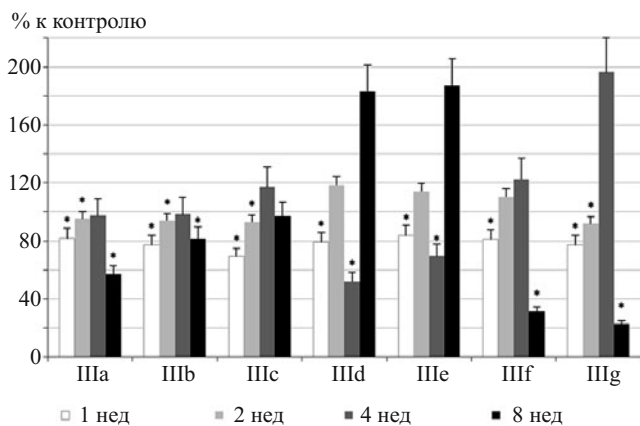
Выходы, температуры плавления, *R<sub>f</sub>*, а также спектральные характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 1, 2.

**Общая методика синтеза α-галогенацетофенонов.** К 0,3 моль соответствующего ацетофенона в 200–250 мл ледяной уксусной кислоты прибавляют по каплям при 25 °С и перемешивании эквимольное количество брома. Перемешивание проводят 2 ч при 25 °С или 1 ч при 25 °С и 1 ч при 50–55 °С. Затем реакционную массу охлаждают, выливают в 4–6-кратный объем ледяной воды, выдерживают 3–5 ч, отфильтровывают в случае кристаллических веществ, разделяют слои — органический и водный в делительной воронке в случае жидких (маслообразных) продуктов бромирования, промывают водой, сушат. Далее проводят очистку α-галогенацетофенонов с помощью перекристаллизации из спиртов, водных спиртов или других растворителей. Жидкие (маслообразные) продукты перегоняют в вакууме или используют очистку методом колоночной хроматографии. Выходы α-галогенацетофенонов составляют от 35 до 85 %.

### Методика синтеза тиоморфолинида тиокарбазинной кислоты (II).

Растворяют по возможности при нагревании 70 г (1,25 моль) гидроксида калия и 1 моль тиоморфолина в 170 мл водного этанола. После медленного охлаждения до комнатной температуры к мутному раствору прикапывают постепенно 1 моль сероуглерода с достаточным охлаждением, чтобы поддерживать температуру на уровне < 20 °С. Затем этот раствор выдерживают в течение 8 ч. Выпавший светло-бежевый осадок калиевой соли тиоморфолин-дителиокарбазинной кислоты отфильтровывают, промывают бензолом и небольшим количеством спирта. Далее высушенную калиевую соль прибавляют к раствору 95 г (1 моль) хлоруксусной кислоты в 300 мл воды, нейтрализованной карбонатом калия. Эту смесь выдерживают в течение ~ 8 ч. Отделяют осадок фильтрованием. К фильтрату прибавляют эквимольное количество 50 % раствора гидразин-гидрата и упаривают до ~ 50 % от его первоначального объема. После охлаждения отфильтровывают выпавший осадок. Выход тиоморфолинида тиокарбазинной кислоты (II) составляет 75 %. Выделенное соединение II представляет собой белое твердое вещество со следующими характеристиками: *T<sub>пл.</sub>* 149–150 °С, <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 400 МГц, δ, р.р.м): 2,55–2,57 (м, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4,04–4,06 (м, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4,39 (с, 1H, NH), 6,39 (уш. с, 2H, NH<sub>2</sub>).

**2-Тиоморфолин-4-ил-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромид (IIIa).** К раствору 2 г (0,01 моль) α-бромацетофенона (Ia) в 10 мл горячего абсолютного этанола прибавляют 1,78 г (0,01 моль) тиоморфолида тиокарбазинной кислоты (II) в 40 мл абсолютного эта-



Накопление фруктозамина при инкубации бычьего сывороточного альбумина с глюкозой в присутствии производных 2-тиоморфолин-5-фенил-1,3,4-тиадиазинов IIIa – g ( $M \pm m$ ), \* статистически значимые отличия от контроля ( $p < 0,05$ ).

нола, кипятят 20 мин, после горячего фильтрования и охлаждения отфильтровывают выпавший светло-бежевый осадок, кристаллизуют из абсолютного этанола.

**2-Тиоморфолин-4-ил-5-(4'-фторфенил)-6Н-1,3,4-тиадазин гидробромид (IIIb).** Получают аналогично IIIa из 2 г (0,0086 моль) 4'-фтор- $\alpha$ -бромацетофенона (Ib) и 1,52 г (0,0086 моль) II. Белый осадок.

**2-Тиоморфолин-4-ил-5-(4'-хлорфенил)-6Н-1,3,4-тиадазин гидробромид (IIIc).** Получают аналогично IIIa из 2,2 г (0,01 моль) 4'-хлор- $\alpha$ -бромацетофенона (Ic) и 1,8 г (0,01 моль) II. Лимонно-желтый осадок.

**5-(4'-Гидроксифенил)-2-тиоморфолин-4-ил-6Н-1,3,4-тиадазин гидробромид (IIIд).** Получают аналогично IIIa из 2 г (0,0093 моль) 4'-гидрокси- $\alpha$ -бромацетофенона (Id) и 1,65 г (0,0093 моль) II. Светло-золотистый осадок.

**5-(4'-Метоксифенил)-2-тиоморфолин-4-ил-6Н-1,3,4-тиадазин гидробромид (IIIe).** Получают аналогично IIIa из 1,5 г (0,0065 моль) 4'-метокси- $\alpha$ -бромацетофенона (Ie) и 1,16 г (0,0065 моль) II. Желтовато-бежевый осадок.

**2-Тиоморфолин-4-ил-5-(4'-этоксифенил)-6Н-1,3,4-тиадазин гидробромид (IIIф).** Получают аналогично IIIa из 1,28 г (0,0056 моль) 4'-этоксифенил- $\alpha$ -бромацетофенона (If) и 1,0 г (0,0056 моль) II. Светло-желтый осадок.

Данные спектров ЯМР  $^1\text{H}$  1,3,4-тиадиазинов IIIa – g

Соединение	R	Химический сдвиг, $\delta$ , м.д. (КССВ, Гц)		
		тиоморфолино	$\text{CH}_2\text{S}$ (с, 2H)	R- $\text{C}_6\text{H}_4$
IIIa	H	2,85 – 3,05 (м, 4H), 4,12 – 4,32 (м, 4H)	4,41	7,50 – 7,60 (м, 3H), 7,95 – 8,05 (м, 2H)
IIIb	F	2,82 – 2,92 (м, 4H), 4,10 – 4,25 (м, 4H)	4,36	7,22 – 7,32 (м, 2H), 7,98 – 8,08 (м, 2H)
IIIc	Cl	2,85 – 2,95 (м, 4H), 4,10 – 4,24 (м, 4H)	4,36	7,51 – 7,59 (м, 2H), 7,96 – 8,06 (м, 2H)
IIIд	OH	2,75 – 2,95 (м, 4H), 4,12 – 4,35 (м, 4H)	4,37	6,90 – 7,00 (м, 2H), 7,80 – 7,92 (м, 2H), 10,22 (с, OH)
IIIe	$\text{OCH}_3$	2,82 – 2,92 (м, 4H), 4,10 – 4,25 (м, 4H)	4,35	3,89 (с, $\text{CH}_3$ ), 7,00 – 7,10 (м, 2H), 7,88 – 8,00 (м, 2H)
IIIф	$\text{OC}_2\text{H}_5$	2,81 – 2,93 (м, 4H), 4,11 – 4,25 (м, 4H)	4,35	1,41 (м, $\text{CH}_3$ ), 4,08 – 4,10 (м, $\text{CH}_2$ ), 6,98 – 7,08 (м, 2H), 7,88 – 7,98 (м, 2H)
IIIg	Br	2,80 – 2,96 (м, 4H), 4,12 – 4,28 (м, 4H)	4,40	7,65 – 7,75 (м, 2H), 7,90 – 8,00 (м, 2H)

Характеристики 1,3,4-тиадиазинов IIIa – g

Соединение	R	Выход, %	$R_f$	Т. пл., $^{\circ}\text{C}$	Брутто-формула
IIIa	H	62	0,51	183 – 184	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{S}_2$
IIIb	F	59	0,68	177 – 178	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BrFN}_3\text{S}_2$
IIIc	Cl	71	0,50	200 – 201	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BrClN}_3\text{S}_2$
IIIд	OH	68	0,49	194 – 195	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{OS}_2$
IIIe	$\text{OCH}_3$	65	0,63	201 – 202	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{BrN}_3\text{OS}_2$
IIIф	$\text{OC}_2\text{H}_5$	42	0,33	169 – 170	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{OS}_2$
IIIg	Br	65	0,23	198 – 199	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{Br}_2\text{N}_3\text{S}_2$

**5-(4'-Бромфенил)-2-тиоморфолин-4-ил-6Н-1,3,4-тиадазин гидробромид (IIIg).** Получают аналогично IIIa из 2 г (0,0072 моль) 4'-бром- $\alpha$ -бромацетофенона (Ig) и 1,28 г (0,0072 моль) II. Ярко-желтый осадок.

#### Экспериментальная биологическая часть

По данным проведенных исследований *in vitro* способность ингибировать НГБ у 1,3,4-тиадиазинов коррелирует со способностью к химической трансформации 1,3,4-тиадиазинового кольца в пиразолы или в меркаптопиразолы при нагревании соединений в различных средах [11]. Такая же способность к трансформации возможна и при ферментативном воздействии в организме.

Реакцию НГБ моделировали *in vitro* путем инкубации бычьего сывороточного альбумина (БСА) ("Sigma", США, V фракция по Кону, степень очистки не менее 96 %) с D-глюкозой ("НПО ЭКРОС", Россия) в водном растворе при 4  $^{\circ}\text{C}$  и pH среды 5,5 – 6,0 для обеспечения наилучшей растворимости исследуемых соединений. Выбор БСА связан с тем, что этот белок наиболее часто используется для тестирования способности химических соединений блокировать реакцию НГБ *in vitro* [12]. Для оценки способности производных 1,3,4-тиадиазина блокировать реакцию НГБ изучали накопление в модельной системе начального продукта НГБ фруктозамина (ФА) в присутствии исследуемых веществ. В модельной системе, включавшей БСА в концентрации 5 г/л, D-глюкозу и исследуемое вещество в эквимольной концентрации 20 ммоль/л, определяли концентрацию ФА спектрофотометрическим

методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой [13] через 1, 2, 4 и 8 недель инкубации. В контрольном опыте БСА инкубировали с *D*-глюкозой без ингибиторов НГБ, при этом наблюдали увеличение концентрации ФА на первой и второй неделе эксперимента с выходом на плато в конце четвертой и восьмой. Концентрацию ФА в каждой пробе определяли в 3 параллелях, результат выражали в % от уровня контрольного опыта. Статистическую обработку результатов проводили в программных пакетах “MS Excel” и “Biostatistica”. Рассчитывали среднее арифметическое (*M*), стандартное отклонение ( $\sigma$ ) и ошибку среднего (*m*). Статистическую значимость различий концентраций ФА оценивали с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни в опытных и контрольных пробах на каждом сроке эксперимента. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Исследование серии новых 1,3,4-тиадиазинов показало их различную способность по ингибированию накопления ФА при инкубации БСА с глюкозой. Среди исследованных 7 соединений выявлены 2 вещества (IIIa и IIIb), равномерно снижавших накопление ФА по сравнению с контрольным опытом (рисунок).

Характерно, что через 8 недель снижение накопления ФА в присутствии 1,3,4-тиадиазинов составляло до 77,1 % (соединение IIIf) от уровня контрольного опыта. Наилучшими свойствами обладают соединения IIIa и IIIb, содержащие фенил и *n*-фторфенил. В целом, группа тиоморфолинзамещенных 1,3,4-тиадиазинов менее активна в ингибировании гликозилирования НГБ глюкозой, по сравнению с соответствующими морфолиновыми аналогами. Аналогичная, но более высокая активность фенил- и *n*-фторфенильных производных наблюдалась нами и для морфолиновых аналогов.

Таким образом, результаты проведенного эксперимента свидетельствуют о способности ряда тиоморфолиновых производных 1,3,4-тиадиазина блокировать реакцию НГБ в модельной системе *in vitro*, что позволяет рекомендовать наиболее эффективные соединения этого ряда IIIa и IIIb для испытаний в эксперименте *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (проект 2458) и постановления № 211 Правительства РФ, контракт № 02.A03.21.0006.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Patent US 6 028 068, *Chem. Abstr.*, **127**, 149163 (1997).
2. Патент РФ 2411936, *Chem. Abstr.*, **154**, 251130 (2011).
3. PCT Rus. Patent 2259371, *Chem. Abstr.*, **143**, 229887 (2005).
4. A. Sarapultsev, O. Chupakhin, M. Rantsev, et al., *Advances Biosci. Biotechnol.*, **3**, 442 – 448 (2012).
5. P. Sarapultsev, O. Chupakhin, A. Sarapultsev, et al., *Int. J. Exp. Pathol.*, **93**(1), 18 – 23 (2012).
6. Л. П. Сидорова, Н. М. Перова, Л. Г. Егорова, А. П. Новикова, *Тез. докл. I Всесоюз. конф. по теор. органической химии*, Волгоград (1991), сс. 232.
7. О. Н. Чупахин, Л. П. Сидорова, Н. М. Перова и др., *Сб. трудов Четвёртой международной конференции СВС-2010 “Химия и биологическая активность синтетических и природных соединений”*, ICSPF Inter Bio Screen Ltd., Москва (2010), сс. 489.
8. Л. П. Сидорова, Т. А. Цейтлер, Н. М. Перова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(8), 8 – 12 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49**(8), 501 – 505 (2015).
9. В. В. Емельянов, Е. А. Саватеева, Л. П. Сидорова и др., *РИЖ*, **9**, 2(1), (18), 487 – 489 (2015).
10. Patent US, *Chem. Abstr.*, **127**, 149164 (1997).
11. В. В. Емельянов, Е. А. Саватеева, А. В. Мусальникова и др., *Аллергол. и иммунол.*, **14**(2), 141 – 142 (2013).
12. I. Sadowska-Bartos, S. Galiniak, G. Bartosz, *Molecules*, **19**, 18828 – 18849 (2014).
13. Л. Н. Викторова, В. К. Городецкий, *Лаб. дело*, **5**, 15 – 18 (1990).

Поступила 04.07.16

## SYNTHESIS OF 2-THIOMORPHOLINO-5-ARYL-6H-1,3,4-THIADIAZINE HYDROBROMIDES AND STUDY OF THEIR ABILITY TO INHIBIT NONENZYMATIC GLYCOSYLATION OF PROTEINS

L. P. Sidorova<sup>1</sup>, T. A. Tseitler<sup>1</sup>, V. V. Emel'yanov<sup>1</sup>, E. A. Savateeva<sup>1</sup>, N. E. Maksimova<sup>1</sup>, N. N. Mochul'skaya<sup>1</sup>, V. A. Chereshev<sup>2</sup>, and O. N. Chupakhin<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Ural Federal University, Yekaterinburg, 620002 Russia.

<sup>2</sup> Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620219 Russia.

<sup>3</sup> I. Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620137 Russia.

\* e-mail: chupakhin@ios.uran.ru

A series of new compounds from 1,3,4-thiadiazine class with thiomorpholine fragment at position 2 of the thiadiazine cycle have been synthesized by cyclocondensation of  $\alpha$ -haloacetophenones with original 4-morpholiniothiosemicarbazide. Two of the new 1,3,4-thiadiazines (IIIa and IIIb, containing phenyl and fluorophenyl fragment, respectively) showed the ability to inhibit nonenzymatic glycosylation of proteins in a model system *in vitro*. The obtained results allow these compounds to be recommended for subsequent experimental testing *in vivo*.

**Keywords:** 1,3,4-thiadiazine; cyclocondensation;  $\alpha$ -haloacetophenones; 4-morpholiniothiosemicarbazide; nonenzymatic glycosylation of proteins.