

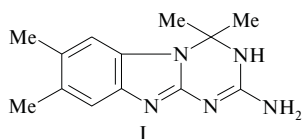
А. В. Долженко<sup>1,2</sup>, В. К. Чуу<sup>2</sup>

## СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 1,3,5-ТРИАЗИНО[1,2-а]БЕНЗИМИДАЗОЛ-2-АМИНОВ

<sup>1</sup> Пермская государственная фармацевтическая академия, avdolzh@inbox.ru;<sup>2</sup> Департамент фармации, Национальный университет Сингапура, Сингапур, phada@nus.edu.sg

Циклизацией 2-бензимидазолилгуанидина различными реагентами получен ряд 4-замещенных 1,3,5-триазино[1,2-а]бензимидазол-2-аминов. Изучена прототропная таутомерия полученных дигидроаналогов. На основании данных ЯМР установлено, что доминирующей в растворе ДМСО является 3,4-дигидроформа. Все исследованные соединения ингибируют дигидрофолатредуктазу млекопитающих. Наибольшую активность проявил 4,4-диметил-3,4-дигидро[1,3,5]триазино[1,2-а]бензимидазол-2-амин ( $IC_{50} = 10,9$  мкМ).

Известно, что ингибиторы фермента дигидрофолатредуктазы (ДФР) являются препаратами выбора при терапии бактериальных [1] и паразитарных инфекций [2, 3], а также некоторых опухолей [4, 5]. Интенсивные исследования соединений с антифолатной активностью выявили несколько наиболее перспективных направлений дальнейшего поиска ингибиторов ДФР [6]. Дигидро-1,3,5-триазины относятся к одному из таких направлений, но их конденсированные аналоги практически не изучены. Установлено лишь, что 4,4,7,8-тетраметил-3,4-дигидро[1,3,5]триазино[1,2-а]-бензимидазол-2-амин (I) ингибирует ДФР малярийного плазмодия [7, 8]. Однако дальнейшего развития эти работы не получили. Предполагается, что аминогруппа в положении 2 является одним из ключевых элементов структуры, обеспечивающих эффективное взаимодействие с ферментом, вместе с тем вклад метильных заместителей в активность соединения I остается неясным. С целью поиска новых эффективных ингибиторов ДФР нами был получен ряд аналогов соединения I без метильных групп в положениях 7 и 8. Изучено влияние заместителей в положении 4, а также степени насыщенности цикла на активность соединений.



В качестве исходного соединения для синтеза 1,3,5-триазино[1,2-а]бензимидазол-2-аминов (III – VIII) был выбран 2-бензимидазолилгуанидин (II). Аннелирование триазинового цикла к бензимидазоловому скелету осуществляли при действии на соединение II ряда реагентов (схема 1). Так, при кипячении 2-бензимидазолилгуанидина (II) с формальдегидом в диоксане образуется 3,4-дигидро[1,3,5]триазино[1,2-а]бензимидазол-2-амин (III). 4,4-Диметил-3,4-дигидро[1,3,5]-триазино[1,2-а]бензимидазол-2-амин (IV) был получен кипячением соединения II в ацетоне в присутствии катализатора пиперидина. Спиросоединение V получали из II и циклогексанона при кипячении в ДМФА.

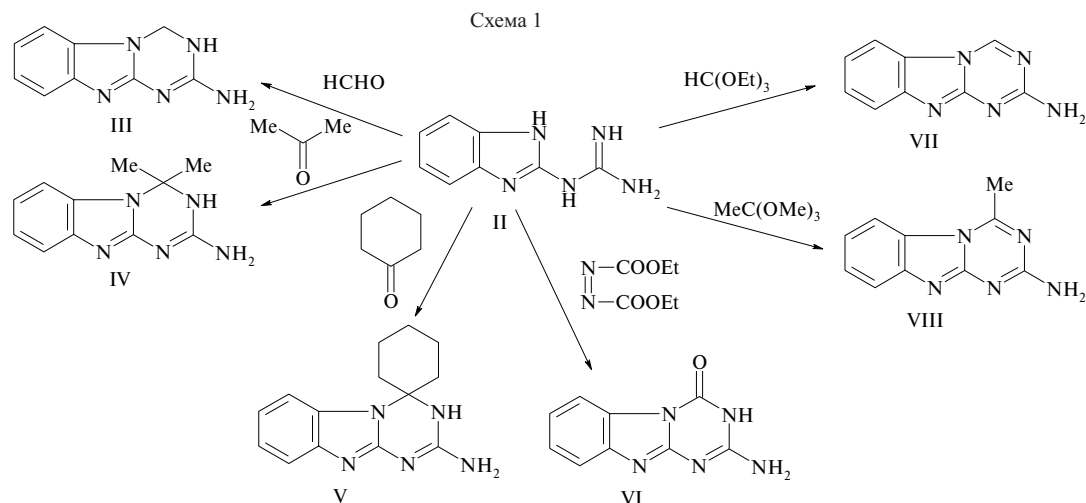
Использование диэтилдиазоидикарбоксилата в качестве карбонилирующего реагента позволяет получить 4-оксозамещенный аналог VI. Полностью сопряженные 1,3,5-триазино[1,2-а]бензимидазолы VII и VIII были синтезированы при действии на 2-бензимидазолилгуанидин

(II) ортоэфиров муравьиной и уксусной кислот соответственно.

Строение полученных соединений подтверждено спектральными данными (табл. 1, 2). При анализе <sup>1</sup>H ЯМР спектров (табл. 1) сигнал протона C(6)-H обнаруживается в более слабом поле по сравнению с сигналами остальных протонов фениленового фрагмента гетероцикла. Этот протон в наибольшей степени подвержен влиянию заместителя в положении 4 и смене типа гибридизации атома C(4). Так, замещение атомов водорода метиленового фрагмента в дигидро[1,3,5]триазино[1,2-а]бензимидазоле (III) алкильными группами (соединения IV и V) сдвигает сигнал C(6)-H в область слабого поля. Анизотропный эффект атома кислорода карбонильной группы соединения VI оказывает подобное, но значительно более выраженное ( $\Delta\delta = 0,80$  м. д.) влияние на сигнал C(6)-H. При смене  $sp^3$  гибридизации атома C(4) на  $sp^2$  наблюдается дезэкранирование всех протонов фениленового фрагмента гетероцикла, которое в наибольшей степени характерно также для C(6)-H.

Четкие сигналы протонов аминогруппы в <sup>1</sup>H ЯМР спектрах соединений III – VIII подтверждают их существование в виде аминов. Сигналов, характерных для теоретически возможных иминов, в спектрах не обнаружено. Вместе с тем, кроме amino-иминной таутомерии, для дигидро[1,3,5]триазино[1,2-а]бензимидазолов можно предложить три различные структуры (A, B и C), связанные с прототропной таутомерией в цикле (схема 2). Факт миграции протона в цикле находит подтверждение в некотором уширении сигналов C(2), C(4) и C(10a) в <sup>13</sup>C ЯМР спектрах соединений III – VI. Для анализа таутомерного равновесия эффективным оказывается сопоставление спектров <sup>13</sup>C ЯМР соединений III и VII.

Значительно более выраженный сдвиг сигнала C(2) ( $\Delta\delta = 4,6$  м. д.) по сравнению с сигналом C(10a) ( $\Delta\delta = 1,7$  м. д.) при переходе от соединения III к VII указывает на доминирование в таутомерном равновесии формы A (схема 2). Факт доминирования 3,4-дигидро-таутомерной формы A находит свое подтверждение и при анализе спектра NOESY соединения IV. В этом спектре для сигналов протонов метильных групп в четвертом положении и протона при атоме азота цикла наблюдается четкий кросс-пик, указывающий на их близкое расположение в пространстве, что соответствует форме A.



### Экспериментальная химическая часть

$^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры соединений записаны на спектрометре Bruker DPX-300 (300 МГц) в ДМСО- $d_6$  с использованием в качестве внутреннего стандарта ТМС. Контроль за ходом реакции и определение чистоты соединений осуществляли методом ТСХ на пластинках Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) в системе этанол – хлороформ (3:1), пятна детектировали в УФ-свете и при проявлении йодом. Данные элементного анализа синтезированных соединений соответствуют значениям, вычисленным по брутто-формулам.

**3,4-Дигидро[1,3,5]триазино[1,2-а]бензимидазол-2-амин (III).** Раствор 1,75 г (10 ммоль) 2-бензимидазолилгуанидина (II) и 1,0 мл (10 ммоль) 37 % формальдегида в 20 мл диоксана кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч. После охлаждения образующийся осадок отфильтровывают, промывают этанолом, высушивают и кристаллизуют из ДМФА. Выход 1,27 г (68 %). Т. пл. 284 – 285 °С.

**4,4-Диметил-3,4-дигидро[1,3,5]триазино[1,2-а]бензимидазол-2-амин (IV).** Раствор 1,75 г (10 ммоль) 2-бензимидазолилгуанидина (II) и 0,5 мл пиперидина в 20 мл ацетона кипятят с обратным холодильником в течение

7 ч. После охлаждения образующийся осадок отфильтровывают, промывают ацетоном и высушивают. Образующийся продукт имеет удовлетворительную степень чистоты, кристаллизация из ДМФА не приводит к изменению температуры плавления. Выход 1,81 г (84 %). Т. пл. 295 – 296 °С.

**Спиро[циклогексан-1,4'(1'Н)-[1,3,5]триазино[1,2-а]-бензимидазол]-2'-амин (V).** Раствор 1,75 г (10 ммоль) 2-бензимидазолилгуанидина (II) и 1,55 мл (15 ммоль) циклогексанона в 15 мл ДМФА кипятят с обратным холодильником в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрируют под вакуумом, охлаждают, образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают этанолом и кристаллизуют из ДМФА. Выход 1,43 г (56 %). Т. пл. 375 °С.

**4-Оксо-3,4-дигидро[1,3,5]триазино[1,2-а]бензимидазол-2-амин (VI).** К раствору 1,75 г (10 ммоль) 2-бензимидазолилгуанидина (II) в этаноле при комнатной температуре по каплям добавляют 1,74 г (10 ммоль) диэтилазодикарбоксилата. Реакционную смесь кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч. После охлаждения образовавшийся осадок фильтруют, промывают этанолом и кристаллизуют из ДМФА. Выход 1,53 г (76 %). Т. пл. > 360 °С.

Таблица 1

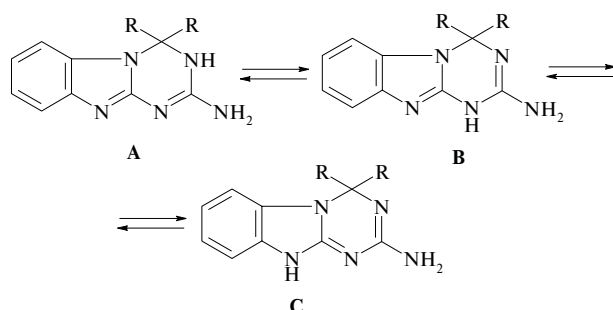
$^1\text{H}$  ЯМР спектры 1,3,5-триазино[1,2-а]бензимидазол-2-аминов (III – VIII)

Соединение	$^1\text{H}$ ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- $d_6$ , м.д.)						
	NH <sub>2</sub>	NH	C(6)-H	C(7)-H	C(8)-H	C(9)-H	C(4)-H или заместитель при C(4)
III	6,83 с	7,89 уш. с	7,29 дд, J 7,3; 1,1 Гц	6,97 тд, J 7,3; 1,3 Гц	7,02 тд, J 7,3; 1,3 Гц	7,17 дд, J 7,3; 1,1 Гц	5,40 с (2H, CH <sub>2</sub> )
IV	6,93 с	8,17 уш. с	7,39 д, J 7,9 Гц	6,95 т, J 7,9 Гц	7,02 т, J 7,5 Гц	7,29 д, J 7,5 Гц	1,82 с (6H, 2Me)
V	6,36 с	7,48 уш. с	7,43 д, J 7,9 Гц	6,90 т, J 7,2 Гц	6,98 т, J 7,3 Гц	7,24 д, J 7,5 Гц	1,13 – 1,90 (м, 8H, C(2')-H, C(3')-H, C(4')-H, C(5')-H, C(6')-H), 2,41 (тд, 2H, J 2,8; 3,4 Гц, C(2')-H, C(6')-H)
VI	7,19 уш.с	12,20 уш. с	8,09 д, J 7,5 Гц	7,25 тд, J 7,7; 1,1 Гц	7,34 тд, J 7,7; 1,5 Гц	7,42 д, J 7,2 Гц	–
VII	7,69 уш.с	–	8,01 д, J 7,9 Гц	7,21 тд, J 7,4; 1,1 Гц	7,36 тд, J 7,7; 1,1 Гц	7,53 д, J 7,9 Гц	9,60 (с, 1H, CH)
VIII	7,51 с	–	7,86 д, J 7,9 Гц	7,20 т, J 7,7 Гц	7,37 т, J 7,8 Гц	7,54 д, J 7,9 Гц	2,92 (с, 3H, Me)

<sup>13</sup>C ЯМР спектры 1,3,5-триазино[1,2-а]бензимидазол-2-аминов (III – VIII)

Соединение	<sup>13</sup> C ЯМР спектр (75 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> , м.д.)									
	C(2)	C(4)	C(5a)	C(6)	C(7)	C(8)	C(9)	C(9a)	C(10a)	Заместитель при C(4)
III	156,5	53,0	131,5	107,3	120,7	119,0	115,5	142,7	153,7	–
IV	155,3	69,4	130,5	109,7	120,9	119,0	115,8	143,3	153,5	28,5 (2Me)
V	154,6	71,1	130,6	110,1	120,4	118,8	116,1	143,6	153,6	20,8 (C3', C5'), 23,6 (C4'), 35,3 (C2', C6')
VI	162,9	153,7	126,6	112,6	121,8	124,7	113,9	133,1	150,3	–
VII	161,1	148,8	126,4	110,9	120,0	125,5	117,4	144,1	152,0	–

Схема 2



**1,3,5-Триазино[1,2-а]бензимидазол-2-амины (VII, VIII).** Раствор 0,87 г (5 ммоль) 2-бензимидазолуанидина (II) и 5 ммоль соответствующего ортоэфира в 15 мл ДМФА кипятят с обратным холодильником в течение 3 – 18 ч. После охлаждения образующийся осадок отфильтровывают, перекристаллизовывают из ДМФА (соединение VII) или промывают горячим этанолом (амин VIII). VII: Выход 0,85 г (92 %). Т. пл. 301 °С. VIII: Выход 0,76 г (76 %). Т. пл. 324 – 325 °С.

*Экспериментальная биологическая часть*

Степень ингибирования бычьей ДГФР (Fluka Chemie) определяли фотометрически по уменьшению поглощения при 340 нм смеси ДГФР, дигидрофолата натрия (Sigma) и восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (Sigma) в среде фосфатного буфера в присутствии тестируемого соединения [9]. Соединения предварительно растворяли в ДМСО, который использовали в эквивалентном количестве в контрольной серии опытов. Соединения VI и VIII не были исследованы из-за недостаточной растворимости. Для соединений, проя-

Таблица 3  
Ингибирование дигидрофолатредуктазы некоторыми 1,3,5-триазино[1,2-а]бензимидазол-2-аминами

Соединение	IC <sub>50</sub> , М · 10 <sup>-4</sup>
III	5,7
IV	0,109 (0,072 – 0,164)
V	4,7
VII	2,8

вивших ДГФР-ингибирующую активность определяли величины IC<sub>50</sub>.

Результаты изучения ДГФР-ингибирующего действия 1,3,5-триазино[1,2-а]бензимидазолов (III – V, VII) представлены в табл. 3. Все исследованные соединения оказались активными. Наибольшую степень ингибирования ДГФР проявило соединение IV с гем-диметильной группой в четвертом положении (IC<sub>50</sub> = 10,9 мкМ).

## ЛИТЕРАТУРА

- R. L. Then, *J. Chemotherapy (Firenze, Italy)*, **16**(1), 3 – 12 (2004).
- R. G. Ridley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(21), 13362 – 13364 (2002).
- I. H. Gilbert, *Biochim. Biophys. Acta*, **1587**(2 – 3), 249 – 257 (2002).
- E. M. Berman and L. M. Werbel, *J. Med. Chem.*, **34**(2), 479 – 485 (1991).
- A. Gangjee and H. D. Jain, *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents*, **4**(5), 405 – 410 (2004).
- I. M. Kompis, K. Islam, and R. L. Then, *Chem. Rev.*, **105**(2), 593 – 620 (2005).
- Патент Японии 10310526 (1998); *Chem. Abstr.*, **130**, 62956 (1999).
- T. Toyoda, R. K. B. Brobey, G. I. Sano, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **235**, 515 – 519 (1997).
- B. Roth and J. J. Burchall, *Methods Enzymol.*, **18**(Pt. B), 779 – 786 (1971).

Поступила 25.10.05

## SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF 1,3,5-TRIAZINO[1,2-a]BENZIMIDAZOLE-2-AMINES

A. V. Dolzhenko<sup>1,2</sup> and W. K. Chui<sup>2\*</sup><sup>1</sup> Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation<sup>2</sup> Department of Pharmacy, National University of Singapore, Singapore

\* e-mail: phada@nus.edu.sg

Several 4-substituted 1,3,5-triazino[1,2-a]benzimidazole-2-amines were prepared via cyclization of 2-benzimidazolylguanidine with various reactants. The prototropic tautomerism in the obtained dihydro analogs was investigated. According to the NMR data, 3,4-dihydro form was found to predominate in DMSO solutions. All tested compounds inhibited the activity of mammalian dihydrofolate reductase. The most active compound was 4,4-dimethyl-3,4-dihydro[1,3,5]triazino[1,2-a]benzimidazole-2-amine (IC<sub>50</sub> = 10.9 mM).