

Редокс превращения и нуклеофильные замещения как возможные метаболические реакции препарата «Триазавирин». Химическое моделирование процессов метаболизма

Н.Р. Медведева,^{*1} И.С. Сапожникова,¹ В.Л. Русинов,^{1,2} Е.Н. Уломский¹

¹ Уральский федеральный университет ул. Мира, 19 г. Екатеринбург, 620002, Россия. тел: (343) 375-45-01; E-mail: nataly-medvedeva@yandex.ru

² Институт органического синтеза УрО РАН, ул. С.Ковалевской, 22 / Академическая, 20 г. Екатеринбург, 620990, Россия.

В качестве модельных метаболических превращений противовирусного препарата «Триазавирин» и его аналогов - 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов 1a-d, рассмотрены реакции окисления алкилтиогруппы с образованием соответствующих сульфоксидов 2a-d и сульфонов 3a-d, а также процесс нуклеофильного замещения сульфонильной группы цистеином и цистеамином с образованием соединений 5 и 6.

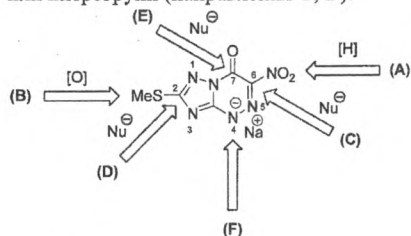
Введение

Актуальность создания новых противовирусных средств обусловлена совместным действием таких постоянно действующих факторов, как распространение социально значимых, особо опасных инфекций, а также появление патогенных вирусных штаммов, устойчивых к действию существующих лекарственных средств.

Противовирусный препарат «Триазавирин» и его аналоги обладают высокой эффективностью в опытах *in vivo*¹ и пониженной активностью в экспериментах на клеточных культурах, что позволяет предположить противовирусное действие не самого «Триазавирин», а продуктов его превращений в организме. Одним из способов выявления таких превращений является прогнозирование возможных продуктов модификаций соединений и химический синтез моделей.

Исходя из молекулярной структуры соединения 1a и изучения химических свойств нитроазоло[5,1-с][1,2,4]триазинового¹ можно предположить различные варианты метаболизма. Редокс-превращения в организме: (направление А,В) как восстановление нитрогруппы под действием редуказ (направление А); окисление алкилтиофрагмента под действием оксидаз (направление В) и его дальнейшие

превращения. Участие трансфераз при действии N- и S-нуклеофилов, таких, например, как лизин, аргинин, цистеин способно приводить к замещению алкилтио- или нитрогрупп (направления С, D).



Гидролитические ферменты также вполне способны обуславливать превращения «Триазавирин[®]», сопровождающиеся деструкцией триазинового цикла с разрывом связи С-N (направление Е). Возможно и алкилирование по атому азота (направление F).

Что касается редокс-превращений «Триазавирин», то ранее нами было установлено, что при внутрижелудочном ведении лабораторным животным субстанции препарата происходит восстановление нитрогруппы с образованием - 2-метилтио-6-амино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она², не проявляющего противовирусного действия в экспериментах *in vitro* и, скорее всего, не являющегося действующим метаболитом.

Результаты и обсуждение

Рассматривая возможность окисления алкилтио групп при использовании «Триазавирин» и его аналогов, нужно отметить, что при большинстве вирусных инфекций уже на ранней стадии процесса происходит усиление генерирования активных форм кислорода³. Исходя изложенного естественно предположить, что в этих условиях могут происходить реакции окисления S-метильной группы «Триазавирин», свойственные, например, для SH-содержащей аминокислоты метионина при окислительном стрессе.

В настоящем сообщении приводятся данные о постановке модельных экспериментов с препаратом «Триазавирин» - изучение окисления S-метильной группы и поведения продуктов окисления под действием S-нуклеофилов. Такой подход позволяет, с одной стороны, предсказать течение химических реакций, сопутствующих поведению препарата в организме, а с другой стороны, путем синтеза соответствующих соединений смоделировать процесс образования ковалентных связей азоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с S-фрагментами ключевых белков как клетки, так и вируса.

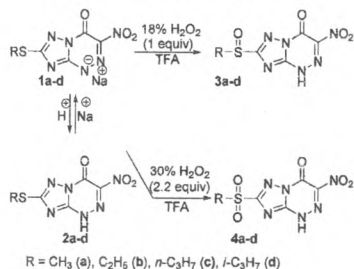


Схема 1

Редокс-превращения «Триазавирин» и его производных. Первым аспектом работы стал синтез модельных соединений - окисление сульфгидрильной группы в молекулах натриевых солей 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-онов 1a-d или сопряженных с ними N-H кислот 2a-d, включающее образование гетероциклических сульфоксидов 3a-d и сульфонов 4a-d. При обработке соединений

1a-d или 2a-d эквимольным количеством 18% пероксида водорода в трифторуксусной кислоте получены сульфоксиды 3a-d (схема 1).

Дальнейшее окисление до соответствующих сульфонов 4a-d с выходами 62-71% осуществлено постепенным прибавлением избытка 2,2 эквивалента 30% H₂O₂ к суспензии 2-алкилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с]триазинов 1a-d в трифторуксусной кислоте при комнатной температуре.

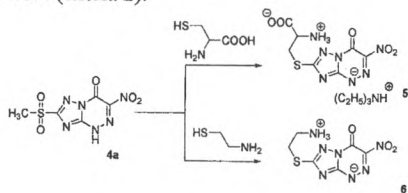
Представленные реакции моделируют возможные метаболические превращения «Триазавирин» и его производных под действием активных форм кислорода, включая H₂O₂.

Нуклеофильное замещение метилсульфонильной группы. Известно, что алкилсульфонильные фрагменты восприимчивы к реакциям замещения при взаимодействии с нуклеофилами⁴. Что касается поведения нитрогруппы в «Триазавирине», то хорошо известна склонность NO₂-группы, связанной с ароматическим (гетероароматическим) циклом к замещению под действием нуклеофилов⁵.

Таким образом, в структуре 2-алкилсульфонил-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-онов 4a-d присутствуют две группировки, склонные к нуклеофильному вытеснению. Эта ситуация представляет интерес для исследования сравнительной реакционной способности легко уходящих групп - CH₃SO₂- в 1,2,4-триазольном и NO₂- в 1,2,4-триазиновом циклах в соединениях 4a-d, а также как модель поведения «Триазавирин» в организме. В качестве нуклеофильных реагентов в настоящей работе использовались S-нуклеофилы (цистеин и цистеамин), которые можно рассматривать как модели фрагментов белков, содержащих цистеиновый фрагмент.

Замещение сульфонильного фрагмента в 2-метилсульфонил-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазине 4a под действием, как цистеина, так и цистеамина, происходит при кипячении в сухом метаноле в присутствии триэтиламина в течение нескольких дней с образованием

соединений 5 и 6 – продуктов замещения метилсульфонильной группы с выходами 41-46% (схема 2).



Данные ЯМР, ИК-спектроскопии и элементного анализа для соединений 5,6 соответствуют приписываемым структурам.

Описанное замещение алкилсульфонильной группы в соединении 4а, является аргументами в пользу предположения о возможном участии этого фрагмента в метаболических превращениях «Триазавирина».

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C получены на приборе Bruker DRX-400 (400 МГц для ^1H и 100 МГц для ^{13}C) в DMSO-d_6 и D_2O , химические сдвиги приведены в δ -шкале относительно внутреннего стандарта для спектров ^1H ЯМР – ТМС. Элементные анализы (С, Н, N) были проведены на анализаторе «Perkin Elmer 2400-II CHNS/O». ИК спектры ($4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$) полученных соединений записаны на спектрометре «Perkin Elmer Spectrum One B FTIR» в тонком слое образца (DRA). Контроль за ходом реакций и чистотой синтезированных соединений осуществляли с помощью ТСХ на пластинках Sorbfil (фирма ЗАО «Сорбполимер») в системах этилацетат и бутанол-уксусная кислота-вода 4:1:1.

Общая методика 1 получения 2-алкилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-онов (3а-д). К суспензии 0.01 моль натриевой соли 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она (1) в 10 мл трифторуксусной кислоты при перемешивании добавляют 1.78 мл (1 экв) 18 % перекиси водорода. Реакционную массу перемешивают при комнатной

температуре три часа, осадок отфильтровывают и кристаллизуют из изопропанола.

2-Метилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (3а) был получен из соединения 1а с использованием общей методики 1 в виде бежевых кристаллов, выход 70 %, mp 256 °С, ^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): 9.84 (1H, уш.с., NH), 3.05 (3H, с, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 100 MHz): 169.09 (C_2), 157.32 (C_{3a}), 144.05 (C_7), 143.57 (C_6), 25.58 (CH_3SO); IR ($\text{v}/\text{см}^{-1}$): 1750 (C=O); 1036 (-SO-); 1553,1340 (NO_2); Элемент. анализ $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$, вычислено %: С - 24.59, Н - 1.65, N - 34.42, найдено, %: С - 24.62, Н - 1.43, N - 34.28.

2-Этилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (3б)

был получен из соединения 1б с использованием общей методики 1 в виде бежевых кристаллов, выход 74 %, mp 227 °С, ^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): 11.16 (1H, уш.с., NH), 3.36-3.16 (2H, м, CH_2), 1.24 (3H, т, $J = 7.4$, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 100 MHz): 168.34 (C_2), 157.58 (C_{3a}), 144.36 (C_7), 143.87 (C_6), 46.64 (CH_2SO), 6.15 (CH_3); IR ($\text{v}/\text{см}^{-1}$): 1748 (C=O); 1022 (-SO-); 1552, 1336 (NO_2); Элемент анализ $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$, вычислено %: С - 27.91, Н - 2.34, N - 32.55, найдено, %: С - 27.87, Н - 2.27, N - 32.31.

2-Пропилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (3с)

был получен из соединения 1с с использованием общей методики 1 в виде бежевых кристаллов, выход 72 %, mp 222 °С, ^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): 8.41 (1H, уш.с., NH), 3.29-3.18 (2H, м, SOCH_2), 1.78-1.55 (2H, м, CH_2), 1.01 (3H, т, $J = 7.4$, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 100 MHz): 168.19 (C_2), 157.87 (C_{3a}), 144.19 (C_7), 143.46 (C_6), 54.15 (CH_2SO), 15.21 (CH_2), 12.94 (CH_3); IR ($\text{v}/\text{см}^{-1}$): 1748 (C=O); 1013 (-SO-); 1556, 1336 (NO_2); Элементный анализ $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$, вычислено %: С - 30.88, Н - 2.96, N - 30.87, найдено, %: С - 30.82, Н - 3.12, N - 30.77.

2-изо-1-Пропилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (3д) был получен из соединения 1д с использованием общей методики 1 в виде бежевых кристаллов, выход 77 %, mp 239 °С, ^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): 7.60 (1H,

уш.с., NH), 3.49-3.38 (1H, м, CH), 1.27 (6H, дд, $J = 6.8$, 2CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 167.79 (C₂), 157.42 (C_{3a}), 144.33 (C₇), 143.86 (C₆), 53.07 (CHSO), 15.92 (CH₃), 14.59 (CH₃); IR ($\nu/\text{см}^{-1}$): 1752 (C=O); 992(-SO₂-); 1555, 1342 (NO₂); Элементный анализ C₇H₈N₆O₄S, вычислено %: C - 30.88, H - 2.96, N - 30.87, найдено, %: C - 31.07, H - 2.95, N - 30.89.

Общая методика 2 получения 2-алкилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-онов (**4a-d**). К суспензии 0.01 моль натриевой соли 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она (**1**) в 14 мл трифторуксусной кислоты при перемешивании по каплям добавляют 4 мл (2 экв) 30 % перекиси водорода так, чтобы температура не превышала 80 °С. Далее реакционную массу перемешивают при комнатной температуре еще три часа, осадок отфильтровывают и кристаллизуют из *изо*-пропанола.

2-Метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (4a) был получен из соединения **1a** с использованием общей методики 2 в виде бежевых кристаллов, выход 66 %, mp 275 °С, ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 7.57 (1H, уш.с., NH), 3.41 (3H, с, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 163.86 (C₂), 158.41 (C_{3a}), 144.69 (C₇), 143.64 (C₆), 41.84 (CH₃SO₂); IR ($\nu/\text{см}^{-1}$): 1759 (C=O); 1347, 1138 (-SO₂-); 1570, 1323 (NO₂); Элементный анализ C₅H₄N₆O₅S, вычислено %: C - 23.08, H - 1.55, N - 32.30, найдено, %: C - 23.21, H - 1.31, N - 32.33.

2-Этилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (4b) был получен из соединения **1b** с использованием общей методики 2 в виде бежевых кристаллов, выход 64 %, mp 259 °С, ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 9.71 (1H, уш.с., NH), 3.52 (2H, кв., $J = 7.4$, CH₂), 1.33 (3H, т, $J = 7.4$, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 162.82 (C₂), 158.93 (C_{3a}), 145.06 (C₇), 144.02 (C₆), 48.54 (CH₂SO₂), 7.25 (CH₃); IR ($\nu/\text{см}^{-1}$): 1759 (C=O); 1311, 1140 (-SO₂-); 1557, 1332 (NO₂); Элементный анализ C₆H₆N₆O₅S, вычислено %: C - 26.28, H - 2.21, N - 30.65, найдено, %: C - 26.44, H - 2.20, N - 30.43.

2-Пропилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (4c) был получен из соединения **1c** с использованием общей методики 2 в виде бежевых кристаллов, выход 71 %, mp 264 °С, ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 11.98 (1H, уш.с., NH), 3.53 (2H, т, $J = 7.6$, SO₂CH₂), 1.76-1.67 (2H, м, CH₂), 0.98 (3H, т, $J = 7.4$, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 163.22 (C₂), 158.44 (C_{3a}), 144.91 (C₇), 143.99 (C₆), 55.35 (CH₂SO₂), 16.20 (CH₂), 12.94 (CH₃); IR ($\nu/\text{см}^{-1}$): 1748 (C=O); 1293, 1139 (-SO₂-); 1556, 1326 (NO₂); Элементный анализ C₇H₈N₆O₅S, вычислено %: C - 29.17, H - 2.80, N - 29.16, найдено, %: C - 29.01, H - 2.88, N - 29.24.

2-изо-Пропилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (4d) был получен из соединения **1d** с использованием общей методики 3 в виде бежевых кристаллов, выход 62 %, mp 282 °С, ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 8.27 (1H, уш.с., NH), 3.73-3.63 (1H, м, CH), 1.35 (6H, д, $J = 6.8$, 2CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 161.91 (C₂), 158.80 (C_{3a}), 144.98 (C₇), 144.02 (C₆), 54.30 (CHSO₂), 15.02 (2CH₃); IR ($\nu/\text{см}^{-1}$): 1749 (C=O); 1311, 1135 (-SO₂-); 1556, 1326 (NO₂); Элементный анализ C₇H₈N₆O₅S, вычислено %: C - 29.17, H - 2.80, N - 29.16, найдено, %: C - 29.11, H - 2.69, N - 29.00.

Общая методика 3 нуклеофильного замещения в 2-метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-оне. К суспензии 0.001 моль цистеина (или цистеамина) в 20 мл метанола прибавляют триэтиламин и перемешивают в атмосфере аргона в течение пяти минут, затем в реакционную массу вносят эквивалент 2-алкилсульфонил-триазолотриазина и кипятят. Окончание реакции определяют по ТСХ в системе буганол-уксусная кислота-вода 4:1:1, после чего реакционную массу упаривают досуха. Полученный осадок промывают *изо*-пропиловым спиртом и очищают от примесей.

Триэтиламмониевую соль (2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазина гидрат (5) получают с использованием общей методики 3 и 3 экв. триэтиламина. Продукт кристаллизуют из водного этанола

в виде ярко-желтых кристаллов, выход 46 %, t_p 158 °C, 1H NMR (D_2O , 400 MHz): 4.27 (1H, дд, $J = 7.5, 3.8$, CHN), 3.98 (1H, дд, $J = 15.2, 3.8$, H_a в SCH_2), 3.66 (1H, дд, $J = 15.2, 7.5$, H_b в SCH_2), 3.21 (6H, кв., $J = 7.28, 3CH_2$), 1.29 (9H, т, $J = 7.28, 3CH_3$); ^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz): 172.02 (COO⁻), 166.09 (C_2), 159.16 (C_{3a}), 144.55 (C_7), 143.06 (C_6), 54.47 (CHN), 46.71 ($3CH_2$), 31.67 (SCH_2), 8.27 ($3CH_3$); IR (ν/cm^{-1}): 1682, 1615 (C=O); 1504, 1361 (NO_2); Элементный анализ $C_{13}H_{22}N_8O_5S \cdot H_2O$, вычислено %: C - 37.10, H - 5.71, N - 26.63, найдено, %: C - 36.96, H - 5.56, N - 26.72.

2-(2'-Амино-этилгио)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-c]-1,2,4-триазин гидрат (6) получают с использованием общей методики 3 и 2 экв. триэтиламина. Продукт кристаллизуют из водного метанола в виде ярко-желтых кристаллов, выход 41 %, t_p 285 °C, 1H NMR (D_2O , 400 MHz): 3.58 (2H, т, $J = 7.03, NCH_2$), 3.49 (2H, т, $J = 7.03, SCH_2$); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 163.95 (C_2), 160.12 (C_{3a}), 144.77 (C_7), 142.94 (C_6), 38.69 (CH_2N), 27.87 (SCH_2); IR

(ν/cm^{-1}): 1690 (C=O); 1514, 1371 (NO_2); 3521 (broadened) ($-NH_3^+$); Элементный анализ $C_6H_7N_7O_3S \cdot H_2O$, вычислено %: C - 26.18, H - 3.27, N - 35.64, найдено, %: C - 25.91, H - 2.98, N - 35.57.

Библиографический список

1. V. L. Rusinov, E. N. Ulomskii, O. N. Chupakhin, V. N. Charushin, *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2008**, *57*, 985.
2. I. Karpenko, S. Deev, O. Kiselev, V. Charushin, V. Rusinov, E. Ulomsky, E. Deeva, D. Yanvarev, A. Ivanov, O. Smirnova, S. Kochetkov, O. Chupakhin, M. Kukhanova, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2010**, *54*, 2017.
3. A. Denicola, R. Radi, *Toxicology*, **2005**, *208*, 273.
4. L. Jinglin, D. Qun, W. Zhonglin, Zh. Hengbin, B. Xu, *J. Comb. Chem.*, **2005**, *7*, 627.
5. V. L. Rusinov, E. N. Ulomskii, O. N. Chupakhin, A. Yu. Petrov, E. A. Sharonov, *Chem. Het. Comp.*, **1989**, *25*, 209.