

*Recommended by Doctor of Chemistry, professor L.A.Shemchuk*

UDC 547.857.4.057.03/.04-026.8

## THE SYNTHESIS, PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF 8-AMINO-7-(2-HYDROXY-2-PHENYLETHYL)-3-METHYLYXANTHINES

M.I.Romanenko, D.G.Ivanchenko, M.V.Nazarenko, M.V.Diachkov, O.M.Kamyshny, N.M.Polishchuk

Zaporizhzhia State Medical University

*Key words: xanthine; organic synthesis; NMR-spectroscopy; antibacterial, antifungal agents*

*The work is devoted to development of the method for the synthesis of 8-amino-7-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-3-methylxanthines and the study of their physicochemical and biological properties. Purine derivatives have long been used as antiviral agents (acyclovir, ganciclovir, etc.) in medical practice, and further research to find new antimicrobial and antiviral agents among purine derivatives are justified and promising. Reactions of 8-bromo-7-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-3-methylxanthine with the primary and secondary amines proceed when boiling in the aqueous dioxane medium with formation of the corresponding 8-amino derivatives. The structure of the compounds synthesized has been confirmed by the results of elemental analysis and the data of <sup>1</sup>H NMR-spectrometry. Proton signals of the uracil moiety of the molecule in the spectra of all compounds are recorded as two singlets of the corresponding intensity in the range of 10.98-10.54 ppm (NH) and 3.38-3.26 ppm (N<sup>3</sup>CH<sub>3</sub>). Protons of the substituent in position 7 form several groups of signals with the corresponding intensity. Aromatic proton signals are recorded as multiplets in the range of 7.46-7.18 ppm. The proton signal of the secondary alcohol group is fixed in the form of a doublet at 5.78-5.45 ppm. Intensity, shape and location of other proton signals fully correspond to the structure of the compounds synthesized. For the initial screening study of the new substances synthesized the reference testing cultures of both gram-positive and gram-negative bacteria and fungi, which belong to clinically significant groups of causative agents of infectious diseases that are different by their morphophysiological properties, have been used. 7-(2-Hydroxy-2-phenylethyl)-8-(4-methylpiperidine-1-yl)-3-methylxanthine has exhibited the antimicrobial and antifungal activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, and it is higher than that of the reference drugs – ampicillin and nistatine. The regularities in the «chemical structure – biological activity» relationship have been determined.*

It is well known that the most promising direction for creation of new synthetic drugs is the structural modification of the known drugs of the natural origin. The xanthine derivatives play a special part in this regard since a great number of effective drugs (diprophyllinum, etofylline, theofibrate, trental, etc.) has been created on the basis of 1,3-dimethylxanthine (theophylline), and 3,7-dimethylxanthine (theobromine) [3]. Recent studies indicate that 7,8-disubstituted xanthines reveal a wide range of the pharmacological activity [2, 5-10], therefore, further synthetic and biological studies in this series of heterocyclic compounds are well justified.

The aim of our work was the synthesis of xanthine derivatives previously undescribed and the study of their biological action.

### Materials and Methods

The melting point was determined by the open capillary method on a PTP-M device (a device for determining the melting temperature of solid substances, Russia). Elemental analysis was performed on an Elementar Vario L cube device (Germany), The PMR-spectra were taken on a Bruker SF-400 spectrometer (Germany) (the working frequency – 400 MHz, the solvent – dimethylsulfoxide (DMSO), the internal standard – tetramethylsilane). The data of elemental analysis corresponded to the calculated ones.

The analytical data of the compounds synthesized are given in Tab. 1, 2.

The assessment of the antimicrobial and antifungal activity was carried out using the standard test strains of microorganisms obtained in the bacteriological laboratory of the SI “Zaporizhzhia Regional Laboratory Centre of the State Sanitary and Epidemiological Service of Ukraine”. Such strains as *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 885-653) were used in our studies. The sensitivity of microorganisms to the new promising antimicrobial compounds synthesized was determined according to the methodical recommendations [1]. To incubate bacteria the Mueller-Hinton broth and agar (pH 7.2-7.4) were used, and for fungi the Sabouraud's medium (pH 6.0-6.8) was applied.

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined. Dimethylsulfoxide (DMSO) was used as a solvent for the compounds in our studies, the initial solutions were adjusted to the concentration of 1 mg/ml. Additionally, monitoring of nutrient media and the solvent was performed using conventional methods. As the reference drugs ampicillin (PJSC “Kyivmedpreparat”, Ukraine) and nistatine (PJSC SIC “Borshchahivskiy CPP”, Ukraine) were used.

Table 1

The values of the chemical shift in PMR-spectra of 8-amino-7-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-3-methylxanthines

Compound	$\delta$ -scale, ppm							
	N <sup>1</sup> H (c, 1H)	CH <sub>arom</sub>	C <sup>8</sup> NH	OH (d, 1H)	OCH (m, 1H)	N <sup>7</sup> CH <sub>2</sub> (m, 2H)	N <sup>3</sup> CH <sub>3</sub> (s, 3H)	Other signals
1	11.40	7.38 (m, 5H)	–	5.92	5.11	4.40-4.15	3.23	–
2	10.66	7.42 (d, 2H); 7.36 (t, 2H); 7.29 (t, 1H)	6,52 (d, 1H)	5.51	4.94	4.17-4.12	3.30	1.94-1.59 (m, 5H); 1.33-1.29 (m, 5H); 3.61 (m, 1H)
3	10.66	7.44-7.22 (m, 10 H)	6,98 (t, 1H)	5.72	4.94	4.17-4.05	3.26	4.53 (t, 2H)
4	10.73	7.46 (d, 2H); 7.38 (m, 3H)	7,29 (t, 1H)	5.72	4.96	4.14-4.10	3.32	7.63 (s, 1H); 6.43 (t, 1H); 6.36 (d, 1H); 4.54 (t, 2H)
5	10.60	7.40-7.21 (m, 5H)	6,73 (t, 1H)	5.78	4.92	4.20-3.93	3.30	3.60 (m, 4H); 3.38 (m, 2H); 2.41 (m, 6H)
6	10.61	7.44-7.27 (m, 5H)	6,74 (t, 1H)	5.69	4.92	4.12-4.03	3.30	3.60 (m, 4H); 3.37 (m, 2H); 2.34 (m, 6H); 1.69 (m, 2H)
7	10.87	7.38-7.35 (m, 5H)	–	5.67	5.06 (t, 1H)	4.19 (d, 2H)	3.32	2.96 (s, 6H)
8	10.90	7.36-7.26 (m, 5H)	–	5.67	5.12	4.12-4.09	3.32	3.24 (qv, 4H); 1.08 (t, 6H)
9	10.88	7.36-7.23 (m, 10H)	–	5.75	5.09	4.65 (d, 1H); 4.46 (d, 1H)	3.32	4.14 (s, 2H); 2.87 (s, 3H)
10	10.65	7.36-7.23 (m, 5H)	–	5.65	4.87	4.26 (d, 2H)	3.28	3.62 (t, 2H); 3.47 (t, 2H); 1.85 (m, 4H)
11	10.95	7.33-7.22 (m, 5H)	–	5.68	5.08	4.15-4.01	3.32	3.19 (m, 2H); 2.94 (m, 2H); 1.53 (m, 6H)
12	10.97	7.37-7.18 (m, 5H)	–	5.71	5.11	4.12-4.03	3.30	3.65 (d, 1H); 3.18 (d, 1H); 2.80 (m, 2H); 1.70-1.09 (m, 5H); 0.93 (d, 3H)
13	10.57	7.32-7.22 (m, 5H)	–	5.59	4.98	4.20-4.13	3.30	3.49 (m, 4H); 1.75 (m, 4H); 1.59 (m, 4H)
14	10.98	7.39-7.20 (m, 5H)	–	5.72	5.13	4.17-4.10	3.30	3.65 (m, 4H); 3.29 (m, 2H); 2.95 (m, 2H)
15	10.92	7.30 (m, 5H)	–	5.69	5.12	4.18-4.05	3.30	3.28 (m, 2H); 2.98 (m, 2H); 2.39 (m, 4H); 2.20 (s, 3H)
16	10.54	7.42-7.18 (m, 5H)	–	5.45	5.22	4.15-4.0	3.38 (m, 5H)+ NCH <sub>2</sub>	3.07 (m, 2H); 2.45 (m, 4H); 2.40 (qv, 2H); 1.08 (t, 3H)

## Results and Discussion

8-Bromo-7-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-3-methylxanthine (1) previously synthesized [4] by the interaction of 8-bromo-3-methylxanthine with phenyloxirane was selected as a starting compound. The reactions of bromoxanthine 1 with the primary and secondary amines were studied. It has been found that regardless of the amine structure boiling of the synthons specified in the aqueous dioxane medium leads to formation of the corresponding 8-amino derivatives 2-16 (Scheme). The compounds obtained are white crystalline substances, insoluble in water and soluble in hot ethanol, propanol-2, dioxane-1,4, dimethylformamide (DMF), DMSO. Compounds 5, 6, 15, 16 containing the basic nitrogen atoms are readily soluble in dilute acids, and this fact can be used in further studies.

The structure of the compounds synthesized has been proven on the basis of the data of PMR-spectroscopy (Tab. 1). Proton signals of the uracil moiety of the mole-

cule in the spectra of all compounds are recorded as two singlets of the corresponding intensity in the range of 10.98-10.54 ppm (NH) and 3.38-3.26 ppm (N<sup>3</sup>CH<sub>3</sub>). Protons of the substituent in position 7 form several groups of signals with the corresponding intensity. Aromatic proton signals are recorded as multiplets in the range of 7.46-7.18 ppm. The proton signal of the secondary alcohol group is fixed in the form of a doublet at 5.78-5.45 ppm. The presence of the chiral centre conditions multiplicity of signals of the methylene and methine protons of the substituent, they are fixed at 5.22-4.87 ppm (CHO) and 4.18-3.93 ppm (N<sup>7</sup>CH<sub>2</sub>). The exception is 8-dimethylaminoxanthine 7, in its spectrum the methylene and methine protons are registered as a classical doublet and triplet, respectively. In the spectrum of 8-N-methylbenzylamino derivative 9 the methylene protons of the substituent in position 7 form two doublets at 4.65 ppm (1H) and 4.46 ppm (1H). The methylene protons of 8-N-pyrrolidiniumoxanthine 10 are registered as a doublet at

Table 2

Table 3

The physicochemical characteristics of the compounds synthesized (2-8)

Compound	M. p., °C	The empirical formula	Yield, %
2	259	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	51.8
3	220-221	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	64.1
4	196-197	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	34.6
5	205-206	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	43.9
6	200-201	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	51.1
7	221-222	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	69.6
8	203-204	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	48.0
9	206-207	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	32.5
10	239-240	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	28.8
11	215	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	65.0
12	217-218	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	63.1
13	209-210	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	50.0
14	207-208	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	40.5
15	229-230	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	47.3
16	212-213	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	45.0

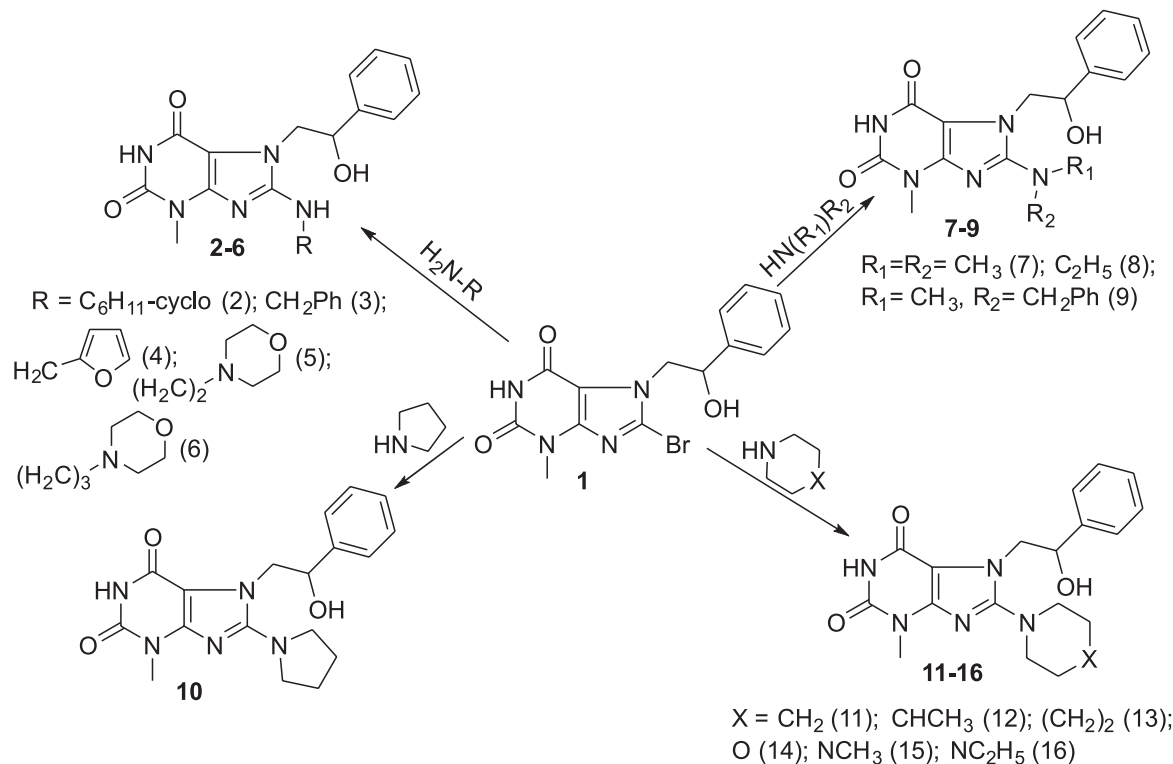
The biological activity of the compounds synthesized

Compound	MIC, µg/ml			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
3	100	50	100	100
5	100	200	100	100
6	100	100	100	25
9	200	200	100	100
10	200	25	100	50
11	100	400	100	100
12	100	6.25	50	25
13	100	200	100	100
14	100	200	100	100
15	100	100	50	50
16	100	100	100	100
Ampicillin	12.5	50	25	–
Nistatine	200	100	100	50

4.26 ppm (2H). In the spectra of aminoxanthine **2-6** the protons of the NH-group in position 8 are clearly recorded in a weak field at 6.74-6.52 ppm (1H) as triplets or a doublet in the case of the cyclohexylamino substituent **2**. Intensity, shape and location of other proton signals of the amine residue in position 8 fully correspond to their structure.

The analysis of the data concerning the study of the antimicrobial and antifungal action of the compounds under research (Tab. 3) shows that the amino alcohols

synthesized exhibit a moderate inhibitory action against the strains studied. It should be noted that 8-(4-methylpiperidine-1-yl)xanthine **12** shows the high activity against *S. aureus* and *C. Albicans*, whereas unsubstituted piperidinoxanthine **11** does not almost show any activity. Extension of the heterocyclic ring (**13**), introduction of atoms of oxygen (**14**) or nitrogen (**15, 16**) does not lead to increase in the antimicrobial or antifungal activity. Only N-methylpiperazine xanthine **15** reveals a marked inhibitory effect on the growth of *Ps. aeruginosa* and



*C. albicans* in the concentration of 50 µg/ml. 8-Pyrrolidinium xanthine **10** (25 µg/ml) also has the high inhibitory activity against *S. aureus*. In addition to the most active compound **12**, morpholinopropylaminoxanthine **6** (25 µg/ml) exhibits the high antifungal activity. Reduction of the carbon chain by one methylene group (**5**), or a direct bond of the morpholine core with a carbon atom in position 8 (**14**) lead to a sharp decrease in the antifungal activity.

The above facts clearly demonstrate reasonability and prospects for further search of antimicrobial and antifungal agents in the series of xanthines, especially among their 8-heteryl substituents. For final conclusions it is necessary to significantly expand both the

spectrum of pathogenic microorganisms, and the number of the compounds synthesized.

#### CONCLUSIONS

1. The simple laboratory method for the synthesis of 8-amino-7-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-3-methylxanthines – potential biologically active compounds and the initial synthons has been developed for further structural modification of the xanthine molecule.

2. The PMR-spectroscopic studies of the compounds synthesized have been conducted, and their structure has been confirmed.

3. The activity of the substances obtained against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* has been studied.

#### REFERENCES

1. Волянський Ю.Л., Гриценко І.С., Широбоков В.П. та ін. Вивчення специфічної активності антимікробних лікарських засобів: Метод. рекомендації. – К.: ДФЦ МОЗ України, 2004. – 38 с.
2. Киреев И.В. // Вісник Сумського державного університету. Серія Медицина. – 2009. – №1. – С. 22-29.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: ООО «Издательство Новая волна», 2012. – 1216 с.
4. Прийменко Б.А., Романенко Н.И., Гармаш С.Н. и др. // Укр. хим. журн. – 1985. – Т. 51, №6. – С. 660-663.
5. Alafeefy A.M., Alqasoumi S.I., Abdel Hamid S.G. et al. // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. – 2014. – Vol. 29, №3. – P. 443-448.
6. Aleksandrova K.V., Levich S.V., Belenichev I.F., Shkoda A.S. // Intern. J. of Pharmacy. – 2015. – №5 (17). – P. 1-4.
7. Belenichev I.F., Aleksandrova K.V., Nosach S.G. et al. // Elixir Pharmacy. – 2014. – Vol. 76. – P. 28286-28292.
8. Hayallah A.M., Talhouni A.A., Alim A.A.M.A. // Arch. Pharm. Res. – 2012. – Vol. 35, №8. – P. 1355-1368.
9. Ran Y., Pei H., Shao M., Chen L. // Chem. Biol. Drug Des. – 2016. – Vol. 87, №2. – P. 290-295.
10. Voynikova Yu., Valchevab V., Momekova G. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2014. – Vol. 24, №14. – P. 3043-3045.

#### СИНТЕЗ, ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ 8-АМІНО-7-(2-ГІДРОКСИ-2-ФЕНІЛЕТИЛ)-3-МЕТИЛКСАНТИНІВ

**М.І.Романенко, Д.Г.Іванченко, М.В.Назаренко, М.В.Дячков, О.М.Камишний, Н.М.Поліщук**

**Ключові слова:** ксантин; органічний синтез; ПМР-спектроскопія; антибактеріальні, протигрибкові засоби

Робота присвячена розробці методики синтезу не описаних у літературі 8-аміно-7-(2-гідрокси-2-фенілетил)-3-метилксантинів та вивченню їх фізико-хімічних і біологічних властивостей. Похідні пурину давно використовуються в медичній практиці в якості протівірусних засобів (ацикловір, ганцикловір та ін.), а отже подальші дослідження з пошуку нових антимікробних та протівірусних засобів у ряду пуринових похідних є виправданими та перспективними. Реакції 8-бромо-7-(2-гідрокси-2-фенілетил)-3-метилксантину з первинними та вторинними амінами перебігають при кип'ятінні в середовищі водного діоксану з утворенням відповідних 8-амінопохідних. Структура синтезованих сполук підтверджена результатами елементного аналізу і даними ЯМР <sup>1</sup>H-спектрометрії. У спектрах усіх сполук сигнали протонів урацілової частини молекули реєструються у вигляді двох синглетів відповідної інтенсивності в інтервалах 10,98-10,54 м.ч. (NH) та 3,38-3,26 м.ч. (N<sup>3</sup>CH<sub>3</sub>). Протони замісника в положенні 7 утворюють декілька груп сигналів відповідної інтенсивності. Сигнали ароматичних протонів реєструються у вигляді мультиплетів у діапазоні 7,46-7,18 м.ч. Сигнал протону вторинної спиртової групи фіксується у вигляді дублету в області 5,78-5,45 м.ч. Інтенсивність, форма та місцеположення інших сигналів протонів повністю відповідають будові синтезованих сполук. Для первинного скринінгового дослідження новосинтезованих речовин використовували еталонні тест-культури як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій та грибів, що належать до різних за морфологічними властивостями клінічно значущих груп збудників інфекційних захворювань. 7-(2-Гідрокси-2-фенілетил)-8-(4-метилпіперидин-1-іл)-3-метилксантин виявив значну антимікробну та протигрибкову активність, яка перевищила препарати порівняння ампіцилін та ністатин по відношенню до штамів *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans*. Були встановлені певні закономірності в ряду «хімічна структура – біологічна активність».



**СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 8-АМИНО-7-(2-ГИДРОКСИ-2-ФЕНИЛЭТИЛ)-3-МЕТИЛКСАНТИНОВ****Н.И.Романенко, Д.Г.Иванченко, М.В.Назаренко, М.В.Дячков, А.М.Камышный, Н.Н.Полищук****Ключевые слова:** *ксантин; органический синтез; ПМР-спектроскопия; антибактериальные, противогрибковые средства*

*Работа посвящена разработке методики синтеза неописанных в литературе 8-амино-7-(2-гидрокси-2-фенилэтил)-3-метилксантинов и изучению их физико-химических и биологических свойств. Производные пурина давно используются в медицинской практике в качестве противовирусных средств (ацикловир, ганцикловир и др.), а, следовательно, дальнейшие исследования по поиску новых противомикробных и противовирусных средств в ряду пуриновых производных оправданные и перспективные. Реакции 8-бром-7-(2-гидрокси-2-фенилэтил)-3-метилксантина с первичными и вторичными аминами протекают при кипячении в среде водного диоксана с образованием соответствующих 8-аминопроизводных. Структура синтезированных веществ подтверждена результатами элементного анализа и данными ЯМР <sup>1</sup>H-спектроскопии. В спектрах всех соединений сигналы протонов урациловой части молекулы регистрируются в виде двух синглетов соответствующей интенсивности в интервалах 10,98-10,54 м.д. (NH) и 3,38-3,26 м.д. (N<sup>3</sup>CH<sub>3</sub>). Протоны заместителя в положении 7 образуют несколько групп сигналов соответствующей интенсивности. Сигналы ароматических протонов регистрируются в виде мультиплетов в диапазоне 7,46-7,18 м.д. Сигнал протона вторичной спиртовой группы фиксируется в виде дублета в области 5,78-5,45 м.д. Интенсивность, форма и местоположение других сигналов протонов полностью отвечают структуре синтезированных соединений. Для первичного скринингового исследования новосинтезированных веществ использовались эталонные тест-культуры как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий и грибов, принадлежащих к разным по морфофизиологическим свойствам клинически значимых групп возбудителей инфекционных заболеваний. 7-(2-Гидрокси-2-фенилэтил)-8-(4-метилпиперидин-1-ил)-3-метилксантин показал значительную антимикробную и противогрибковую активность, которая превысила препараты сравнения ампициллин и нистатин по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Установлены определенные закономерности в ряду «химическая структура – биологическая активность».*