

«»

УДК:547.39

ОТКРЫТИЕ 4-НИТРОПИРАЗОЛИН-5-ОНОВ В КАЧЕСТВЕ НОВОГО ЛЕГКОДОСТУПНОГО СТРУКТУРНОГО КЛАССА ФУНГИЦИДОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

А.С. Будников^{1,2*}, Е.Р. Лопатьева¹, И.Б. Крылов^{1,2}, М.И. Шевченко¹, А.И. Иловайский^{1,2}, А.О. Терентьев^{1,2}

¹Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия; ²Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии,

Московская область, Россия

*Эл. почта: alsbudnikov@gmail.com

Статья поступила в редакцию 24.0.2022; принята к печати 02.12.2022

Разработка новых видов фунгицидов для сельского хозяйства и медицины необходима из-за повышения резистентности грибов к часто используемым соединениям. В качестве нового структурного класса фунгицидов нами были предложены 4-нитропиразолин-5-оны (нитропиразолон, НПЗ) и разработан первый масштабируемый и практически применимый метод синтеза НПЗ, позволяющий получать их в мультиграммовых количествах без необходимости в дальнейшей очистке. Синтезированные НПЗ показали высокую фунгицидную активность в отношении широкого спектра

фитопатогенных грибов (*Venturia inaequalis*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Bipolaris sorokiniana*, *Sclerotinia sclerotiorum*). По ингибированию роста мицелия они сравнимы или превосходят крезоксим-метил – широко применяемый и доступный фунгицид. Активность *in vitro* в отношении *S. aureus*, *C. albicans* и *A. niger* показала, что НПЗ перспективны против патогенов человека. Ключевыми для проявления их высокой фунгицидной активности являются ароматический заместитель у атома N1 и малые заместители, такие как метильные, в положениях C3 и C4 пиразолонового цикла.

Ключевые слова: нитрование, пиразолин-5-оны, фунгициды, защита растений, диоксид азота.

DISCOVERY OF NEW READILY AVAILABLE FUNGICIDES OF A NOVEL STRUCTURAL TYPE FOR CROP PROTECTION – 4-NITROPYRAZOLIN-5-ONES

A.S. Budnikov^{1,2*}, E.R. Lopat'eva¹, I.B. Krylov^{1,2}, M.I. Shevchenko¹, A.I. Ilovaisky^{1,2}, A.O. Terent'ev^{1,2}

¹N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ²All-Russian Research Institute for Phytopathology, Moscow, Russia

*E-mail: alsbudnikov@gmail.com

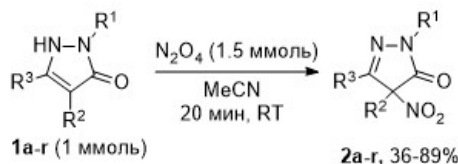
The development of new types of fungicides for agriculture and medicine is necessary because of the increase in fungal resistance to commonly used compounds. As a new structural class of fungicides, we have proposed 4-nitropyrzazolin-5-ones (nitropyrzazolones, NPZ), which express fungicidal activity against a wide range of phytopathogenic fungi (*Venturia inaequalis*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Bipolaris sorokiniana*, *Sclerotinia sclerotiorum*). Inhibition of mycelial growth with NPZ is comparable or superior to the activity of kresoxim-methyl, a widely used and commercially available fungicidal drug. *In vitro* activity against *S. aureus*, *C. albicans* and *A. niger* suggest that NPZ are promising candidates against human pathogens. It was found that the key factors for the manifestation of the high fungicidal activity of NPZ are an aromatic substituent at the N1 atom and small substituents, such as methyl substituents, at the C3 and C4 positions of the pyrazolone ring.

Keywords: nitration, pyrazolin-5-ones, fungicidal compounds, crop protection, nitrogen dioxide.

Фитопатогенные грибы представляют одну из основных угроз для растениеводства.¹ Подсчитано, что в 2006 г. микробными болезнями было поражено 16% посевов в мире, причем 70–80% этих потерь были вызваны грибами.² По другим оценкам, в 2012 г. грибковые патогены уничтожили более 30% всех продовольственных культур в мире.^{3,4} Грибковые поражения растений не только наносят значительный экономический ущерб, но и представляют опасность для здоровья человека.^{4,5} Примерами опасных токсинов, продуцируемых фитопатогенными грибами, являются алкалоиды спорыньи (высокотоксичные соединения, продуцируемые грибами рода *Claviceps*),^{6–10} афлатоксины (канцерогенные микотоксины, продуцируемые некоторыми грибами рода *Aspergillus*)^{6–9,11,12} и трихотецены (микотоксины, продуцируемые в основном видами *Fusarium*).^{6–9}

Фунгициды являются основными средствами борьбы с грибковыми заболеваниями из-за их относительно низкой стоимости, простоты использования и эффективности.¹³ Долгосрочное использование фунгицидов со схожими механизмами действия оказывает значительное селекционное давление на популяции патогенов и повышает риск развития резистентности к противогрибковым препаратам.^{14–18} Только четыре типа фунгицидов, среди них дитиокарбаматы, ингибиторы деметилирования, стробилурины и ингибиторы сукцинатдегидрогеназы, составляют примерно 76% мирового рынка фунгицидов¹⁹. Вызывает озабоченность и развитие перекрестной резистентности у патогенных штаммов грибов вследствие использования подобных соединений как в медицине, так и в сельском хозяйстве.^{20–22} Таким образом, открытие новых классов фунгицидов с новым механизмом действия является важной задачей как для медицины, так и для защиты растений.^{23–28}

Ранее²⁹ нитропиразолоны (НПЗ) были обнаружены как новый класс сильнодействующих фунгицидов, но практический подход к их синтезу не был предложен, что ограничивало их потенциал для защиты растений. Разработанный ранее метод не был эффективен для синтеза N1-замещенных нитропиразолонов, тогда как заместитель при N1 был необходим для проявления фунгицидной активности. Основными целями настоящего исследования были разработка универсального, атомно-эффективного и масштабируемого метода синтеза фунгицидных НПЗ и установление ключевых структурных закономерностей, ответственных за их высокую фунгицидную активность. Использование оксида азота (IV), являющегося массовым промежуточным продуктом производства удобрений при синтезе азотной кислоты,³⁰ делает предлагаемый способ перспективным для практического применения.



Примеры синтезированных соединений, выходы

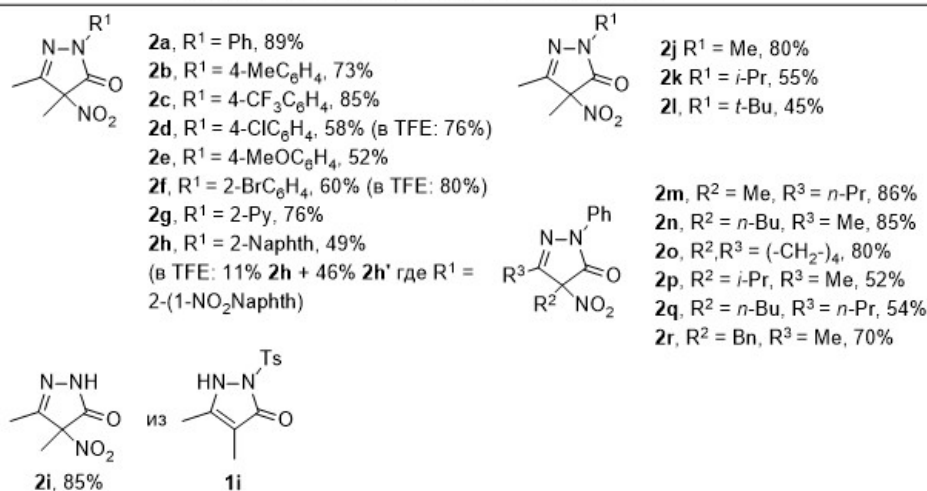


Рис. 1. Синтез нитропиразолонов 2a–г нитрованием пиразолин-5-онов 1a–г

Важной особенностью целевых НПЗ-фунгицидов является их структурная новизна. Наличие пиразолонового цикла и фрагмента *трет*-C(sp³)-NO₂ (необычное для известных нитросодержащих биоцидов) открывает новые перспективы в борьбе с резистентностью у фитопатогенных грибов. Уникальная структура, высокая активность, а также эффективность и экспериментальная простота предложенного в настоящей работе метода синтеза делают нитропиразолонны перспективными кандидатами на роль фунгицидов нового класса.

Разработан подход к селективному синтезу 4-нитропиразолин-5-онов с использованием диоксида азота в качестве нитрующего агента (Рис. 1).

Различные N-замещенные пиразолин-5-оны были превращены в 4-нитропиразолин-5-оны с выходами от умеренных до хороших. Разработанный метод совместим как с электронодефицитными, так и с электронно-избыточными арильными заместителями при атоме азота N1 (продукты 2a–h, выходы 49–89%). В некоторых случаях выходы были улучшены при проведении реакции в трифторэтанол (продукты 2d, 2f). Нитрование пиразолин-5-она 1h с 2-нафтильным заместителем в положении N1 в трифторэтанол приводит к снижению выхода мононитропродукта 2h и образованию динитропродукта 2h' с выходом 46%. Введение нитрогруппы в нафтильное кольцо в среде трифторэтанола свидетельствует о том, что кислая природа этого растворителя активирует N₂O₄ для электрофильного нитрования. Необычную реакционную способность проявил пиразолин-5-он 1i с тозилльным заместителем у N1: наблюдалось образование N-незамещенного 4-нитропиразолин-5-она 2i. N-Алкилзамещенные пиразолонны 1j–l превращаются в соответствующие нитропродукты 2j–l с выходами от умеренных до хороших (45–80%). N-Фенил-4-нитропиразолин-5-оны 2m–r были успешно синтезированы из пиразолонов с различными заместителями R² и R³. Нитрование протекает гладко даже при легко окисляемой бензильной группе в реакционном центре (продукт 2r). Умеренный выход 2r был получен в случае пиразолин-5-она, содержащего изопропилный заместитель в положении C4, что можно объяснить стерическими затруднениями при реакционном центре.

На рис. 2 показана практическая применимость разработанного метода синтеза нитропиразолона 2a в многограммовом масштабе.

Этот простой и практически безотходный метод позволяет получать большое количество целевого НПЗ за короткое время.

На втором этапе исследования синтезированные нитропродукты были испытаны на фунгицидную активность в концентрации 10 мкг/мл в отношении 6 фитопатогенных грибов из разных таксономических классов: *V.i.* - *Venturia inaequalis*, *R.s.* - *Rhizoctonia solani*, *F.o.* - *Fusarium oxysporum*, *F.m.* - *Fusarium moniliforme*, *B.s.* - *Bipolaris sorokiniana*, *S.s.* - *Sclerotinia sclerotiorum* (Табл. 1). В качестве эталонного соединения использовали коммерчески доступный фунгицид крезоксим-метил.

Как видно из таблицы, соединение 2d проявляет наибольшую активность в отношении фитопатогенных грибов. В целом нитропиразолонны с электронодефицитными ароматическими системами при N1 (2c, 2d, 2f) демонстрируют более высокую активность по сравнению с 4-нитропиразолин-5-онами с электронно-богатыми ароматическими заместителями при N1 (2b, 2e). Соединение 2g с 2-пиридильной группой не проявляет значительной фунгицидной активности. Нитропиразолонны 2i–j, имеющие атом водорода или алкильный заместитель в положении N1, заметно уступают по активности 4-нитропиразолин-5-онам, содержащим арильные заместители в положении N1 (2a–2h'), вероятно, из-за недостаточной липофильности.^{17,31} 1N-Фенилзамещенные нитропиразолонны 2m–q с R² и R³ больше Me значительно менее активны, чем нитропиразолон 2a, у которого R² = R³ = Me. 4-Нитропиразолин-5-оны 2a, 2c, 2d превосходят по активности широко используемый в сельском хозяйстве коммерчески доступный фунгицид крезоксим-метил.

Лидерные фунгицидные нитропиразолонны 2a и 2d были исследованы на стандартных тест-культурах грибов и бактерий, патогенных для человека (табл. 2). В качестве стандартных соединений использовали флуконазол, клотримазол и рифабутин.

Соединения 2a и 2d оказались неактивными в отношении грамотрицательных *E. coli*, но проявляли активность в отношении грамположительных *S. aureus*. Выявленная селективность фунгицидного действия нитропиразолонов 2a и 2d перспективна для предотвращения дисбактериоза

Табл. 1.

In vitro фунгицидная активность синтезированных нитросоединений.

№	Соединение	Ингибирование роста мицелия (%) при 10 мг/л					
		<i>V. i.</i>	<i>R. s.</i>	<i>F. o.</i>	<i>F. m.</i>	<i>B. s.</i>	<i>S. s.</i>
1	2a	100	83	76	68	95	68
2	2b	64	46	26	58	47	40
3	2c	78	57	80	80	91	35
4	2d	98	100	89	98	97	78
5	2e	24	89	17	30	35	1
6	2f	92	88	27	38	89	58
7	2g	11	41	11	15	30	10
8	2h	52	61	26	62	63	37
9	2h'	29	94	10	53	51	4
10	2i	14	30	14	21	29	7
11	2j	8	35	6	3	6	10
12	2k	4	35	6	0	6	10
13	2l	10	26	6	2	9	17
14	2m	62	63	50	64	75	17
15	2n	33	52	21	37	44	17
16	2o	71	45	46	66	72	58
17	2p	33	52	19	31	23	7
18	2q	22	56	25	29	40	6
19	2r	22	50	37	43	34	19
20	4a	18	44	17	36	59	3
21	6a	0	38	6	16	2	13
22	6b	16	30	12	19	30	2
23	2a'	80	100	76	69	91	26
24	Крезоксим-метил	89	100	69	59	53	47

Табл. 2.

Бактерицидная и фунгицидная активность синтезированных нитропиразолонов in vitro в отношении патогенов человека в сравнении с известными противогрибковыми соединениями (флуконазол, клотримазол) и антибиотиками (рифабутин).

№	Соединение	Минимальная концентрация ингибирования (мкг/мл)			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
1	2a	8	>256	2	4
2	2d	4	>256	1	16
3	флуконазол	>256	>256	4	8
4	клотримазол	4	>256	1	1
5	рифабутин	0.0019	8	-	-

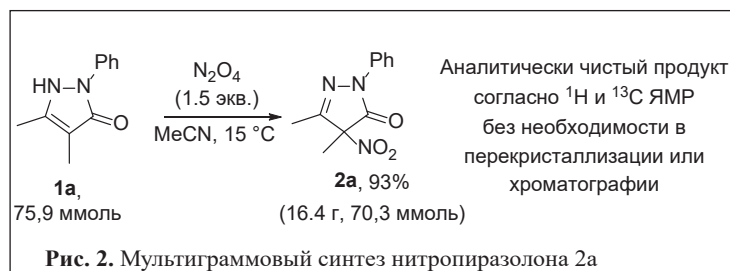


Рис. 2. Мультиграммовый синтез нитропиразолона 2a

при лечении грибковых заболеваний. Активность нитропиразолонов **2a,d** в отношении *C. albicans* и *A. niger* сравнима с активностью широко используемых противогрибковых препаратов флуконазола и клотримазола. Эти результаты показывают, что синтезированные нитропиразолоны представляют интерес не только для защиты растений, но и имеют потенциал для разработки противогрибковых препаратов.

Таким образом, разработан простой и масштабируемый метод синтеза фунгицидных нитропиразолонов, представляющих новый класс фунгицидов, по активности сравнимых или превосходящих коммерческие фунгициды. Определены ключевые структурные закономерности, ответственные за высокую фунгицидную активность. Помимо активности в отношении фитопатогенных грибов, синтезированные НПЗ также обладают высокой активностью в отношении патогенов человека (*S. aureus*, *C. albicans*, *A. niger*).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-73-20190.

Литература/References

1. Brauer VS, Rezende CP, Pessoni AM et. al. Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. *Biomolecules* 2019;9(10):521.
2. Oerke E-C. Crop losses to pests. *J Agric Sci.* 2006;144(1):31-43.
3. Fisher MC, Henk D.A, Briggs CJ et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 2012;484(7393):86-94.
4. Tleuova AB, Wielogorska E, Talluri VSSLP et al. Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture. *J Controlled Release.* 2020;326:468-481.
5. Strange RN, Scott PR. Plant disease: a threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol.* 2005;43(1):83-116.
6. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):497-516.
7. Richard J L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—an overview. *Int J Food Microbiol.* 2007;119(1–2):3-10.
8. Luo Y, Liu X, Li J. Updating techniques on controlling mycotoxins - a review. *Food Control.* 2018;89:123-32.
9. De Ruyc K, De Boevre M, Huybrechts I, De Saeger S. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: short review. *Mutat Res.* 2015;766:32-41.
10. Debegnach F, Patriarca S, Brera C, et al. Ergot alkaloids in wheat and rye derived products in Italy. *Foods.* 2019;8(5):150.
11. Ingenbleek L, Sulyok M, Adegboye A, et al. Regional Sub-Saharan Africa total diet study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria reveals the presence of 164 mycotoxins and other secondary metabolites in foods. *Toxins.* 2019;11(1):54.
12. Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banziger M, et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing Countries. *Environ Health Perspect.* 2006;114(12):1898-903.
13. Cooper J, Dobson H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Prot.* 2007;26(9):1337-48.
14. Lesemann SS, Schimpke S, Dunemann F, Deising HB. Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome b gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Eil. & Ev.) E.S. Salmon. *J Plant Dis Prot.* 2006;113(6):259-66.
15. Baibakova EV, Nefedjeva EE, Suska-Malawska M, Wilk M, Sevriukova GA, Zheltobriukhov VF. Modern fungicides: mechanisms of action, fungal resistance and phytotoxic effects. *Annu Res Rev Biol.* 2019:1-16.
16. Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA. The evolution of fungicide resistance. *Adv Applied Microbiol.* 2015; 90:29-92.
17. Zhang Y, Lorsbach BA, Casterter S, et al. Physicochemical property guidelines for modern agrochemicals. *Pest Manag Sci.* 2018;74:1979-91.
18. Ishii H, Hollomon DW, Eds. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens.* Tokyo: Springer Japan; 2015.
19. Jeschke P. Progress of modern agricultural chemistry and future prospects. *Pest Manag Sci.* 2016;72(3):433-55.
20. Myung K, Klittich CJR. Can agricultural fungicides accelerate the discovery of human antifungal drugs? *Drug Discov Today.* 2015;20:7-10.
21. Jampilek J. Potential of agricultural fungicides for antifungal drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(1):1-9.
22. Roilides E, Iosifidis E. Acquired resistance in fungi: how large is the problem? *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(7):790-1.
23. Blokhina SV, Sharapova AV, Ol'khovich MV, Doroshenko IA, Levshin IB, Perlovich GL. Synthesis and antifungal activity of new hybrids thiazolo[4,5-d]pyrimidines with (1H-1,2,4)triazole. *Bioorg Med Chem Lett.* 2021;40:127944.
24. Yang Y-D, He Y-H, Ma K-Y, et al. design and discovery of novel antifungal quinoline derivatives with acylhydrazide as a promising pharmacophore. *J Agric Food Chem.* 2021;69(30):8347-57.
25. Xia D, Cheng X, Liu X, et al. Discovery of novel pyrazole carboxylate derivatives containing thiazole as potential fungicides. *J Agric Food Chem.* 2021;69(30):8358-65.
26. Wang W, Li Z, Gao W, et al. Design, synthesis, and evaluation of novel isothiazole-purines as a pyruvate kinase-based fungicidal lead compound. *J Agric Food Chem.* 2021: acs.jafc.1c01651.
27. Long Z-Q, Yang L-L, Zhang J-R, et al. Fabrication of versatile pyrazole hydrazide derivatives bearing a 1,3,4-oxadiazole core as multipurpose agricultural chemicals against plant fungal, oomycete, and bacterial diseases. *J Agric Food Chem.* 2021;69(30):8380-93.
28. Obydenov KL, Kalinina TA, Galieva NA, Beryozkina TV, Zhang Y, Fan Z, Glukhareva TV, Bakulev VA. Synthesis, fungicidal activity, and molecular docking of 2-acylamino and 2-thioacylamino derivatives of 1 H-benzo[d]imidazoles as anti-tubulin agents. *J Agric Food Chem.* 2021;69(40):12048-62.
29. Krylov IB, Budnikov AS, Lopat'eva ER, Nikishin GI, Terent'ev AO. Mild nitration of pyrazolin-5-ones by a combination of Fe(NO₃)₃ and NaNO₂; discovery of a new readily available class of fungicides, 4-nitropyrazolin-5-ones. *Chem Eur J.* 2019;25(23):592233.
30. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 1st ed. John Wiley & Sons; 2000.
31. Dehne H-W, ed. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI: Proc 16th Int Reinhardtsbrunn Symp April 25-29 2010 Friedrichroda Germany.* Braunschweig: Spectrum Phytomedizin DPG; 2011.