

Т. Л. Карасева, Е. Б. Лихота, Я. Р. Кривенко, С. А. Семibrатьев,
В. И. Павловский

СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 7-БРОМ-5-(2'-ХЛОР)ФЕНИЛ-3-АРИЛАМИНО-1,2-ДИГИДРО-3H-1,4-БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА АППЕТИТ КРЫС

Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса;
e-mail: victor_pavlovsky@ukr.net

Синтезированы новые производные 7-бром-5-(2'-хлор)фенил-3-ариламино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепина (II – VIII). В ряду синтезированных соединений обнаружены вещества, которые в низких дозах (2,07 – 2,21 мкМ) оказывали существенное влияние на аппетит крыс, проявляя как орексигенное, так и анорексигенное действие. Обнаружено соединение VI, которое по анорексигенному действию не уступает гормону лептину, снижающему аппетит и потребление пищи. При сочетанном введении лептина с соединением III, проявляющим выраженный орексигенный эффект, отмечается снижение аппетита на 73 %.

Ключевые слова: синтез; 1,2-дигидро-1,4-бенздиазепин-2-он; аппетит; лептин.

Известно, что производные 3-амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов (БД) обладают анксиолитическими, противосудорожными, анорексигенными, орексигенными, анальгетическими и другими эффектами [1, 2]. Фармакологические свойства этих соединений обусловлены, главным образом, связыванием их с бенздиазепиновыми, холецистокениновыми, брадикининовыми рецепторами.

В последние годы [2, 3] в фармакологии БД, влияющих на аппетит, достигнуты значительные успехи. Известно, что многие производные 1,4-БД (диазепам, хлордиазепоксид, лоразепам, оксазепам, феназепам, нитразепам), являющиеся агонистами бенздиазепиновых рецепторов (БДР), увеличивают аппетит и количество потребляемой пищи и проявляют гиперфагический эффект как в эксперименте на животных, так и в клинике у пациентов [2]. Было высказано предположение, что орексигенный эффект БД опосредуется их связыванием с α_2/α_3 субъединицами одного из подтипов ГАМК_A рецептора [4 – 6]. Вероятным участком проявления БД гиперфагического эффекта является их связывание с бенздиазепиновыми рецепторами в парабрахиальном ядре каудального отдела ствола мозга, откуда информация о вкусе передается к вкусовой области таламуса [7]. Поведенческие исследования в эксперименте на животных убедительно показывают, что орексигенное действие бенздиазепинов связано с

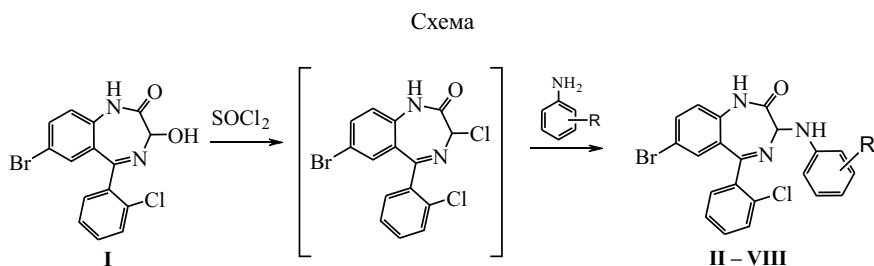
усилением положительной органолептической (гедонической) оценки вкуса и продуктов питания, что способствует повышению потребления пищи [8, 9].

Показано, что обратные агонисты БДР (PG-7142, Ro 15-4513) с высоким аффинитетом к центральным БДР проявляют выраженное анорексигенное действие [3, 9]. В некоторых работах [11] сообщается о синергическом взаимодействии между холецистокениновыми ССК_A рецепторами, ГАМК_A рецепторами и лептином в регуляции потребления пищи.

Производимый адипоцитами жировой ткани гормон лептин подавляет аппетит, усиливает чувство насыщения у позвоночных и человека [1, 2]. Показано, что лептин, введенный (интрацеребровентрикулярно или внутривентрикулярно) совместно с ССК, подавляет прием пищи и снижал массу тела у мышей и крыс.

Ранее нами в ряду 3-амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов обнаружены соединения, которые в зависимости от структуры повышают или снижают аппетит у крыс [10]. Показано, что орексигенный и анорексигенный эффекты данных веществ опосредованы их способностью связываться с холецистокениновыми ССК₁, ССК₂ рецепторами [10].

Целью данной работы является изучение влияния на аппетит крыс новых 7-бром-5-(2'-хлор)фенил-3-ариламино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов (II – VIII) по сравнению с лептином.



Соединения **II** – **VIII** получены обработкой соединения **I** тионихлоридом и последующей конденсацией с соответствующими ариламинами (схема).

Экспериментальная химическая часть

Чистоту соединений контролируют методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV 254 с элюентами хлороформ — ацетон — гептан, 1:1:3, проявление в УФ-свете при длине волны 254 нм.

Спектры ^1H ЯМР регистрировали на приборе “Bruker” 500 МГц, в DMSO-d_6 , внутренний стандарт тетраметилсилан (TMS), $T = 25^\circ\text{C}$.

Температуру плавления измеряли на приборе ПТП ТУ 25-11-1144–76.

7-Бром-5-(2'-хлорфенил)-3-(2-гидоксикарбонилфенил)амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-он (II). В круглодонную колбу объемом 100 мл помещают 1,84 г (0,005 моль) 3-гидрокси-7-бром-5-(2'-хлорфенил)-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-она (**I**) и прибавляют 15 мл хлористого тионила, реакционная масса слегка нагревается и приобретает желтый цвет, при этом наблюдается растворение осадка, выделение газообразных продуктов и выпадение осадка. Реакционную массу оставляют на 1 сут. Избыток хлористого тионила упаривают в ротационном испарителе досуха, к остатку прибавляют 20 мл абсолютного хлороформа и упаривают, операцию повторяют дважды. Очистку полученного продукта не производят; далее к полученному 3-хлорпроизводному в 20 мл того же растворителя прибавляют при перемешивании 1,37 г (0,01 моль) *o*-аминобензойной кислоты. Наблюдается легкий разогрев реакционной массы и постепенное растворение 3-хлор-7-бром-5-(2'-хлорфенил)-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-она и выпадение осадка. Реакционную массу оставляют на 1 сут. Отфильтровывают, осадок и маточный раствор промывают водой. Маточный раствор упаривают досуха. Полученный остаток и осадок перекристаллизовывают из этилового спирта. Выход бенздиазепинона (**II**) 2,18 г (90 %), $T_{\text{пл}}$ 260 – 261 $^\circ\text{C}$. Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3) δ , м.д.: карбоксильной группы 12,65 (с, 1H); амидной группы 11,21 (с, 1H); ароматические протоны 6,99 – 7,81 (м, 7H); иминный протон 6,82 – 6,79 (д, 1H, 3(NH)); 5,16 – 5,13 (д, 1H, C(3)H). Масс-спектр (m/z): $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{BrClN}_3\text{O}_3$. $[\text{M}]^+ 483$.

Аналогично получают соединения **III** – **VIII**.

7-Бром-5-(2'-хлорфенил)-3-(3-метоксикарбонилфенил)амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-он (III). Перекристаллизовывают из этилового спирта. Выход 85 %, $T_{\text{пл}}$ 254 – 255 $^\circ\text{C}$. Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: амидной группы 11,08 (с, 1H); ароматические протоны 6,97 – 7,83 (м, 7H); иминный протон 6,80 – 6,77 (д, 1H, 3(NH)); 5,13 – 5,10 (д, 1H, C(3)H). Масс-спектр (m/z): $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_3$. $[\text{M}]^+ 497$.

7-Бром-5-(2'-хлорфенил)-3-(4-метоксикарбонилфенил)амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-он (IV). Перекристаллизовывают из этилового спирта. Выход 84 %, $T_{\text{пл}}$ 259 $^\circ\text{C}$. Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3), δ ,

м.д.: амидной группы 11,08 (с, 1H); ароматические протоны 6,99 – 7,84 (м, 7H); иминный протон 6,80 – 6,77 (д, 1H, 3(NH)); 5,13 5,10 (д, 1H, C(3)H). Масс-спектр (m/z): $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_3$. $[\text{M}]^+ 497$.

7-Бром-5-(2'-хлорфенил)-3-(3-хлорфенил)амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-он (V). Перекристаллизовывают из этилового спирта. Выход 70 %, $T_{\text{пл}}$ 234 – 235 $^\circ\text{C}$.

Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: амидной группы 11,01 (с, 1H); ароматические протоны 7,01 – 7,88 (м, 7H); иминный протон 6,82 – 6,79 (д, 1H, 3(NH)); 5,16 – 5,13 (д, 1H, C(3)H). Масс-спектр (m/z): $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{BrCl}_2\text{N}_3\text{O}$. $[\text{M}]^+ 473$.

7-Бром-5-(2'-хлорфенил)-3-(2-хлорфенил)амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-он (VI). Перекристаллизовывают из этилового спирта. Выход 65 %, $T_{\text{пл}}$ 251 – 254 $^\circ\text{C}$. Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: карбоксильной группы 12,65 (с, 1H); амидной группы 11,21 (с, 1H); ароматические протоны 6,99 – 7,81 (м, 7H); иминный протон 6,82 – 6,79 (д, 1H, 3(NH)); 5,16 – 5,13 (д, 1H, C(3)H).

Масс-спектр (m/z): $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{BrCl}_2\text{N}_3\text{O}$. $[\text{M}]^+ 473$.

7-Бром-5-(2'-хлорфенил)-3-(*o*-метоксифенил)амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-он (VII). Перекристаллизовывают из смеси этилового спирта и толуола, 1:1. Выход 73 %, $T_{\text{пл}}$ 264 – 265 $^\circ\text{C}$.

Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3) δ , м.д.: карбоксильной группы 12,65 (с, 1H); амидной группы 11,21 (с, 1H); ароматические протоны 6,99 – 7,81 (м, 7H); иминный протон 6,82 – 6,79 (д, 1H, 3(NH)); 5,16 – 5,13 (д, 1H, C(3)H). Масс-спектр (e -удар; $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_2$, m/z): $[\text{M}]^+ 469$.

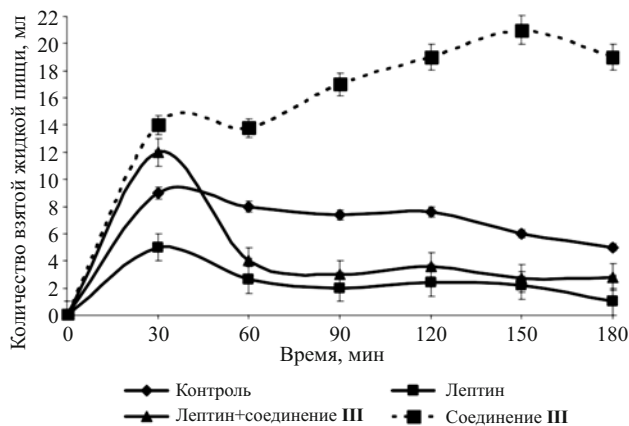
7-Бром-5-(2'-хлорфенил)-3-(2-метилфенил)амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-он (VIII). Перекристаллизовывают из смеси этилового спирта и хлороформа, 1:1. Выход 80 %, $T_{\text{пл}}$ 254 – 257 $^\circ\text{C}$.

Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: амидной группы 11,21 (с, 1H); ароматические протоны 6,99 – 7,81 (м,

Влияние соединений **II** – **VIII** на потребление пищи крысами по методу “Анорексия”

Соединение	R	Доза, мкМ	Количество потребленной жидкой пищи за 30 мин, мл	% от контроля
Контроль			7,4 ± 4,4	100
Лептин		0,02	2,5 ± 0,2*	37
Лептин + соединение III		0,02 + 2,01	4,6 ± 0,3*	68
II	2-COON	2,07	7,8 ± 2,7	105
III	3-COOSCH ₃	2,01	21 ± 4,9*	284
IV	4-COOSCH ₃	2,01	6,5 ± 3,4	88
V	3-Cl	2,11	6,1 ± 3,2	82
VI	2-Cl	2,11	2,5 ± 2,1*	28
VII	3-OCH ₃	2,13	16 ± 1,5*	216
VIII	3-CH ₃	2,21	14 ± 1,8*	189

* Достоверно при $p < 0,05$.



Влияние гормона лептина и его комбинации с соединением III при его сочетанном введении на аппетит в эксперименте на крысах: * различия считались достоверными при $p < 0,05$.

7H); иминный протон 6,82 – 6,79 (д, 1H, 3(NH)); 5,16 – 5,13 (д, 1H, C(3)H).

Масс-спектр (m/z): $C_{22}H_{17}BrClN_3O$. $[M]^+$ 453.

Экспериментальная фармакологическая часть

Исследования проводили на белых крысах-самцах массой 120 – 150 г. Животных содержали на стандартной лабораторной диете при естественном освещении. Животным контрольных групп в определенных объемах вводили физиологический раствор. Исследуемые вещества в дозах 2,07 – 2,21 мкМ вводили внутрибрюшинно в суспензии с Твин-80 фирмы “FERAK” (Германия), препарат сравнения лептин фирмы Sigma-Aldrich в дозе 20 нМ вводили внутрибрюшинно в соответствии с рекомендациями [12].

Влияние соединений на аппетит и количество потребляемой пищи изучали согласно [13]. Жидкая пища готовилась ежедневно и состояла из следующих ингредиентов: 200 г порошкообразной сухой молочной смеси, содержащей комплекс витаминов (Малютка), и 150 мл кипяченой водопроводной воды. После тщательного перемешивания смесь готова к употреблению [14].

У крыс в течение 2 недель в экспериментальной установке вырабатывался навык взятия жидкой пищи. Затем отработавшей группе животных за день до опыта внутрибрюшинно вводили 0,9 % раствор NaCl. Животных допускали к жидкой пище через 30 мин, после чего регистрировали количество потребляемой пищи (в мл) каждой крысой в течение 3 ч каждые 30 мин. На следующий день после 2 ч депривации крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор, а опытной группе вводили исследуемые соединения в дозе 1 мг/кг. Через 30 мин после введения соединений крыс допускали к жидкой пище. Количество потребляемой пищи (в мл) фиксировали каждые 30 мин в течение 3 ч. Затем все показатели по потреблению пищи каждой крысой суммировали и сравнивали с контрольными значениями. Контрольная группа в среднем за 30 мин потребляла 7 – 8 мл жид-

кой пищи. Эффект выражали в процентах по отношению к контролю.

Острую токсичность изучали по методу Литчфилда и Уилкоксона [14]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel методом вычисления среднего арифметического и его уровня значимости по критерию достоверности Стьюдента [15].

Результаты и их обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что в ряду соединений II – VIII обнаружены соединения, которые в зависимости от структуры в дозах 2,07 – 2,21 мкМ обладают как орексигенным, так и анорексигенным эффектом по сравнению с контрольной группой животных (таблица). Степень влияния на объем взятой жидкой пищи и повышение аппетита зависит от природы заместителя в положении 3 арильного фрагмента и увеличивается в ряду метил < метокси < метоксикарбонил, но в то же время наличие атома хлора в положении 3 не влияет на орексигенную активность.

Наиболее выраженный эффект на аппетит по сравнению с контролем оказывают соединения III, VI, VII и VIII в отличие от соединений II, IV, V. Соединение III с карбонильной группой в *meta*-положении арильного заместителя на 184 % увеличивает потребление пищи крысами и проявляет высокий орексигенный эффект. Опытные животные по сравнению с контрольной группой чаще подходили к контейнеру с жидкой пищей в течение 3 ч эксперимента. Соединения VII и VIII, содержащие в *meta*-положении арильного заместителя метокси- и метильную группы, на 116 и 89 % соответственно увеличивают потребление жидкой пищи по сравнению с контролем. В отличие от соединений III, VII и VIII, соединение IV, содержащее метоксикарбонильную группу в *para*-положении арильного заместителя, не влияет на аппетит, и количество потребляемой пищи экспериментальными животными не отличается от контрольных значений. Выраженный анорексигенный эффект проявляет соединение VI с атомом хлора в *ortho*-положении арильного заместителя, которое на 72 % снижает потребление пищи крысами, при этом отмечалось значительное снижение числа подходов животных к поилке с жидкой пищей и количества взятой (в мл) еды по сравнению с контролем. Ранее нами показано, что лептин и исследуемые нами соединения в указанных дозах не влияют на двигательную активность животных в «открытом поле» и не проявляют седативных свойств [1, 16]. Следует отметить, что соединение VI по анорексигенному эффекту не уступает лептину. Соединение V с атомом хлора в *meta*-положении арильного заместителя имеет тенденцию к снижению (на 28 %) потребления пищи животными опытной группы, однако полученные данные не достоверны по сравнению с контролем. Проведенные нами исследования показали, что лептин в дозе 20 нМ, введенный внутрибрю-

шинно крысам, в 2,7 раза (73 %) снижает потребление жидкой пищи крысами, т.е. проявляет выраженное анорексигенное действие, при этом отмечалось значительное снижение числа подходов животных к поилке с жидкой пищей по сравнению с контролем. Имея в виду именно анорексигенный эффект лептина, его иногда называют “гормоном насыщения” или “гормоном похудения” [17]. Уникальная способность лептина усиливать чувство насыщения длительное время считалась главной, если не единственной, особенностью этого гормона. Совместное применение лептина и соединения III в дозе 2,01 мкМ через 60 мин приводит к резкому снижению потребления жидкой пищи животными до 4,6 мл на всем протяжении исследования (рисунок). Таким образом, совместное применение лептина и соединения III приводит к антагонистическому эффекту и значительной потере аппетита, вызванного соединением III (рисунок).

Соединения II – VIII относятся к малотоксичным веществам, их LD₅₀ более 750 мг/кг при пероральном введении крысам.

Таким образом, можно высказать предположение об участии как ГАМК-ергической, так и холинэргической систем и гормона лептина в регуляции аппетита изученных нами соединений. При этом их связывание с 1,4-бензодиазепиновыми рецепторами обуславливают орексигенный эффект, а с холинэргическими рецепторами и лептином — анорексигенные свойства.

Таким образом, впервые в ряду новых производных 7-бром-5-(2'-хлор)фенил-3-ариламино-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-онов выявлена анорексигенная активность, которая выражается в снижении аппетита под влиянием соединений IV, V, VI на 22, 28 и 72 % соответственно по сравнению с контролем. Соединения III, VII и VIII на 184, 116 и 89 % повышают аппе-

тит и проявляют высокую орексигенную активность. Показана перспективность поиска соединений, влияющих на аппетит, среди 3-замещенных производных 1,4-бензодиазепин-2-онов с ариламиновым фрагментом в структуре молекулы.

ЛИТЕРАТУРА

1. К. С. Андронати, Е. А. Костенко, Т. Л. Карасева, С. А. Андронати, *Хим.-фарм. журн.*, **36**(7), 15 – 17 (2002); *Pharm. Chem. J.*, **36**(7), 356 – 359 (2002).
2. А. А. Казакова, В. В. Годован, Т. Л. Карасева, *Клин. фармація*, **14**(4), 28 – 30 (2010).
3. S. J. Cooper, *Appetite*, **44**, 33 – 150 (2005).
4. H. Möhler, J. M. Fritschy & U. Rudolph, *J. Pharmacol. Experim. Ther.*, **300**, 2 – 8 (2002).
5. T. Kenakin, *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**, 186 – 192 (2004).
6. M. Filizola, D. L. Harris & G. H. Loew, *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **17**, 769 – 777 (2000).
7. J. R. Martin, P. Schoch, F. Jenck, et al., *Psychopharmacology*, **111**, 415 – 422 (1993).
8. K. J. Simansky, D. M. Nicklous, *Pharmacol. Biochem. Behavior*, **71**, 681 – 690 (2002).
9. S. J. Cooper, *Brain Res.*, **346**, 190 – 194 (1985).
10. С. Ю. Макан, Н. А. Ткачук, В. М. Корхов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **39**(6), 19 – 21 (2005); *Pharm. Chem. J.*, **39**(6), 300 – 302 (2005).
11. Andrea Heldsinger, Gintautas Grabauskas, Il Song, et al., *J. Biol. Chem.*, **286**, 11707 – 11715 (2011).
12. Патент Россия 221249 (1997); PCT WO 98 / 12224.
13. M. Dezube, E. E. Sugg, L. S. Birkemo, et al., *J. Med. Chem.*, **38**, 3 – 9 (1995).
14. G. Hewson, G. E. Leighton, R. G. Hill, J. Hughes, *Br. J. Pharmacol.*, **93**, 79 – 84 (1988).
15. С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич, *Морион*, Киев (2001).
16. Lin Xu, Nicholas Rensing, Xiao-Feng Yang, et al., *J. Clin. Invest.*, **118**(1), 272 – 280 (2008).
17. V. DiMarzo, S. K. Goparaju, L. Wang, et al., *Nature*, **410**, 822 – 825 (2001).

Поступила 29.09.14

SYNTHESIS OF NEW 7-BROMINE-5-(2'-CHLORO)PHENYL-3-ARYLAMINO-1,2-DIHYDRO-3H-1,4-BENZODIAZEPINE DERIVATIVES AND STUDY OF THEIR INFLUENCE ON APPETITE IN RATS

T. L. Karaseva, E. B. Lihota, Y. R. Krivenko S. A. Semibratyev, and V. I. Pavlovsky*

A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine

* e-mail: victor_pavlovsky@ukr.net

A series of new of 7-bromine-5-(2'-chloro)phenyl-3-arylamiно-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine derivatives (compounds II – VIII) were synthesized. Among these, compounds were revealed that exhibited pronounced orexigenic/anorexigenic effects on the appetite of experimental rats at low doses (2.07 – 2.21 μM). Compound VI produced anorexigenic effect comparable to that of hormone leptin in reducing appetite and food intake. Compounds III, VII, and VIII produced orexigenic action. Leptin decreased liquid food consumption 2.7 times compared to control. Combined administration of leptin and compound III (producing pronounced orexigenic effect) led to a 73% reduction of appetite in rats.

Keywords: synthesis; 1,2-dihydro-1,4-benzodiazepinones; appetite; leptin.