

В. О. Топузян, С. Р. Тосунян, С. Г. Чимаритян, Р. В. Пароникян

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ (Z)-ДИАЛКИЛАМИНОАЛКИЛАМИДОВ N-БЕНЗОИЛ- α,β -ДЕГИДРОАМИНОКИСЛОТ И ИХ ЙОДМЕТИЛАТОВ

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН Республики Армения, Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна, Армения, 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26; e-mail: syuzitos@mail.ru

Реакцией ненасыщенных 5(4H)-оксазолонов с *N,N*-диалкилдиаминами осуществлен синтез и описаны физико-химические характеристики *N,N*-(диалкиламино)алкиламидами некоторых *N*-замещенных α,β -дегидроаминокислот и их четвертичных аммониевых солей. Приведены результаты их взаимодействия с эритроцитарной ацетилхолинэстеразой (АХЭ) и плазменной бутирилхолинэстеразой (БуХЭ) человека. Для всех синтезированных соединений определены значения IC_{50} (концентрация исследуемого соединения, при которой наблюдается 50 % торможение скорости холинэстеразного гидролиза 0,1 мМ ацетилтиохолина). Установлено, что все синтезированные вещества обладают антихолинэстеразной активностью и в основном специфичны по отношению к БуХЭ.

Ключевые слова: производные α,β -дегидроаминокислот; антихолинэстеразные свойства; йодметилаты диалкиламиноалкил амидов; АХЭ; БуХЭ.

Ранее [1 – 3] нами обнаружено, что холиновые эфиры *N*-замещенных α,β -дегидроаминокислот проявляют антихолинэстеразную активность. С целью выявления связи между химической структурой и биологической активностью этого ряда соединений нами предпринят синтез диалкиламиноалкил амидов некоторых *N*-бензоил- α,β -дегидроаминокислот **IX** – **XV**. Последние получены взаимодействием соответствующих ненасыщенных 5(4H)-оксазолонов (**I** – **III**) с *N,N*-диалкиламиноалкиламидами (**IV** – **VIII**) в среде эфира при комнатной температуре.

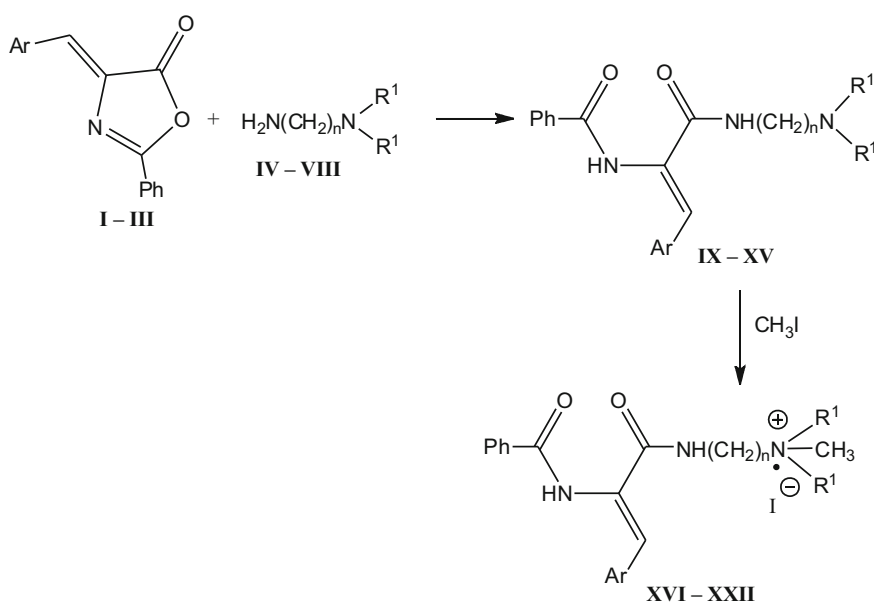
Отметим, что синтез аналогичных амидов α,β -дегидротриптофана азлактонным методом проводится

кипячением в течение 1 – 2 ч в среде смеси бензол – ацетонитрил [4]. По данным [5] 2-метил-4-арил-иден-5(4H)-оксазолон реагирует с диалкиламиноалкиламидами в среде хлороформа в течение 1 ч.

Кватернизацию полученных амидов **IX** – **XV** осуществляли взаимодействием с йодистым метилом в ацетоне.

Выходы полученных указанным способом аминоксидов **IX** – **XV** колеблются в пределах 91 – 99 %, а их йодметилатов **XVI** – **XXII** — в диапазоне от 61 до 98 % (табл. 1).

Строение всех полученных соединений подтверждено данными ИК и ЯМР 1H спектров. В ИК-спек-



IX, XVI: Ar = C₆H₅, n = 2, R¹ = C₂H₅;

X, XVII: Ar = C₆H₅, n = 2, N(R¹)₂ = пиррол;

XI, XVIII: Ar = C₆H₅, n = 2, N(R¹)₂ = морфолин;

XII, XIX: Ar = C₆H₄Br-4, n = 2, R¹ = CH₃;

XIII, XX: Ar = C₆H₄Br-4, n = 2, R¹ = C₂H₅;

XIV, XXI: Ar = C₆H₄Br-4, n = 3, R¹ = CH₃;

XV, XXII: Ar = C₆H₄OCH₃-4, n = 2, R¹ = C₂H₅

Таблица 1
Выходы, температуры плавления и данные ТСХ диалкиламиноалкиламинов N-замещенных α,β -дегидроаминокислот (IX – XV) и их йодметилатов (XVI – XXII)

Соединение	Выход, %	$T_{пл}$, °C	R_f (пропанол — вода, 7:3)	Брутто-формула
IX	95,8	150 – 152	0,53	$C_{22}H_{27}N_3O_2$
X	91,1	98 – 101	0,51	$C_{22}H_{25}N_3O_2$
XI	96,9	179 – 182	0,70	$C_{22}H_{25}N_3O_3$
XII	99,4	208 – 211	0,52	$C_{20}H_{22}BrN_3O_2$
XIII	99,9	148 – 150	0,50	$C_{22}H_{26}BrN_3O_2$
XIV	97,3	165 – 167	0,50	$C_{21}H_{24}BrN_3O_2$
XV	98,8	153 – 156	0,48	$C_{23}H_{29}N_3O_3$
XVI	98,0	190 – 192	0,83	$C_{23}H_{30}JN_3O_2$
XVII	67,0	116 – 120	0,74	$C_{23}H_{28}JN_3O_2$
XVIII	61,0	146 – 150	0,79	$C_{23}H_{28}JN_3O_3$
XIX	64,1	125 – 128	0,74	$C_{21}H_{25}BrJN_3O_2$
XX	87,9	186 – 190	0,83	$C_{23}H_{29}BrJN_3O_2$
XXI	97,5	197 – 200	0,79	$C_{22}H_{27}BrJN_3O_2$
XXII	73,2	128 – 133	0,74	$C_{24}H_{32}JN_3O_3$

трах соединений IX – XXII имеются максимумы поглощения при 1624 – 1650 и 1644 – 1665 cm^{-1} , характерные для двойной связи и амидной карбонильной группы, соответственно. Частота валентных колеба-

ний NH-амидной группы находится в области 3190 – 3380 cm^{-1} . Данные ЯМР 1H спектров (табл. 2) показывают, что синглетный сигнал протона β -положения дегидроаминокислотного остатка проявляется в пределах 7,05 – 7,24 м.д., что свидетельствует о Z-конфигурации этих соединений.

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры сняты на спектрометре “Nicolet Avatar 330 FT-IR” в вазелиновом масле, спектры ЯМР 1H — на “Varian Mercury-300” в растворе ДМСО- d_6 . ТСХ проведена на пластинках силуфол “UV-254”, элюент — пропанол — вода (7:3), проявитель — пары йода. Ненасыщенные 5(4H)-оксазолонны получены по методике [6].

2-(Диалкиламиноалкил)амиды N-бензоил- α,β -дегидроаминокислот (IX – XV). К смеси 0,004 моль соответствующего 5(4H)-оксазолонна I – III в 50 мл диэтилового эфира прибавляют 0,004 моль диамина IV – VIII и смесь перемешивают при комнатной температуре 1 ч. Выпавший при этом осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из бензола.

Кватернизация третичных аминокислот XVI – XXII. К раствору 0,0006 моль амида IX – XV в 10 мл

Таблица 2
Данные ЯМР 1H спектров диалкиламиноалкиламинов (IX – XV) и их четвертичных аммониевых солей (XVI – XXI)

Соединение	Данные ЯМР 1H
IX	0,95 (т, 6H, J 7,1 Гц, NEt_2), 2,48 (к, 4H, J 7,1 Гц, NEt_2), 2,52 (т, 2H, J 6,8 Гц, NCH_2), 3,25 (дт, 2H, J ₁ 6,8 Гц, J ₂ 5,2 Гц, $NHCH_2$), 7,21 (с, 1H, = CH), 7,23 – 7,34 (м, 3H, Ar), 7,42 – 7,56 (м, 6H, C_6H_5 и NH), 7,98 – 8,04 (м, 2H, Ar), 9,73 (уш. с, 1H, NH).
X	1,62 – 1,69 (м, 4H, $NCH_2(CH_2)_2$), 2,43 – 2,52 (м, 4H, $N(CH_2)_2$), 2,57 (т, 2H, J 6,7 Гц, NCH_2), 3,31 (дт, 2H, J ₁ 6,7 Гц, J ₂ 5,2 Гц, $NHCH_2$), 7,19 (с, 1H, = CH), 7,21 – 7,34 (м, 3H, Ar), 7,42 – 7,56 (м, 5H, C_6H_5), 7,62 (уш.т, 1H, J 5,2 Гц, $NHCH_2$), 7,98 – 8,03 (м, 2H, Ar), 9,73 (уш. с, 1H, NH).
XI	2,37 – 2,42 (м, 4H, $N(CH_2)_2$), 2,46 (т, 2H, J 6,6 Гц, NCH_2), 3,32 (дт, 2H, J ₁ 6,6 Гц, J ₂ 5,2 Гц, $NHCH_2$), 3,44 – 3,47 (м, 4H, $O(CH_2)_2$), 7,20 (с, 1H, = CH), 7,22 – 7,34 (м, 3H, Ar), 7,44 – 7,55 (м, 5H, Ar), 7,58 (уш.т, 1H, J 5,2 Гц, $NHCH_2$), 8,01 – 8,05 (м, 2H, Ar), 9,77 (уш. с, 1H, NH).
XII	2,20 (с, 6H, NMe_2), 2,39 (т, 2H, J 6,7 Гц, NCH_2CH_2NH), 3,28 (тд, 2H, J ₁ 6,7 Гц, J ₂ 5,7 Гц, CH_2NH), 7,11 (с, 1H, = CH), 7,42 – 7,55 (м, 3H, C_6H_5), 7,45 (с, 4H, C_6H_4Br), 7,70 (уш. т, 1H, J 5,7 Гц, NH), 7,96 – 8,00 (м, 2H, C_6H_5), 9,72 (уш. с, 1H, NH).
XIII	0,95 (т, 6H, J 7,1 Гц, NEt_2), 2,48 (к, 4H, J 7,1 Гц, NEt_2), 2,52 (т, 2H, J 6,8 Гц, NCH_2), 3,24 (т.д., 2H, J ₁ 6,8 Гц, J ₂ 5,1 Гц, $NHCH_2$), 7,16 (с, 1H, = CH), 7,42 – 7,55 (м, 3H, C_6H_5), 7,45 (уш. с, 4H, C_6H_4Br), 7,60 (уш. т, 1H, J 5,1 Гц, NH), 7,97 – 8,02 (м, 2H, C_6H_5), 9,73 (уш. с, 1H, NH).
XIV	1,64 (2H, кв, J 6,6 Гц, NCH_2CH_2), 2,04 (с, 6H, NMe_2), 2,29 (т, 2H, J 6,6 Гц, NCH_2), 3,27 (тд, 2H, J ₁ 6,6 Гц, J ₂ 5,3 Гц, $NHCH_2$), 7,16 (с, 1H, = CH), 7,41 – 7,56 (м, 3H, C_6H_5), 7,44 (с, 4H, C_6H_4Br), 7,99 – 8,04 (м, 2H, C_6H_5), 8,10 (уш. т, 1H, J 5,3 Гц, $NHCH_2$), 9,68 (уш. с, 1H, NH).
XV	0,93 (т, 6H, J 7,1 Гц, NEt_2), 2,46 (к, 4H, J 7,1 Гц, NEt_2), 2,48 – 2,54 (м, 2H, NCH_2), 3,20 – 3,28 (м, 2H, $NHCH_2$), 3,78 (с, 3H, OCH_3), 6,84 и 7,49 (по 2H, оба м, C_6H_4O), 7,22 (с, 1H, = CH), 7,41 – 7,55 (м, 3H, C_6H_5 и NH), 8,01 – 8,05 (м, 2H, C_6H_5), 9,66 (уш. с, 1H, NH).
XVI	1,35 (т, 6H, J 7,1 Гц, CH_2Me), 3,10 (с, 3H, NMe), 3,44 – 3,54 (м, 6H, NCH_2), 3,62 – 3,69 (м, 2H, NCH_2), 7,23 (с, 1H, = CH), 7,24 – 7,36 (м, 3H, Ar), 7,44 – 7,59 (м, 5H, Ar), 8,01 – 8,07 (м, 2H, Ar), 8,34 (т, 1H, J 5,7 Гц, $NHCH_2$), 9,92 (уш. с, 1H, NH).
XVII	12,15 – 2,24 (м, 4H, 2 CH_2 -пиррол), 3,18 (с, 3H, NMe), 3,60 – 3,74 (м, 4H, 2 CH_2 -пиррол), 7,24 (с, 1H, = CH), 7,26 – 7,37 (м, 3H, Ph), 7,43 – 7,60 (м, 5H, Ph), 8,00 – 8,06 (м, 2H, Ph), 8,42 (т, 1H, J 5,4 Гц, $NHCH_2$), 9,95 (с, 1H, NH).
XVIII	3,35 (с, 3H, NMe), 3,55 – 3,68 (м, 4H, 2 CH_2 -морфолин), 3,71 – 3,81 (м, 2H, CH_2, NCH_2), 3,89 – 4,05 (м, 4H, 2 CH_2 -морфолин), 7,23 (с, 1H, = CH), 7,25 – 7,37 (м, 3H, Ar), 7,45 – 7,60 (м, 5H, Ar), 8,01 – 8,06 (м, 2H, Ar), 8,42 (т, 1H, J 5,0 Гц, $NHCH_2$), 9,97 (уш. с, 1H, NH).
XIX	3,24 (с, 9H, NMe_3), 3,59 – 3,73 (м, 4H, NCH_2), 7,20 (с, 1H, = CH), 7,44 – 7,58 (м, 7H, Ar), 7,99 – 8,04 (м, 2H, Ar), 8,42 (т, 1H, J 5,5 Гц, $NHCH_2$), 9,93 (уш. с, 1H, NH).
XX	1,35 (т, 6H, J 7,1 Гц, NEt_2), 3,11 (с, 3H, NCH_3), 3,43 – 3,55 (м, 6H, CH_2NEt_2), 3,61 – 3,69 (м, 2H, $NHCH_2$), 7,20 (с, 1H, = CH), 7,44 – 7,57 (м, 7H, C_6H_5 и C_6H_4), 8,00 – 8,05 (м, 2H, C_6H_4), 8,38 (т, 1H, J 5,7 Гц, $NHCH_2$), 9,92 (с, 1H, NH).
XXI	1,96 – 2,07 (м, 2H, NCH_2CH_2), 3,21 (с, 9H, NMe_3), 3,31 – 3,38 (м, 2H, NCH_2), 3,48 – 3,55 (м, 2H, NCH_2), 7,05 (с, 1H, = CH), 7,45 – 7,58 (м, 7H, C_6H_5 и C_6H_4), 8,01 – 8,06 (м, 2H, C_6H_4), 8,25 (т, 1H, J 6,0 Гц, $NHCH_2$), 10,00 (уш. с, 1H, NH).

ацетона прибавляют 0,13 г (0,06 мл, 0,0009 моль) йодистого метила и раствор оставляют в течение 24 ч при комнатной температуре. Образовавшийся осадок отфильтровывают и сушат на воздухе. Перекристаллизацию проводят из ацетона или смеси этанол — эфир (1:1).

Экспериментальная биологическая часть

В работе применялись ацетилхолинэстераза (АХЭ) из эритроцитов [7] и бутирилхолинэстераза (БухЭ) высокой степени очистки из сыворотки крови человека, полученной согласно [8].

Активность АХЭ измеряли по модифицированному методу [9]. Реакционная среда в 2,5 мл конечного объема содержала реагенты: фосфатный буфер 0,1 М, рН 7,6, 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота 0,4 мМ, ацетилтиохолин (АТХ) 0,05 – 0,5 мМ и фермент в необходимом количестве. Реакцию проводили в термостабируемой ячейке спектрофотометра “SpecordUV-VIS” (Германия) при температуре 25 °С. Начальную скорость реакции определяли по наклону касательной к кривой поглощения продукта, образовавшегося в результате реакции гидролиза АТХ. Коэффициент молярной экстинкции продукта реакции Ellman $\epsilon_{412-420}$ принимали равным $14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [10]. Активность БухЭ измеряли аналогичным образом.

Антихолинэстеразную активность — величину IC_{50} (концентрация исследуемого соединения, при которой наблюдается 50 % торможение скорости холинэстеразного гидролиза ацетилтиохолина) — определяли в условиях постоянной концентрации субстрата АТХ (0,1 мМ) при варьировании концентрации испытуемых соединений. Величины значений IC_{50} определяли из графической зависимости подавления скорости ферментативного гидролиза АТХ от концентрации ингибитора (табл. 3).

Антибактериальную активность всех соединений изучали по методике [11] при бактериальной нагрузке

20 млн микробных тел на 1 мл среды. Эксперименты осуществляли в отношении грамположительных (*St. aureus* 1 и 209p,) и грамотрицательных бактерий (*Sh. Flexneri* 6858, *E. coli* 0 – 55). Растворы соединений и контрольного препарата готовили в ДМСО в разведении 1:20. В чашки Петри с посевами вышеуказанных штаммов микроорганизмов вносили испытуемые вещества по 0,1 мл. Учет результатов проводили по диаметру (d , мм) зоны отсутствия роста микробов на месте внесения соединений после суточного выращивания тест-культур в термостате при 37 °С. В качестве положительного контроля в аналогичных условиях, использовали фуразолидон [12] с учетом количества активного вещества в таблетках препарата (производство ОАО “Борисовский завод медицинских препаратов” Беларусь, г. Борисово).

Результаты и их обсуждение

Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что в случае АХЭ из третичных аминоксидов наиболее сильным ингибитором является амид **XIII**, тогда как по отношению к БухЭ сравнительно высокую антихолинэстеразную активность проявляет 2-амид **XII**. Из четвертичных аммониевых солей сравнительно высокие ингибирующие свойства наблюдаются у йодметилатов амидов **XIX** (по отношению к АХЭ) и **XX** (по отношению к БухЭ). Из приведенных данных можно заключить, что кватернизация аминоксидов *N*-бензоил- α,β -дегидроаминоксидов в случае БухЭ приводит к ухудшению ингибирующих свойств, тогда как в случае БухЭ в основном наблюдается обратная картина. Все исследованные вещества проявляют избирательность по отношению к БухЭ. При этом самую высокую селективность по отношению к БухЭ проявляет йодметилат **XIX** (10000 раз). В табл. 3 эта селективность обозначена как соотношение А/Б, где А и Б являются значениями IC_{50} данного соединения для АХЭ и БухЭ, соответственно. Надо отметить, что в работе [13] приводятся данные о том, что производное гексагидрофура[3,2-*b*]фурана проявляет избирательность по отношению к БухЭ до 51000 раз.

При изучении антибактериальных свойств синтезированных соединений **IX – XXII** в отношении грамположительных стафилококков (*St. aureus* 1 и 209p) и грамотрицательных палочек (*Sh. Flexneri* 6858 и *E. coli* 0 – 55) установлено, что соединения **XII** и **XIII** обладают высокой антибактериальной активностью, а остальные умеренной ($d = 10 – 19$ мм), уступая контрольному препарату фуразолидону ($d = 24 – 25$ мм).

Таким образом, на основе *N,N*-(диалкиламино)алкиламидов некоторых *N*-бензоил- α,β -дегидроаминоксидов получены соединения, избирательно ингибирующие активность холинэстераз 2 видов, и соединения с антибактериальной активностью, что указывает на перспективность дальнейших поисков в этих направлениях.

Таблица 3
Антихолинэстеразные свойства соединений IX – XXII

Соединение	IC_{50} , мМ · 10 ⁻³ (АХЭ) (А)	IC_{50} , мМ · 10 ⁻⁵ (БухЭ) (Б)	А/Б
IX	480 ± 22	62 ± 2,9	774
X	769 ± 11,5	104 ± 7,1	739
XI	830 ± 38	5000 ± 28,8	17
XII	300 ± 45	8,6 ± 0,48	3488
XIII	200 ± 15	33,4 ± 1,3	599
XIV	434 ± 10	82 ± 4,6	529
XV	500 ± 25	99 ± 3,8	505
XVI	1110 ± 261	78 ± 6,1	1423
XVII	710 ± 24	38 ± 2,1	1868
XVIII	1430 ± 89	72 ± 1,9	1986
XIX	180 ± 5	18 ± 0,14	10000
XX	470 ± 12	11 ± 0,9	4273
XXI	620 ± 18,5	19 ± 1,4	3263
XXII	590 ± 16,2	13,9 ± 1,7	4245

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Григорян, А. А. Амбарцумян, М. В. Мкртчян и др., *Хим.-фарм. журн.*, **40**(3), 18 – 23 (2006); *Pharm. Chem. J.*, **40**(3), 135 – 140 (2006).
2. H. A. Grigoryan, A. A. Hambardzumyan, M. V. Mkrtchyan, et al., *NAS RA Electronoic Natural Sci.*, **1**(6), 14 – 20 (2006).
3. H. A. Grigoryan, A. A. Hambardzumyan, M. V. Mkrtchyan, et al., *Chem.-Biol. Interact.*, **171**(1), 108 – 116 (2008).
4. А. А. Спасов, Д. С. Яковлев, Л. Ф. Суздалев, *Хим.-фарм. журн.*, **46**(10), 14 – 17 (2012); *Pharm. Chem. J.*, **46**(10), 584 – 590 (2012).
5. A. Kawasaki, K. Meakawa, K. Kubo, et al., *Tetrahedron*, **60**(42), 9517 – 9524 (2004).
6. В. О. Топузян, С. Р. Тосунян, *Хим. ж. Армении*, **65**(3), 369 – 373 (2012).
7. G. Fairbanks, T. L. Stec and D. F. Wallach, *Biochemistry*, **10**(13), 2606 – 2617 (1971).
8. B. N. La Du, C. F. Bartels, C. P. Noguera, et al., *Clin. Biochem.*, **23**, 423 – 431 (1990).
9. G. L. Ellman, K. D. Coutney, V. Jr. Andres, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88 – 95 (1961).
10. P. W. Riddles, R. L. Blakeley and B. Zerner, *Anal. Biochem.*, **94**(1), 75 – 81 (1979).
11. Г. Н. Першин, *Методы экспериментальной химиотерапии*, Медицина, Москва, (1971), сс. 507 – 522.
12. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2010), с. 851.
13. C. G. Caloran, G. P. Dillon, J. M. Gaynor, et al., *J. Med. Chem.*, **51**(20), 6400 – 6409 (2008).

Поступила 28.11.14

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF (Z)-DIMETHYLAMINOALKYL AMIDES OF N-BENZOYL- α,β -DEHYDROAMINO ACIDS AND THEIR IODOMETHYLATES

V. O. Topuzyan, S. R. Tosunyan*, S. G. Chshmarityan, and R. V. Paronikyan

A. L. Mnjoyan Institute of Fine Organic Chemistry, Scientific and Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Academy of Sciences of Armenia, 0014 Yerevan, 375014 Armenia

* e-mail: syuzitos@mail.ru

A series of N,N-(dialkylamino)alkyl amides of some N-substituted α,β -dehydroamino acids were synthesized via reactions of unsaturated 5(4H)-oxazolones with N,N-dialkyldiamines and the physicochemical characteristics of obtained compounds and their quaternary ammonium salts were determined. The results of studying their interaction with human erythrocytic acetylcholinesterase (AChE) and plasmic butyrylcholinesterase (BuChE) are presented. All the synthesized compounds are characterized by IC_{50} values of concentration at which 50% inhibition of the rate of cholinesterase hydrolysis of 0.1 mM acetylthiocholine is observed. According to the obtained data all the synthesized compounds possess anticholinesterase properties and are mainly specific with respect to BuChE.

Keywords: α,β -dehydroamino acid derivatives; iodomethylates of dialkylaminoalkyl amides; plasmic butyrylcholinesterase (BuChE); erythrocytic acetylcholinesterase (AChE); anti-cholinesterase properties;