

Направленный синтез и поиск фармацевтических субстанций гипогликемического действия в ряду производных 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот

Пулина Н.А., Краснова А.И., Собин Ф.В., Юшкова Т.А., Юшков В.В.

Directed synthesis and search of pharmaceutical substances with hypoglycemic activity in the series of 4-aryl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenoic acids

Pulina N.A., Krasnova A.I., Sobin F.V., Yushkova T.A., Yushkov V.V.

Пермская государственная фармацевтическая академия, г. Пермь

© Пулина Н.А., Краснова А.И., Собин Ф.В., Юшкова Т.А., Юшков В.В.

Работа посвящена направленному синтезу и изучению гипогликемической активности N-гетериламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых и 4-арил-3-бром-2,4-диоксобутановых кислот. Изучена гипогликемическая активность 28 соединений. Установлены некоторые закономерности влияния природы гетероциклического фрагмента и атома брома на эффективность полученных соединений. Выявлены два малотоксичных и высокоактивных вещества, сопоставимых по силе действия с препаратом сравнения.

Ключевые слова: N-гетериламиды 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот, гипогликемическая активность.

The paper deals with directed synthesis and study of hypoglycemic activity of N-heterylamides of 4-aryl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenoic and 4-aryl-3-bromo-2,4-dioxobutanoic acids. Hypoglycemic activity of 28 compounds was under research. Some regularities of the influence of the heterocyclic moiety structure and the bromine atom on the activity of the compounds were obtained. Two low-toxic and highly active substances comparable in potency with the reference drug were identified.

Key words: N-heterylamides of 4-aryl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenoic acids, hypoglycemic activity.

УДК 615.273.012.1:543.635.3:616.153.455-008.64

Введение

Известно, что за последние 30—40 лет в мире отмечается значительный рост заболеваемости сахарным диабетом, что проявляется увеличением в 2 раза числа больных каждые 12—15 лет [10]. Применяемые в настоящее время антидиабетические препараты, используемые в виде монотерапии, не снижают прогрессирования макро- и микрососудистых осложнений и склонны к формированию резистентности, что служит основной причиной высокой летальности и инвалидизации пациентов. В связи с этим поиск новых оригинальных химических структур в ряду продуктов органического синтеза, обладающих гипогликемической активностью, является перспективным.

4-Арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновые (ароилпировиноградные) кислоты (АрПК) представляют собой

уникальную биологически активную матрицу благодаря высокой реакционной способности и сходству по своей структуре с двумя эндогенными кислотами — γ -аминомасляной (бутановой) и пировиноградной, которые являются продуктами метаболизма живого организма и определяют их низкую токсичность. К настоящему времени известны биологически активные производные АрПК, обладающие противовоспалительным, анальгетическим, антимикробным, противовирусным и другими видами действия [5, 6, 9, 11]. Однако в литературе отсутствуют сведения о систематическом изучении их влияния на уровень глюкозы в крови.

Наличие в структуре АрПК нескольких реакционных центров — карбоксильной группы, β -дикарбонильного фрагмента, енольного гидроксила, N-хелатного цикла и активированной кратной связи при существовании

кислот в енольной форме — позволяет осуществлять химическую модификацию исходного соединения с введением от одной до трех биологически активных группировок и потенцированием фармакологических эффектов. Определенную ценность представляют соединения, содержащие гетероциклический фармакофорный фрагмент. Ранее были опубликованы сообщения об обнаруженных закономерностях «структура — гипогликемическая активность» в ряду некоторых 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноатов гетериламмония, N-гетериламидов АрПК и их замещенных 2-гидразонопроизводных [7]. Представляло интерес введение в структуру N-гетериламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот атома галогена с оценкой сахароснижающего эффекта полученных соединений.

В продолжение исследований цель работы — направленный синтез и изучение гипогликемической активности N-гетериламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых и 4-арил-3-бром-2,4-диоксобутановых кислот, а также исходных ароилпировиноградных кислот.

Материал и методы

Химические исследования. Синтез N-гетериламидов АрПК 4a—p осуществлен на основе реакции 5-арилфуран-2,3-дионон (1a—4г) (циклической формы АрПК 1a—4г) с гетероциклическими аминами. N-гетериламиды 4-арил-3-бром-2,4-диоксобутановых кислот получены взаимодействием амидов 4 с эквимолекулярным количеством брома (метод А) или реакцией 5-арил-4-бромфуран-2,3-дионон (3a, 3б) с эквимолекулярным количеством гетероциклического амина (метод Б) (рис. 1).

Спектры инфракрасного (ИК) излучения записаны на приборе ФСМ-1201 (Россия) в пасте в вазелиновом масле. Спектры ЯМР¹H записаны на приборе ЯМР BS-567A (100 МГц), внутренний стандарт — ГМДС, растворитель ДМСО-d₆. Полученные спектральные характеристики доказывают структуру новых соединений 4a—4e, 4з, 4м, 4р, 5a—5з. Данные элементного анализа, проведенного на приборе LECO-CNН(S)932, удовлетворяют вычисленным значениям. Химическую чистоту соединений и протекание реакции контролировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV-254 в системах эфир — бензол — ацетон в соотношении 10 : 9 : 1, бензол — эфир 1 : 1. Пятна детектировали парами йода и ультрафиолетовым излучением.

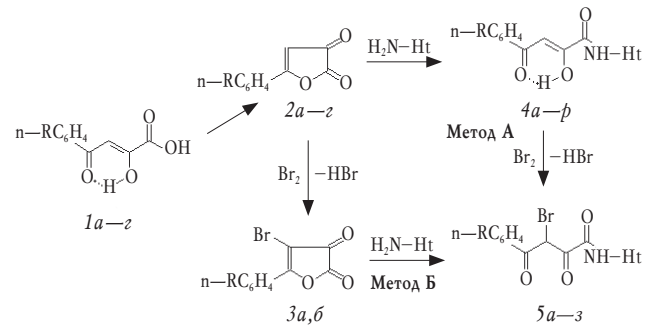


Рис. 1. Схема синтеза производных 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот: 1, 2: R = H (a), Cl (б), CH₃ (в), CH₃O (з). 3: R = H (a), Cl (б), CH₃ (в), CH₃O (з); Ht = 2-(1,3,4-тиадиолил), R = H (д), Cl (е), CH₃ (ж), CH₃O (з); Ht = 2-(5-метил-1,3,4-тиадиолил), R = H (и), Cl (к), CH₃ (л), CH₃O (м); Ht = 2-(5-этил-1,3,4-тиадиолил), R = H (н), Cl (о), CH₃ (п), CH₃O (р). 5: Ht = 2-тиадиолил, R = H (a), Cl (б), CH₃ (в); Ht = 2-(1,3,4-тиадиолил), R = H (з), Cl (д); Ht = 2-(5-метил-1,3,4-тиадиолил), R = H (е); Ht = 2-(5-этил-1,3,4-тиадиолил), R = H (ж), Cl (з)

N-(2-Тиадиолил)амид 2-гидрокси-4-оксо-4-(4-хлорфенил)-2-бутеновой кислоты (4б). К раствору, содержащему 2,09 г (0,01 моль) соединения 2б в 25 мл безводного хлороформа, прибавляли суспензию 1,02 г (0,01 моль) 2-аминотиадиолина в 20 мл того же растворителя и перемешивали при температуре 20—25 °С в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0 °С, осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из этилацетата. Выход составил 2,36 г (76%). Температура плавления (с разл.) 176—178 °С. Найдено, %: С 50,11; Н 3,43; N 8,67. C₁₃H₁₁ClN₂O₃S. Вычислено, %: С 50,25; Н 3,57; N 9,01.

Соединения 4a, 4в—4р получали аналогично.

N-[2-(1,3,4-Тиадиолил)]амид 3-бром-4-фенил-2,4-диоксобутановой кислоты (5a).

Метод А. К суспензии, содержащей 2,75 г (0,01 моль) соединения 4д в 40 мл безводного хлороформа, прикапывали при перемешивании 1,59 г (0,01 моль) брома. После полного растворения реагента реакционную смесь охлаждали до 5—0 °С, осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из диоксана. Выход составил 2,98 г (84%). Температура плавления 140—142 °С. Найдено, %: С 39,99; Н 2,24; N 11,69. C₁₂H₈BrN₃O₃S. Найдено, %: С 40,69; Н 2,28; N 11,86.

Соединения 5б—5з получали аналогично.

Метод Б. К раствору, содержащему 2,53 г (0,01 моль) 5-фенил-4-бромфуран-2,3-дионона (3a) в 30 мл безводного четыреххлористого углерода, прибавляли суспензию 1,01 г (0,01 моль) 2-амино-1,3,4-тиадиола в 30 мл

того же растворителя и перемешивали при температуре 20—25 °С в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до 5—0 °С, осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из диоксана. Выход составил 2,69 г (76%).

Соединения 5*d*, 5*e* получали аналогично.

Биологические исследования. Острую токсичность синтезированных соединений изучали на белых нелинейных мышах обоего пола с определением LD₅₀ [4]. Каждое соединение испытывали на 6 животных. Соединения вводили перорально в виде взвеси в 2%-м крахмальном растворе из расчета 0,1 мл на 10 г однократно, после чего животные находились под наблюдением 24 ч. Контрольным животным вводили эквивалентное количество 2%-го крахмального раствора [8]. Полученные результаты сравнивали с данными LD₅₀ препарата сравнения «Метформина» [3].

Гипогликемическую активность изучали на модели аллоксанового диабета. Опыты выполнены на белых нелинейных крысах обоего пола. Животных лишали пищи за 16 ч до опыта и на время его проведения. Экспериментальную гипергликемию моделировали внутривентральным введением аллоксана тригидрата (Alfa Aesar®) в дозе 170 мг/кг массы тела. Эксперименту подвергали животных, у которых развивалась острая форма диабета через 72 ч после введения диabetогена. Критерием включения животных в эксперимент служил уровень глюкозы в крови в пределах 15—19 ммоль/л. Изучаемые производные АрПК вводили перорально крысам с аллоксановым сахарным диабетом в дозе 50 мг/кг массы тела в виде 2%-й крахмальной взвеси. Концентрацию глюкозы в крови животных определяли глюкозооксидазным методом до введения исследуемых соединений, а также через 120 мин после него [1]. Степень гипогликемической активности соединений сравнивали с контрольной группой животных с экспериментальным диабетом, а также с активностью метформина в дозе 50 мг/кг массы тела [3].

Полученные результаты подвергали статистической обработке [3]. Данные всех выборок подвергались оценке на соответствие нормальному распределению при помощи критерия Шапиро—Уилки. Выборочные значения подчинялись нормальному закону распределения. Достоверность различий определяли путем дисперсионного анализа повторных измерений при помощи парного *t*-критерия Стьюдента. Множественные измерения проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение, m — стандарт-

ное отклонение. Различия считали достоверными при уровне $p < 0,05$. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась при помощи программы математической статистики Sigma Stat 3.5 для Windows, а также статистических программ Windows XP (Excel).

Результаты и обсуждение

Структура новых производных 4, 5 доказана методами ИК-, ЯМР¹H-спектроскопии и масс-спектрометрии, а также данными элементного анализа и хорошо согласуется с характеристиками родственных амидов [9].

Изучение острой токсичности производных 4, 5 показало, что пероральное введение соединений 4*a*—4*g* в дозе 700 мг/кг массы тела, веществ 4*d*—4*r* и 5*a*—5*i* в дозе 1 000 мг/кг массы тела не вызывало гибели животных. Общее состояние, внешний вид, реакция на внешние раздражители экспериментальных мышей в течение всего наблюдения были удовлетворительными и не отличались от контрольной группы животных.

Скрининг гипогликемической активности был осуществлен среди 28 соединений — АрПК 1*a*—1*g* и их производных 4*a*—4*r* и 5*a*—5*i*. Выявлено, что из них более половины проявили гипогликемическую активность различной степени выраженности, о чем свидетельствовало снижение уровня глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом в пределах от (13,8 ± 1,9) до (51,9 ± 1,3)% ($p < 0,05$ —0,001). При этом гипогликемический эффект двух соединений (5*v*, 5*g*) был сравним с эффектом субстанции препарата сравнения «Метформина». Результаты исследований представлены на рис. 2.

Установлено, что при введении электронодонорного заместителя в пароположение арильного радикала 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот (соединения 1*v*, 1*g*) происходит увеличение гипогликемического действия, а введение электроноакцепторного атома хлора не оказывает значимого влияния на выраженность данного эффекта (у соединения 1*b*). В свою очередь, введение N-гетериламидного фрагмента в структуру молекулы АрПК 1 способствует усилению гипогликемической активности полученных производных 4. Так, наличие в структуре незамещенной АрПК 1*a* фрагментов 2-тиазолина и 2-(5-R-1,3,4-тиадиазола) приводит к существенному увеличению гипогликемической активности (соединения 4*a*, 4*d*, 4*i*, 4*n*). У производных, содержащих электроноакцепторный заместитель, как правило, происходит снижение

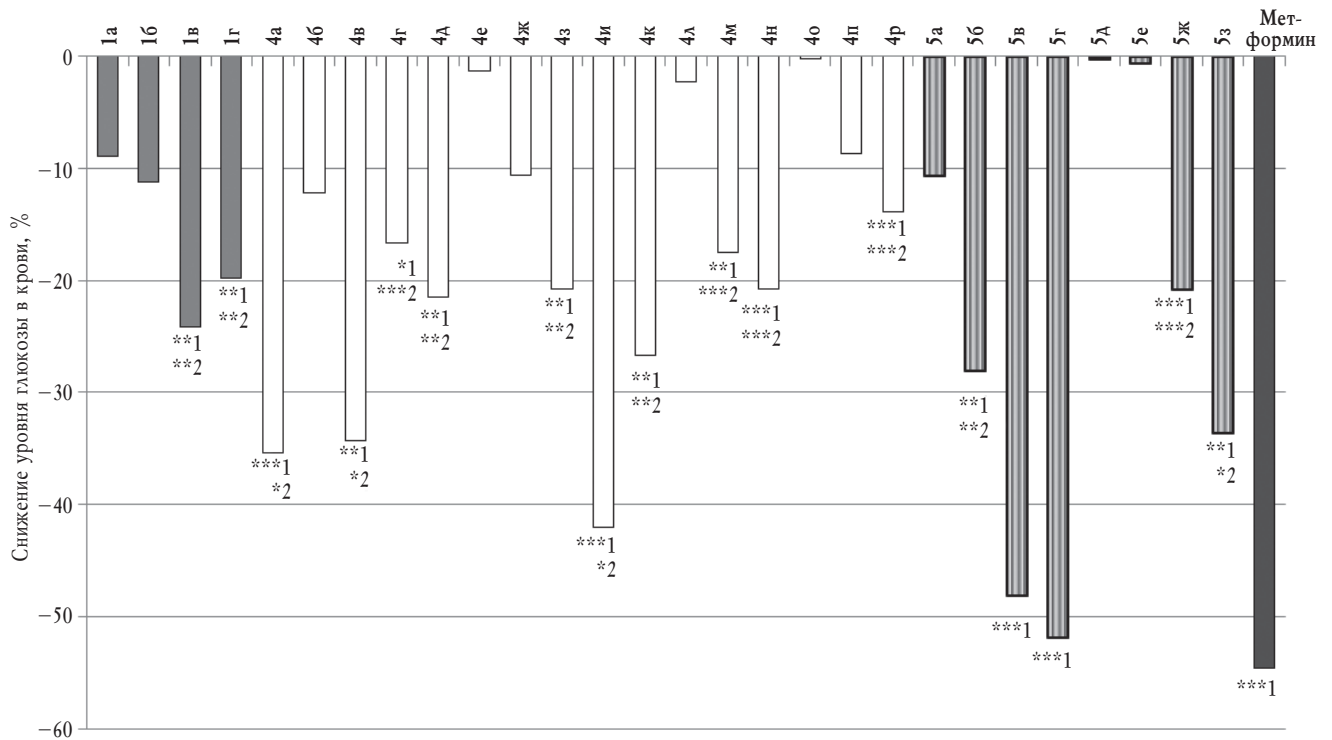


Рис. 2. Сравнительная характеристика гипогликемической активности 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот и их производных с метформинном: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$; 1 — по сравнению с аллоксановым контролем; 2 — по сравнению с метформинном

активности по сравнению с исходной АрПК (соединения 4е, 4о). В то же время четкой зависимости влияния электронодонорных заместителей на выраженность гипогликемического действия не установлено. Так, для амида 4в отмечено увеличение сахароснижающего действия, а для производных 4г, 4ж, 4з, 4л, 4м, 4п, 4р не обнаружено существенного потенцирования гипогликемического эффекта. Установлено, что увеличение алкильной цепи в 5-м положении 1,3,4-тиадиазола до этильной группы у амидов 4 приводит к снижению гипогликемической активности.

Установлено, что некоторые бромированные производные 5 показали высокую сахароснижающую активность по сравнению как с исходными АрПК 1, так и N-гетериламидами 4. Отмечено существенное усиление гипогликемического действия при введении атома брома в структуру соединений 5б—5г, 5з, имеющих заместитель в арильном радикале, независимо от его характера. Незамещенные производные 5а, 5е, 5ж по силе действия уступают исходным амидам 4, однако сопоставимы или превышают показатели родственных АрПК 1.

Анализ данных фармакологического скрининга позволил установить некоторые закономерности биологи-

ческой активности от химического строения соединений, которые могут быть использованы в дальнейшем целенаправленном синтезе биологически активных веществ в ряду производных АрПК.

Заключение

Синтезированы не описанные в литературе 17 N-гетериламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых и 4-арил-3-бром-2,4-диоксобутановых кислот. Исследована гипогликемическая активность 28 соединений. Установлено, что наибольший вклад в проявление гипогликемического действия производных АрПК оказывает введение в их структуру фрагментов 2-(1,3,4-тиадиазола) и 2-тиазолина, а также последующее бромирование данных N-гетериламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот. Выявлены два малотоксичных и высокоактивных соединения, сопоставимых по силе действия с препаратом сравнения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 1103-00882).

Литература

1. Волчегорский И.А., Рассохина Л.М., Мирошниченко И.Ю. Антиоксиданты при экспериментальном сахарном диабете // Проблемы эндокринологии. 2008. Т. 54, № 5. С. 43—50.
2. Глац С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 461 с.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Новая волна: Издатель Умеренков, 2010. 1216 с.
4. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.И. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. 1978. № 4. С. 497—502.
5. Пулина Н.А., Залесов В.В., Юшков В.В. и др. Синтез и биологическая активность солей гетероциклических аминов и гетериламидов на основе 4-арил-2,4-диоксобутановых кислот // Вопросы биологии, медицины и фарм. химии. 2008. № 2. С. 37—40.
6. Пулина Н.А., Мокин П.А., Юшков В.В. и др. Синтез и антимикробная активность комплексных соединений на основе N-гетериламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот // Хим.-фарм. журн. 2008. Т. 42, № 7. С. 14—16.
7. Пулина Н.А., Юшкова Т.А., Краснова А.И. и др. Гипогликемическая активность производных ароилпировиноградных кислот // Фармация. 2009. № 7. С. 36—38.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ 2-е изд., перераб. и доп. / под общ. ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005.
9. Sechi M., Vacchi A., Carcelli M. et al. From ligand to complexes: inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by beta-diketo acid metal complexes // J. Med. Chem. 2006. № 46. P. 4248—4260.
10. Steiner G. Implications of the global diabetic epidemic // Diabetes and Vascular Disease Research. 2006. V. 3, № 1. P. 2—5.
11. Wai J.S., Egbertson M.S., Payne L.S. et al. 4-Aryl-2,4-dioxobutanoic acid inhibitors of HIV-1 integrase and viral replication in cells // J. Med. Chem. 2000. V. 43, № 26. P. 4923—4926.

Поступила в редакцию 12.04.2011 г.

Утверждена к печати 01.06.2011 г.

Сведения об авторах

Н.А. Пулина — д-р фарм. наук, доцент, зав. кафедрой фармацевтической технологии ПГФА (г. Пермь).

А.И. Краснова — ассистент кафедры фармакологии ПГФА (г. Пермь).

Ф.В. Собин — ассистент кафедры фармацевтической технологии ПГФА (г. Пермь).

Т.А. Юшкова — д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии, клинической фармакологии ПГФА (г. Пермь).

В.В. Юшков — д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии, клинической фармакологии ПГФА (г. Пермь).

Для корреспонденции

Пулина Наталья Алексеевна, тел. 8-902-473-1217; e-mail: pulina-nata@mail.ru