

СТАТЬИ

УДК 547.476.3:615.214.2

**АЦИЛХЛОРИДЫ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ И ИХ АМИДОВ
КАК ПОЛУПРОДУКТЫ В СИНТЕЗЕ N-АЦИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ**

Брель А.К., Лисина С.В., Будаева Ю.Н., Клочкова Е.А., Соколова С.В.

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: svlisina@gmail.com

Осуществлен способ получения хлорангидридов гидроксибензойных кислот и амидов путем их взаимодействия с оксалилхлоридом в соотношении 1:1,1 в присутствии N,N-диметилформамида в среде бензола. По предложенному методу хлорангидриды гидроксибензойных кислот получали с выходами до 91 % с высокой степенью чистоты. Чистота и строение полученных соединений подтверждены данными элементного анализа, ¹H ЯМР спектроскопии. Высокий выход хлорангидридов гидроксибензойных кислот, их чистота, использование доступных исходных соединений и легкость оформления процесса обуславливают наибольшую технологичность предложенного метода. Синтезированные гидроксибензоилхлориды являются ценными полупродуктами в химии лекарственных препаратов. Так был синтезирован ряд перспективных биологически активных пептидов на их основе, для повышения водорастворимости, некоторые производные были получены в виде калиевых солей. Соединение-лидер – дикалиевая соль 4-[(4'-салицилоиламино)бутаноиламино]бутановой кислоты – *in vivo* проявляет нейропротекторную активность. Это соединение достоверно повышало выживаемость животных после перевязки общих сонных артерий по сравнению с группой контроля, а оказываемое им нейропротекторное действие превосходило таковое у пирасетама. При оценке неврологического дефицита по шкале McGraw отмечено, что у животных с перевязанными общими сонными артериями, получавшими соединение-лидер, неврологической дефицит был наименьшим среди всех исследуемых групп.

Ключевые слова: гидроксибензоилхлориды, аминокислоты, дипептиды, биологическая активность, нейропротекторное действие

**ACYL CHLORIDES OF HYDROXYBENZOIC ACIDS AND AMIDES
AS HALF-PRODUCTS IN THE SYNTHESIS OF N-ACYLATED PEPTIDES**

Brel A.K., Lisina S.V., Budaeva Yu.N., Klochkova E.A., Sokolova S.V.

Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail: svlisina@gmail.com

The synthesis of acyl chlorides of hydroxybenzoic acids and amides has been carried out in the reaction of hydroxybenzoic acids and amides with oxalyl chloride (the ratio 1:1,1) in the presence of N,N-dimethylformamide in benzene. The yield observed was close to 90%. The structure of compounds was confirmed by ¹H NMR and element analysis. Synthesized chlorides are important half-products in drug chemistry. Using those chlorides the series of potent biologically active hydroxybenzoyl peptides and water-soluble potassium salts have been synthesized. The leader – 4-[(4'-salicyloylamino)butanoylamino]butanoic acid – has demonstrated significant neuroprotective activity in rats after cerebral ischemia induced by vessel-occlusion. As shown, 4-[(4'-salicyloylamino)butanoylamino]butanoic acid has the potential to become an effective neuroprotective therapeutic agent. Analysis revealed a highly significant neuroprotective effect exceeded the action of Piracetam. The average score of the most active N-acylated dipeptide by C.P. McGraw scale was the lowest among all groups, and mortality decreased in comparison with control.

Keywords: hydroxybenzoyl chlorides, amino acids, dipeptides, biological activity, neuroprotective action

Как известно, среди производных карбоновых кислот галогенангидриды имеют наибольшее значение [1]. Ацилгалогениды, ацилхлориды в частности, используются в качестве промежуточных полупродуктов в органическом синтезе. Применение хлоридов фосфора для синтеза хлорангидридов карбоновых кислот, в частности гидроксибензойных кислот, сопряжено с рядом технологических трудностей [2]. Взаимодействие ароматических гидроксикислот с хлористым тионилом [2, 3] дает наиболее высокие выходы хлорангидридов до 89% при проведении реакции в присутствии каталитических количеств ДМФА или пиридина. Недостатком этого метода являются

повышенные требования к качеству хлористого тионила. Хлористый тионил рекомендуется дополнительно очищать. Необходим тщательный контроль температурного режима (около 30 °С, мягкое кипение), снижение или повышение температуры ведет к негативным последствиям. Зачастую избыток тионилхлорида удаляют отгонкой с получением целевого гидроксибензоилхлорида, который используют без дальнейшей очистки [4] во избежание дополнительного нагрева продукта. Для получения химически чистого гидроксибензоилхлорида требуется дополнительная многократная очистка, так как синтезированный с помощью тионилхлорида гидроксибензоилхлорид содержит

1–2% серосодержащих примесей, образующихся вследствие химического взаимодействия хлористого тионила с фенольным гидроксиллом гидроксибензойной кислоты. Это приводит не только к загрязнению целевых продуктов, что является существенным недостатком в процессах синтеза биологически активных веществ и лекарственных препаратов [5, 6], но и к существенному снижению выхода в многостадийных синтезах.

Цель исследования: синтезировать гидроксибензоил хлориды высокой чистоты без снижения выхода целевых веществ и, далее, на их основе получить новые биологически активные N-гидроксибензоил дипептиды и их водорастворимые калиевые соли.

Материалы и методы исследования

Перечисленных выше недостатков позволил избежать способ получения хлорангидридов карбоновых кислот взаимодействием оксалилхлорида с кислотами [2], однако применение этого метода для получения хлорангидридов гидроксибензойных кислот и их амидов с аминокислотами в литературных источниках не описано. Нами впервые применен этот способ в синтезе хлорангидридов 2-, 3- и 4-гидроксибензойных кислот и их функциональных производных (схема).

Процесс осуществляли при молярном соотношении реагентов гидроксибензойная кислота : оксалилхлорид : диметилформамид, равном 1:1,1:0,07 в бензоле, при нагревании до температуры кипения растворителя.

N-ацилированные дипептиды на их основе гидроксибензоил хлоридов получены по методике, описанной в [5]. ЯМР ^1H записаны на спектрометре «Bruker DRX500», с рабочей частотой 500 МГц, растворитель ДМСО-d₆. Температуры плавления определяли капиллярным методом на приборе Stuart SMP-30 при скорости нагрева 10 град/мин.

Общая методика синтеза 4-(гидроксибензоиламино)бутирил хлоридов. К раствору 20 ммоль 4-(гидроксибензоиламино)бутановой кислоты в 50 мл безводного бензола при перемешивании постепенно прибавляли 60 ммоль оксалил хлорида и 0.2 мл N,N-диметилформамида. Смесь кипятили 1 ч. Выпавший после охлаждения смеси до комнатной температуры осадок хлорангидрида отфильтровывали, промывали холодным гексаном и высушивали.

4-(Салицилоиламино)бутирил хлорид выделяли в виде белого кристаллического вещества. Выход 4.35 г (90%), т. пл. 56 °С. Содержание активного хлора: вычислено, %: Cl 14.67; найдено, %: Cl 14.67.

Общая методика синтеза 4-[(4'-гидроксибензоиламино)бутаноиламино]бутановых кислот и их калиевых солей. К смеси 20 мл воды, 10 ммоль гамма-аминомасляной кислоты и 25 ммоль NaOH при перемешивании и охлаждении присыпали 10 ммоль 4-(гидроксибензоиламино)бутаноил хлорида, контролируя pH среды (pH > 7). Смесь перемешивали 3 ч, подкисляли HCl и образовавшийся осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из этанола.

4-[(4'-Салицилоиламино)бутаноиламино]бутановой кислоты в виде белого кристаллического вещества. Выход 2.34 г (76%), т. пл. 257 °С. $R_f = 0.35$ (хлороформ–этилацетат = 1:2). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. (J, Гц): 9.84 с (1H, OH), 8.35 с (1H, COOH), 7.62 д (1H, Ph), 7.25 с (1H, NH), 7.35–7.27 м (2H, Ph, J 6.3 Гц), 6.93 д (1H, Ph), 4.69 с (1H, NH), 3.32–3.16 м (4H, 2CH₂, J 12.7 Гц), 2.32–2.13 м (4H, 2CH₂, J 9.6 Гц), 1.89–1.68 м (4H, 2CH₂, J 7.8 Гц). Найдено, %: C 58.40, H 6.53, N 9.1. C₁₅H₂₀N₂O₅. Вычислено, %: C 58.43, H 6.54, N 9.09.

Затем в реакторе смешивают 10 ммоль 4-[(4'-гидроксибензоиламино)бутаноиламино]бутановой кислоты, 20 ммоль этилата калия и 50 мл бензола, перемешивают при кипении в течение 30 мин. После охлаждения продукт отделяют фильтрованием, промывают небольшим количеством бензола и сушат.

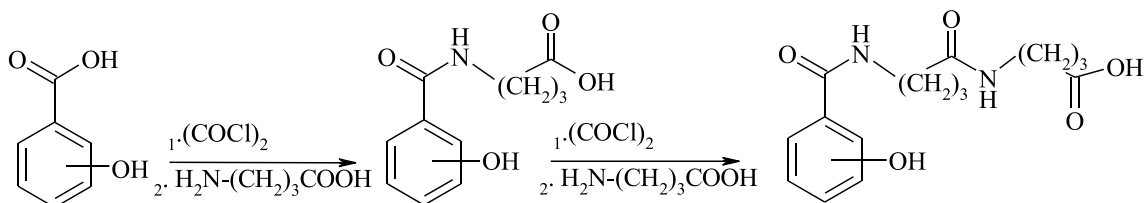
Дикалиевая соль 4-[(4'-гидроксибензоиламино)бутаноиламино]бутановой кислоты получена с выходом 97%. Т. пл. = 302 °С с разложением. C₁₅H₁₈K₂N₂O₅: вычислено, %: C 46.85, H 4.72, K 20.34, N 7.29; найдено, %: C 46.82, H 4.73, K 20.31, N 7.30.

Определение нейропротекторного действия веществ при недостаточности мозгового кровообращения, вызванного необратимой двусторонней окклюзией общих сонных артерий у крыс. Исследование выполняли на половозрелых беспородных крысах-самках 180–200 г, 3,5–4-месячного возраста, доставленных из питомника ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (д. Рапполово, Ленинградская область). Все животные после транспортировки из питомника содержали в стандартных условиях вивария с 12 ч/12 ч световым циклом, температурой воздуха 20 ± 2 °С и влажностью 40–60% и проходили двухнедельный карантин, по окончании которого включались в исследование.

В ходе выполнения экспериментов были сформированы следующие группы:

1) ЛО (ложнооперированные) – животные, получавшие физиологический раствор, но лигатуры не затягивали;

2) контроль – животные, получавшие физиологический раствор и которым недостаточность мозгового кровообращения вызывали путем одномоментной двусторонней окклюзии общих сонных артерий (OCA);



Синтез производных 4-[(4'-гидроксибензоиламино)бутаноиламино]бутановых кислот

3) исследуемое соединение – животные, которым также перевязывали ОСА, но получавшие изучаемое соединение в дозе 38 мг/кг внутривентриально (профилактически однократно за 30 мин до перевязки и далее начиная с третьего дня после операции каждые 24 ч в течение трех дней;

4) пирацетам – животные, которым перевязывали ОСА, но получавшие пирацетам в дозе 800 мг/кг внутривентриально (в том же режиме, что и тестируемое соединение).

Операционные вмешательства выполнялись с использованием хлоралгидрата (в дозе 400 мг/кг). Для оценки нейропротекторного действия патентуемого соединения при недостаточности мозгового кровообращения использовали модель одномоментной необратимой билатеральной окклюзии ОСА. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel и BioStat 2008 5.2.5.0. с использованием критерия Манна – Уитни, точного критерия Фишера. О нейро-

протекторном действии соединения судили по увеличению выживаемости животных после двусторонней ОСА и уменьшению у них выраженности неврологического дефицита по шкале McGraw, когнитивных нарушений в тестах «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) и «Экстраполяционного избегания» (ТЭИ) [5, 7].

Результаты исследования и их обсуждение

Впервые примененный способ в синтезе хлорангидридов 2-, 3- и 4-гидроксибензойных кислот позволил не только избежать недостатков способов, освещенных в литературных источниках, но и получить хлорангидриды гидроксибензойных кислот с выходами до 91% с высокой степенью чистоты.

Таблица 1

Выживаемость животных с недостаточностью мозгового кровообращения, вызванной необратимой одномоментной билатеральной окклюзией общих сонных артерий (ОСА)

Группа животных	N	Выживаемость животных после ОСА, %				
		6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	8	100	100	100	100	100
Контроль	10	80	60*	60*	50*	40*
дикалиевая соль 4-[(4'-салицилоиламино)бутаноиламино]бутановой кислоты	10	100	80	80	80^	80^#
Пирацетам	10	80	80	70	60*	50*

Примечание: N – количество животных в группе; ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны по сравнению с ЛО группой ($p < 0,05$); ^ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – различия достоверны по сравнению с группой, получавшей пирацетам ($p < 0,05$, Хи-квадрат).

Таблица 2

Результаты оценки неврологического дефицита по шкале McGraw (в баллах), тестов «условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) и «экстраполяционного избегания» (ТЭИ), исследование животных в которых проводилось через 72 ч после окклюзии ОСА ($M \pm m$)

Показатели	Группы животных			
	ЛО	Контроль	дикалиевая соль 4-[(4'-салицилоиламино)бутаноиламино]бутановой кислоты	Пирацетам
Неврологический дефицит животных по шкале McGraw (в баллах)	1,3 ± 0,1	6,7 ± 1,4*	2,8 ± 1,2^	5,8 ± 1,4
ЛП захода в ТО в УРПИ	180	74 ± 38,3*	159,5 ± 16	123,6 ± 34,6
% незашедших животных в темный отсек в УРПИ	100	25*	75^	60
ЛП подныривания в ТЭИ	15,8 ± 1,5	83,8 ± 34,1*	24 ± 8,3	51,4 ± 32,2

Примечание: ЛП захода в ТО в УРПИ – латентный период (с) захода животных в темный отсек в УРПИ; КЗ в УРПИ – количество заходов одного животного в темный отсек в УРПИ; ЛП подныривания в ТЭИ – латентный период (с) подныривания в ТЭИ; ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с ЛО ($p < 0,05$); ^ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Исследования биологической активности показали, что один из лидеров – дикалиевая соль 4-[(4'-салицилоиламино)бутаноиламино]бутановой кислоты – достоверно повышал (в среднем на 20–50%) выживаемость крыс после перевязки ОСА по сравнению с группой контроля (контроль-ишемия), при этом случаи смерти среди животных данной группы наблюдались только в начальный период (с 6 до 12 ч) (табл. 1). Оказываемое им нейропротекторное действие превосходило таковое у пирасетама. При оценке неврологического дефицита по шкале McGraw отмечено, что у животных с перевязанными ОСА, получавшими соединение-лидер, неврологический дефицит был наименьшим среди всех исследуемых групп (табл. 2). При выполнении и анализе результатов тестов УРПИ и ТЭИ отмечено, что выжившим животным с ОСА, получавшим полученное соединение, в тесте ТЭИ требовалось меньшее время для решения задачи экстраполяционного избавления, а в тесте УРПИ в темную камеру заходило 75% животных (в группе контроля 25%), что свидетельствует о сохранении памятного следа, связанного с аверсивным воздействием.

Заключение

Высокий выход хлорангидридов гидроксibenзойных кислот, их чистота, использование доступных исходных соединений и легкость оформления процесса обуславливают наибольшую технологичность предлагаемого способа синтеза гидроксibenзоил хлоридов, что позволит получать N-гидроксibenзоилацилированных пептидов с разным числом и последовательностью аминокислотных остатков. Синтезированные таким путем гидроксibenзоилхлориды являются ценными продуктами в химии лекарственных препаратов. Учитывая, что дикалиевая соль 4-[(4'-салицилоиламино)бутаноиламино]бутановой кислоты увеличивает выживаемость животных и снижает выраженность неврологических нарушений, в том числе когнитивного дефицита, после окклюзии общих сонных артерий, заявленное соеди-

нение может найти применение при создании новых лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения ишемического генеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-43-02445).

Список литературы

1. Титце Л., Айхер Т. Препаративная органическая химия. М.: Мир, 1999. С. 704.
2. Konovalov A.I., Antipin I.S., Burirov V.A., Madzhidov T.I., Kurbangalieva A.R., Nemtarev A.V., Solovieva S.E., Stoikov I.I., Mamedov V.A., Zakharova L.Y., Gavrilova E.L., Sinyashin O.G., Balova I.A., Vasilyev A.V., Zenkevich I.G., Krasavin M.Y., Kuznetsov M.A., Molchanov A.P., Novikov M.S., Nikolaev V.A., Rodina L.L., Khlebnikov A.F., Beletskaya I.P., Vatsadze S.Z., Gromov S.P., Zyk N.V., Lebedev A.T., Lemenovskii D.A., Petrosyan V.S., Nenaaidenko V.G., Negrebetskii V.V., Baukov Y.I., Shmigol' T.A., Korlyukov A.A., Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E., Traven' V.F., Voskresenskii L.G., Zubkov F.I., Golubchikov O.A., Semeikin A.S., Berezin D.B., Stuzhin P.A., Filimonov V.D., Krasnokutskaya E.A., Fedorov A.Y., Nyuchev A.V., Orlov V.Y., Begunov R.S., Rusakov A.I., Kolobov A.V., Kofanov E.R., Fedotova O.V., Egorova A.Y., Charushin V.N., Chupakhin O.N., Klimochkin Y.N., Osyanin V.A., Reznikov A.N., Fisyuk A.S., Sagitullina G.P., Aksenov A.V., Aksenov N.A., Grachev M.K., Maslennikova V.I., Koroteev M.P., Brel' A.K., Lisina S.V., Medvedeva S.M., Shikhaliev K.S., Suboch G.A., Tovbis M.S., Mironovich L.M., Ivanov S.M., Kurbatov S.V., Kletskii, M.E., Burov O.N., Kobrakov K.I., Kuznetsov D.N. Modern Trends of Organic Chemistry in Russian Universities. Russian Journal of Organic Chemistry. 2018. № 54 (2). P. 157–371. DOI: 10.1134/S107042801802001X.
3. Betebenner D.A., DeGoev D.A., Maring C.J., Krueger A.C., Iwasaki N., Rockway T.W., Cooper C.S., Anderson D.D., Donner P.L., Green B.E., Kempf D.J., Liu D., McDaniel K.F., Madigan D.L., Motter C.E., Pratt J.K., Shanley J.P., Tufano M.D., Wagner R., Zhang R., Molla A., Mo H., Pilot-Matias T.J., Masse S.V.L., Carrick R.J., He W., Lu L., Grampovnik D.J. Antiviral compounds // Patent. US № 7910595. 2011.
4. Нгуйен Т.Т. Полисахарид с привитым антиоксидантом и способ его получения // Патент РФ 2174985. Патентообладатель Геркулес Инкорпорейтед (US). 2001. Бюл. № 29.
5. Brel' A.K., Tyurenko, I.N., Lisina S.V., Popov S.S., Verkholyak D.V., Budaeva Y.N., Volotova E.V., Atapina N.V., Kurkin D.V. Acetoxybenzoylglycylglycines as Potential Cerebroprotective Compounds. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2018. № 52 (1). P. 37–41. DOI: 10.1007/s11094-018-1762-0.
6. Bruckner R. Organic mechanism: reactions, stereochemistry and synthesis. Springer. 2010. P. 276.
7. Мирзоян П.С. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени. Руководство по доклиническому изучению лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. С. 944.