



УДК 547.466'835.3.057

## СИНТЕЗ АКРИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРАЗИДОВ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОТИВОМАЛЯРИЙНАЯ АКТИВНОСТЬ

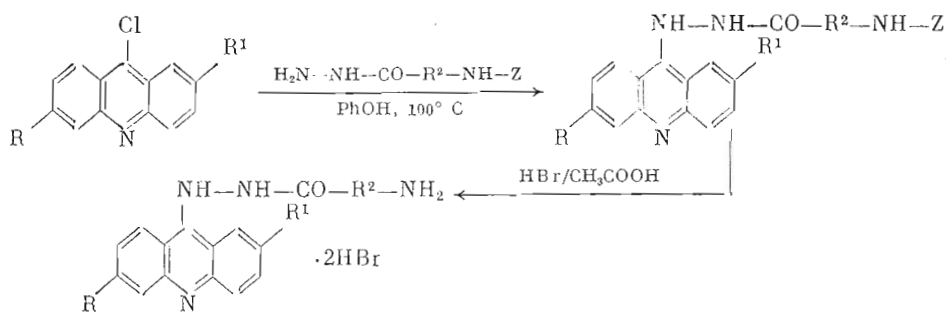
Шибнев В. А., Финогенова М. П., Гринберг Л. Н\*.,  
Аллахвердиев А. М.\*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР,  
Москва;

\* Институт медицинской паразитологии и тропической медицины  
им. Е. И. Марциновского Минздрава СССР,  
Москва

Осуществлен синтез 2-метокси-6-хлор- и 2-этокси-6-нитроакридин-9-илгидразидов аминокислот. Изучена их противомаларийная активность в отношении хлорохинчувствительного и хлорохинустойчивого штаммов тропической малярии *Plasmodium falciparum* in vitro. Большинство соединений ингибирует рост малярийного паразита с  $IC_{50} = (2-6) \cdot 10^{-7}$  М.

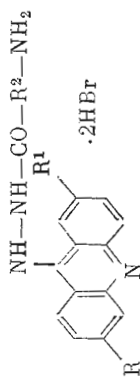
Способность ряда гетероциклических соединений интеркалировать в двухспиральную ДНК открывает новые подходы в создании биологически активных соединений. Среди них привлекает внимание классический интеркалятор — акридиновый гетероцикл, производные которого способны связываться с молекулами двухспиральной ДНК и тем самым ингибировать биосинтез [1]. Этот факт позволил нам на базе производных акридина предпринять синтез новых соединений, обладающих ингибирующей активностью. Ранее мы уже сообщали о синтезе соединений с аминокислотными или пептидными заместителями в 9-положении акридинового гетероцикла [2, 3]. Было изучено их взаимодействие с ДНК и показано, что некоторые из них довольно эффективно ингибируют ДНК-зависимую РНК-полимеразу [4, 5]. Это относится и к соединениям, в которых остатки аминокислот или пептидов связаны с гетероциклом через гидразидную группу. Показано, что определенную роль в процессе ингибирования играют как заряд аминокислотного или пептидного заместителя, так и его длина [4]. В настоящей работе мы описываем синтез ряда подобных соединений, исходя из гидразидов глицина,  $\alpha$ - и  $\beta$ -аланина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты и  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты, которые взаимодействовали с 2-метокси-6,9-дихлор- или 2-этокси-6-нитро-9-хлоракридином по следующей схеме:



де R = Cl или NO<sub>2</sub>; R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub> или OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; R<sup>2</sup> = CH(CH<sub>3</sub>) или (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (n = 1, 2, 3 и 5).

В основу синтеза положена хорошо изученная реакция взаимодействия производных 9-хлоракридина с аминами в среде фенола при 100° С [6]. Следует отметить, что плохая растворимость Z-производных акридинилгидразидов аминокислот, получаемых с выходами 80–90%, затрудняла их

Характеристики дибромгидратов акридиновых производных гидразидов аминокислот и их противомаларийная активность



Соединение	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Выход, %	Т. пл. (разл.), °C	R <sub>f</sub>			λ <sub>max</sub> , нм	IC <sub>50</sub> *, мкМ	
						A	B	B		хлорохинустойчивый штамм	хлорохинустойчивый штамм
VI	Cl	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	98	244-245	0,81	0,68	0,23	444,475	0,6 <sup>2*</sup>	н.и.
VII	Cl	OCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )	97	253-255	0,79	0,81	0,25	446,475	0,6 <sup>2*</sup>	»
VIII	Cl	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	87,5	250-252	0,78	0,53	0,13	425	0,5 <sup>2*</sup>	0,1 <sup>2*</sup>
IX	Cl	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	94	249-252	0,76	0,41	0,10	423	н.и.	0,2 <sup>2*</sup>
X	Cl	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	95	265-268	0,72	0,40	0,10	423	»	>1 <sup>2*</sup>
XI	NO <sub>2</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub>	95	248-251	0,80	0,75	0,45	477	»	н.и.
XII	NO <sub>2</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )	71	236-237	0,82	0,81	0,45	485	»	0,3
XIII	NO <sub>2</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	92	250-252	0,76	0,61	0,24	465	0,6	н.и.
XIV	NO <sub>2</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	96	244-246	0,75	0,51	0,20	470	0,2	»
XV	NO <sub>2</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	76	249-252	0,75	0,48	0,18	467	н.и.	»

\* IC<sub>50</sub> — концентрация соединения, ингибирующая рост плазмодия на 50%; для акридина IC<sub>50</sub> = 0,025 мкМ (хлорохинустойчивый штамм); н.и. — не испытывалось.  
<sup>2\*</sup> Для биологических испытаний использовались в виде диангатов.

очистку, поэтому мы охарактеризовали конечные продукты лишь после удаления Z-групп гидробромиололизом. Полученные дибромгидраты акридинилгидразидов аминокислот (таблица) представляют собой окрашенные кристаллические вещества (6-нитропроизводные — сранжевые, а 6-хлорпроизводные — желтые), растворимые в воде, умеренно в спирте и труднорастворимые в таких органических растворителях, как хлороформ, этилацетат.

Кроме потенциальной способности синтезированных соединений ингибировать биосинтез обращает на себя внимание структурная близость их с широко известным, но достаточно токсичным противомаларийным препаратом акрихином (терасгине), у которого в 9-положении того же гетероцикла находится заместитель —  $\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ . Принимая во внимание также расширение в мире ареала малярии и развитие резистентности возбудителей этого заболевания к известным препаратам, мы решили оценить противомаларийную активность наших соединений в культуре хлорохинчувствительного\* и хлорохинустойчивого штаммов возбудителя тропической малярии *Plasmodium falciparum*.

Непрерывная культура *P. falciparum*, которая поддерживается в ИМПЦТМ им. Е. И. Марциновского, позволяет использовать ее в качестве модели для поиска новых противомаларийных соединений. Результаты исследования, представленные в таблице, показывают, что все испытанные соединения в той или иной степени обладают противомаларийной активностью. Эффект ингибирования обнаруживается как в хлорохинчувствительном, так и в хлорохинустойчивом штаммах *P. falciparum*, причем активности соединений в отношении хлорохинустойчивого штамма, как правило, выше, чем в отношении хлорохинчувствительного. Это позволяет рассматривать испытанные соединения как перспективные на современном этапе поиска антималярийных соединений.

Следует отметить, что ингибирующий эффект почти всех испытанных соединений проявляется в диапазоне концентраций от  $10^{-7}$  до  $10^{-6}$  М. Этот диапазон совпадает с теми концентрациями антималярийных соединений — производных акридина и хинолина, которые образуются в плазме крови при приеме терапевтических доз препаратов [7]. По сравнению с акрихином испытанные соединения имеют активность примерно на порядок ниже. Если при этом снижение специфической активности будет сопровождаться снижением токсичности (акрихин весьма токсичен), то терапевтический индекс этих препаратов может оказаться в допустимых пределах. Из результатов следует, что  $\beta$ -аланиновые и  $\gamma$ -аминомасляные производные как 6-хлор-, так и 6-нитроакридина заслуживают дальнейшего изучения в опытах на животных.

### Экспериментальная часть

В работе использовали L- $\alpha$ -аланин и  $\beta$ -аланин (Reanal, ВНР), остальные аминокислоты — «Союзреактив» (СССР), 2-метокси-6,9-дихлоракридин (Aldrich, США), 2-этокси-6-нитро-9-хлоракридин синтезирован по методу [6]. Фенол предварительно перегоняли. Чистоту полученных продуктов контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах *n*-бутанол — вода — уксусная кислота — пиридин, 15 : 12 : 3 : 10 (А); этанол — ацетон — триэтиламин, 1 : 1 : 0,05 (Б); *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 10 : 3 : 1 (В) и хлороформ — метанол, 60 : 13 (Г). Для аналитической характеристики образцы приготавливались с помощью препаративной ТСХ на пластинках Silufol в системе (Г). Гидразиды аминокислот и их производные обнаруживали на хроматограммах прогреванием, а также окрашиванием пингидрином или бихроматом натрия, а все производные акридина — по поглощению в видимом и УФ-освещении. Температуру плавления (неисправленная) определяли в капилляре. УФ-поглощение водных растворов измеряли на приборе Spedcord M-40 (ГДР), ИК-спектры снимали в таблетках КВг на приборе UR-20 (ГДР). Данные элементного анализа на С, Н, N у соединений, приведенных в таблице, показали хорошее соответствие с вычисленными величинами. Испытания биологической активности соединений проводили в эритроцитарной культуре возбудителя тропической малярии *P. falciparum*. Использовали 2 штамма HZ-25 (хлорохинчувствительный, получен из Женевы) и F-25 (хлорохинустойчивый, получен из Ханоя).

$\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{COOC}_2\text{H}_5$  (I). К 20,0 г (152 ммоль)  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты прибавляли раствор 15 мл  $\text{SOCl}_2$  в 270 мл абс. этанола и перемешивали 20 ч при

\* Хлорохин — широко применяемый в мире противомаларийный препарат.

комнатной температуре. Растворитель упаривали, остаток растворяли в абс. этаноле и осаждали эфиром. Выход 27,1 г (91%), т. пл. 110–112°С,  $R_f$  0,50 (Б); 0,31 (Г).

$HCl \cdot H_2N(CH_2)_3COOC_2H_5$  (II) — получали аналогично соединению (I), исходя из  $\gamma$ -аминонасыщенной кислоты. Выход 93%, т. пл. 87–89°С,  $R_f$  0,50 (Б); 0,27 (Г).

$Z-NH(CH_2)_3CO-NHNH_2$  (III). К смеси 10,0 г (51 ммоль)  $HCl \cdot H_2N(CH_2)_3COOC_2H_5$ , 44 мл воды и 100 мл  $CHCl_3$  при  $-5^\circ C$  и энергичном перемешивании прибавляли тремя порциями 2,68 г (66,3 ммоль)  $MgO$  и одновременно по каплям 11,34 г (66,3 ммоль)  $Z-Cl$ , перемешивали 1,5 ч, нагревали до 20°С и прибавляли 2,6 мл пиперидина, через 5 мин подкисляли 6 н.  $HCl$  (по конго). Хлороформный слой отделяли, последовательно промывали 0,5 н.  $HCl$ , водой, 5%  $NaHCO_3$ , снова водой, сушили  $Na_2SO_4$  и упаривали в вакууме. Полученный маслообразный остаток досушивали трехкратным упариванием с абс. этанолом. Получали 11,2 г хроматографически чистого  $Z-NH(CH_2)_3COOC_2H_5$ , который растворяли в 60 мл абс. этанола и прибавляли 5 мл 100% гидразингидрата, оставляли на 2 сут при комнатной температуре, нагревали 4 ч при 50°С. Упаривали смесь досуха, растворяли в  $CHCl_3$ , промывали водой, сушили  $Na_2SO_4$  и упаривали в вакууме. Остаток пересаждали дважды из  $CHCl_3$  эфиром. Выход 6,57 г (43,7%), т. пл. 100–104°С,  $R_f$  0,83 (Б); 0,47 (Г).

$Z-NH(CH_2)_3CO-NHNH_2$  (IV) — получали аналогично соединению (III), исходя из соединения (II), с выходом 49,7%, т. пл. 92–94°С,  $R_f$  0,77 (Б); 0,44 (Г).

$Z-NH(CH_2)_3CO-NHNH-Mca^*$  (V). 1,0 г (3,6 ммоль)  $Mca-Cl$  и 5,0 г свежесреднего фенола нагревали 40 мин при 100°С, прибавляли 1,0 г (3,6 ммоль) соединения (III), перемешивали 2,5 ч при 60–80°С. Смесь охлаждали, прибавляли в избытке сухой эфир, выпавший ярко-желтый осадок тщательно растирали и промывали эфиром до полного удаления фенола. Осадок фильтровали, промывали горячей смесью  $CHCl_3-CH_3OH$  (3:1) для удаления акридова ( $R_f$  0,82 (Г)). Выход 1,5 г (80%).

Остальные  $Mca$ - и  $Epa^{**}$ -производные получали аналогично соединению (V), исходя из  $Mca-Cl$  или  $Epa-Cl$  и соответствующих гидразидов  $Z$ -производных глицина,  $L$ - $\alpha$ -аланина,  $\beta$ -аланина, полученных по методу [8].

$H_2N(CH_2)_3CO-NHNH-Mca \cdot 2HBr$  (VI). 1,0 г (1,8 ммоль) соединения (V) растворяли при небольшом нагревании в 6 мл абс.  $CF_3COOH$ , охлаждали и прибавляли 15 мл 30%  $HBr$  в ледяной  $CH_3COOH$ . Через 40 мин продукт выпадал в виде желтого кристаллического осадка. Растворитель упаривали в вакууме при 30–35°С и сухой остаток тщательно растирали дважды с сухим эфиром, отфильтровывали, промывали горячим  $CHCl_3$  до удаления окрашенных примесей и перекристаллизовывали из метанола. Выход и характеристики соединения (VI) приведены в таблице. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 3330 и 3240 ( $NH_2$ ), 1598 и 1500 ( $NH_3^+$ ), 1500 ( $CH_2$  при  $NH_3^+$ ), 1670 ( $C=O$ ), 1380 и 1473 ( $-CH_2-$ ), 1740 ( $CO-NHNH$ ) [9, 10].

Аналогично получали соединения (VII)–(XV), выходы и характеристики которых приведены в таблице.

Культивирование проводили по методу Трегера и Йенсена [11], соединения прибавляли в культуральные чашки в виде водных растворов. Конечные концентрации соединений варьировали от  $2,5 \cdot 10^{-8}$  до  $1 \cdot 10^{-6}$  М. Оценку ингибирующего эффекта проводили, исходя из количества малярийных паразитов (на 1000 эритроцитов) до и после 48-часовой инкубации с препаратом. Коэффициент ингибирования вычисляли по формуле

$$K = \left( 1 - \frac{П_x - П_0}{П_k - П_0} \right) \cdot 100\%$$

где  $П_0$  — число малярийных паразитов до инкубации,  $П_k$  — число малярийных паразитов после инкубации без препаратов,  $П_x$  — число малярийных паразитов после инкубации с препаратами.

Затем строили кривые зависимости коэффициента ингибирования от концентрации соединений. Исходя из этих кривых определяли концентрации, дающие 50%-ый эффект. Каждую концентрацию испытывали дважды в одном опыте. Опыты повторяли до получения воспроизводимых результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Toral M. D. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 11. P. 2367–2372.
2. Шибнев В. А., Финогенова М. П., Газумян А. К., Полегаев А. И., Марьяш Л. И. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 5. С. 610–617.
3. Шибнев В. А., Финогенова М. П., Полегаев А. И., Марьяш Л. И. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 7. С. 921–926.
4. Шибнев В. А., Речинский В. О., Марьяш Л. И., Финогенова М. П. // VI Всесоюзный симпозиум по химии белков и пептидов. Рига: Знание, 1983. С. 338–339.
5. Финогенова М. П., Шибнев В. А. // VI Всесоюзный симпозиум по химии белков и пептидов. Рига: Знание, 1983. С. 337–338.
6. Воробьев М. А., Чернылева А. Т., Кузьмичева Т. П. // Материалы по обмену передовым опытом и научными достижениями в химико-фармацевтической промышленности. М.: ВНИХФИ, 1958. № 1. С. 97–101.

\*  $Mca$  — 2-метокси-6-хлоракридин-9-ил.

\*\*  $Epa$  — 2-этокси-№-нитроакридин-9-ил.

7. Chemotherapy of malaria/Ed. L. Y. Brucc-Schwaff, Wld. Hlth. Org., 1981. P. 56-91.
8. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. Пер. с англ. М.: Мир, 1965. С. 447-456.
9. Mashima M. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1962. V. 35. P. 332-337, 1882-1889.
10. Беллами Л. Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул: Пер. с англ. М.: Мир, 1971.
11. Trager W., Jensen J. B. // Science. 1976. V. 193. P. 673-675.

Поступила в редакцию  
27.V.1988.

## SYNTHESIS OF ACRIDINE DERIVATIVES OF AMINO ACID HYDRAZIDES AND THEIR ANTIMALARIAL ACTIVITY

SHIBNEV V. A., FINOGENOVA M. P., GRINBERG L. N.\*, ALLACHVERDIEV A. M.\*

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR:  
\* E. I. Martsinovsky Institute of Medical Parasitology  
and Tropical Medicine, Ministry of Health of the USSR, Moscow*

2-Methoxy-6-chloroacridine-9-yl- and 2-ethoxy-6-nitroacridine-9-yl-hydrazides of glycine,  $\alpha$ - and  $\beta$ -alanines,  $\gamma$ -aminobutyric acid,  $\epsilon$ -aminocaproic acid have been synthesized and their antimalarial activity has been investigated. The compounds were found to inhibit the growth of malaria parasite *P. falciparum* in in vitro cultures. Fifty per cent inhibitory concentrations ranged from  $2 \cdot 10^{-7}$  to  $6 \cdot 10^{-7}$  M and corresponded to therapeutic concentrations of known quinoline and acridine antimalarial drugs. The  $\beta$ -alanine and  $\gamma$ -aminobutyric acid derivatives were the most active and showed high activity against a chloroquine resistant strain of *P. falciparum*.