

Антигельминтная активность новых производных арилсалициламидов

Д.П. Севбо, А.Ю. Малахова, В.Н. Куклин

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет;
Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, лит. А

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Севбо Дмитрий Петрович – профессор кафедры фармацевтической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПГХФУ), доктор фармацевтических наук (до октября 2016 г.).

Малахова Анна Юрьевна – старший преподаватель кафедры фармацевтической химии СПГХФУ, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (903) 096-28-37. E-mail: annamalahova@yandex.ru

Куклин Владимир Николаевич – профессор кафедры фармацевтической химии СПГХФУ, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (909) 586-94-54. E-mail: kuklin-prof@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Среди болезней и травм 4-е место занимает заболеваемость кишечными гельминтозами. Согласно анализу ассортимента антигельминтных средств, большинство их, зарегистрированных в РФ, зарубежные, основные из них – производные салициламидов.

Цель исследования. Синтез новых замещенных амидов салициловой кислоты, обладающих антигельминтной активностью, и установление связи между структурой и их биологическим действием.

Материал и методы. Для идентификации синтезированных соединений определяли температуру плавления, УФ-, ИК-спектры в дисках с калия бромидом, ЯМР ¹H спектры в растворе ДМСО-d₆. Также использовали различные методы хроматографического анализа: ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ. Биологическую активность и токсичность изучали на белых мышах-самцах.

Результаты. Синтезированные арилсалициламиды обладают более высокой антигельминтной активностью по сравнению с препаратом «Фенасал». Определена их острая токсичность (LD₅₀), большинство синтезированных соединений практически не токсичны. Изучение связи антигельминтной активности и токсичности со строением показало, что амиды, содержащие атомы хлора во фрагменте кислоты, более активны, чем содержащие атомы брома; замена метильной группы в амиде на алкоксигруппу во фрагменте ариламина приводит к снижению острой токсичности и к увеличению антигельминтной активности. Ацетилирование фенольного гидроксильного арилсалициламидов снижает острую токсичность.

Заключение. Изучена связь антигельминтной активности и токсичности со строением арилсалициламидов. Показано, как влияет природа заместителя во фрагменте салицилоила и ариламина на токсичность и антигельминтную активность. Для расширенных испытаний предложен 2,4-дихлор-6-([4-метил-3-хлорфенил]карбамоил)фенилацетат.

Ключевые слова: производные арилсалициламидов, токсичность, связь, структура, активность.

Для цитирования: Севбо Д.П., Малахова А.Ю., Куклин В.Н. Антигельминтная активность новых производных арилсалициламидов. Фармация, 2019; 68 (4): 60–64. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-09>

ANTHELMINTIC ACTIVITY OF NOVEL ARYLSALICYLAMIDE DERIVATIVES

D.P. Sevbo, A.Yu. Malakhova, V.N. Kuklin

Saint Petersburg State Chemopharmaceutical University, 14, Prof. Popov St., Lit A, Saint Petersburg 197376, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Sevbo Dmitriy Petrovich – Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry of the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, MD until October 2016.

Malakhova Anna Jur'evna – lecturer of the Department of Pharmaceutical Chemistry of the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, PhD. Tel.: +7 (903) 096-28-37. E-mail: annamalahova@yandex.ru

Kuklin Vladimir Nikolaevich – Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry of the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, MD. Tel.: +7 (909) 586-94-54. E-mail: kuklin-prof@yandex.ru

SUMMARY

Introduction. The incidence of intestinal helminthiases ranks fourth among diseases and injuries. Analysis of a range of anthelmintic drugs has shown that most of the agents registered in the Russian Federation are manufactured in foreign countries; the main drugs of which are salicylamide derivatives.

Objective: to synthesize novel substituted salicylic acid amides with anthelmintic activity and to establish a structure-biological activity relationship.

Material and methods. To identify the synthesized compounds, their melting point, UV and IR spectra in potassium bromide disks, and ¹H NMR spectra in a DMSO-d₆ solution were determined. Various methods for chromatographic analysis, such as TLC, GLC, HPLC, were also employed. Biological activity and toxicity were investigated in male albino mice.

Results. The synthesized arylsalicylamides were found to have a higher anthelmintic activity than fenasa. Their acute toxicity (LD_{50}) was determined; most of the synthesized compounds were practically non-toxic. A study of the relationship of their anthelmintic activity and toxicity to the structure showed that the amides containing chlorine atoms in the acid fragment were more active than those containing bromine atoms; replacing the methyl group in an amide to the alkoxy group in the arylamine fragment led to a decrease in acute toxicity and an increase in anthelmintic activity. Acetylation of phenolic hydroxyl arylsalicylamides reduced acute toxicity.

Conclusion. The relationship of the anthelmintic activity and toxicity of arylsalicylamides to their structure was studied, which showed how the nature of the substituent in the salicyloyl and arylamine fragments affected toxicity and anthelmintic activity. 2,4-dichloro-6-([4-methyl-3-chlorophenyl] carbamoyl)phenyl acetate was proposed to extend tests.

Key words: arylsalicylamide derivatives, toxicity, relationship, structure, activity.

For citation: Sevbo D.P., Malakhova A.Yu., Kuklin V.N. Anthelmintic activity of novel arylsalicylamide derivatives. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2019; 68 (4): 60–64. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-09>

Введение

По оценке Всемирного банка экономический ущерб от заболеваемости кишечными гельминтозами занимает 4-е место среди травм и болезней. На территории РФ отмечена напряженная эпидемиологическая ситуация в связи с ростом заболеваемости животных гельминтозами в регионах с развитым животноводством. Как показал обзор данных литературы об основных антигельминтных средствах, применяемых в России и за рубежом, большинство из них – производные салициламидов [1–2].

В нашей стране при цестодозах крупного рогатого скота и для лечения людей применяется зарубежный препарат «Фенасал» [5-хлор-N-(2-хлор-4-ритрофенил)-2-гидроксибензамид], однако сейчас его производство и поступление в Россию резко сократилось. На кафедре фармацевтической химии СПХФУ был синтезирован N-[4-метил-3-хлорфенил]-2-гидрокси-3,5-дибромбензамид (ронтанокс), близкий по структуре фенасалу. Установлено, что при широком спектре его антигельминтного действия он обладает более высокой токсичностью ($LD_{50}=178$ мг/кг) по сравнению с фенасалом ($LD_{50}=2000$ мг/кг).

Цель исследования – синтез новых замещенных амидов салициловой кислоты, обладающих антигельминтной активностью, и установление связи между структурой и их биологическим действием.

Материал и методы

Продолжились разработки по созданию новых высокоэффективных, малотоксичных и доступных отечественных средств – производных салициламидов, был проведен синтез соединений, обладающих сниженной токсичностью по сравнению с ронтаноксом и повышенной антигельминтной активностью по сравнению с фенасалом.

Синтез арилсалициламидов на основе реакции салициловых кислот (I а, б) с ароматическими фосфамидами осуществляли при 120°C в полуторакратном избытке соответствующего амина (см. рис. 1). Для синтеза арилсалициламидов (III а–з) смешивали 0,15 моль соответствующего ариланилина (II а–д) и 0,097 моль

2-гидрокси-3,5-дигалогенбензойной кислоты (I а, б) в 300 мл толуола. Смесь нагревали при перемешивании с обратным холодильником, во время реакции удаляли воду в виде азеотропной смеси с помощью насадки Стокса. Реакционную массу охлаждали до температуры 60°C, прибавляли 0,034 моль фосфора (III) хлорида, перемешивали 1,5 ч, после чего температуру повышали до 120°C и нагревали в течение 5 ч до прекращения выделения хлористого водорода (контроль – конго красного бумажка). Охлаждали, выпавший кристаллический осадок отфильтровывали в вакууме, сушили и промывали натрия гидрокарбоната 5% раствором для удаления кислоты (I а, б). Осадок сушили, перекристаллизовывали из этилового спирта. Арилсалициламиды (III а–з, IV а, г–з), перекристаллизованные из этилового спирта, представляли собой белые кристаллические вещества, практически не растворимые в воде, умеренно растворимые в этиловом спирте, ацетонитриле и легко растворимые в диметилсульфоксиде.

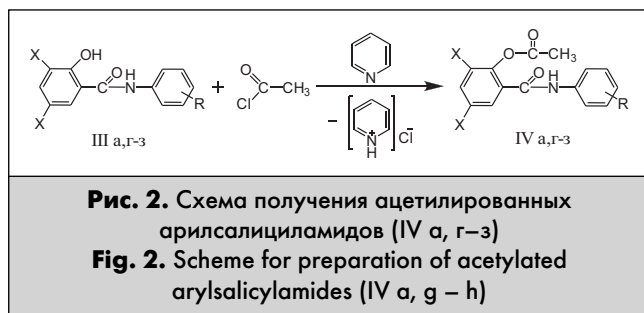
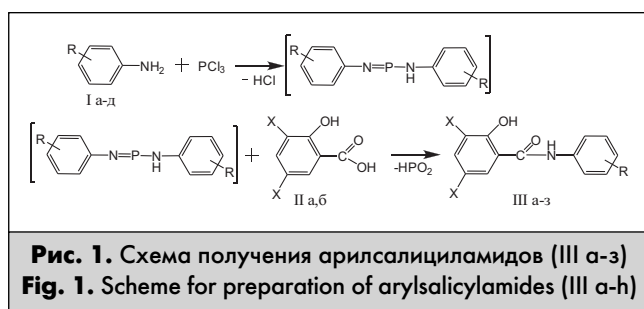
Один из путей снижения токсичности арилсалициламидов – ацетилирование фенольного гидроксильного в салициламидах (III а, г–з). Ацилирование салициламидов (IV а, г–з) выполняли в бензоле при температуре 25°C, используя ацетилхлорид в пиридине (рис. 2). Ацетилированные арилсалициламиды (IV а, г–з) получали, прибавляя к 0,024 моль соединения (III а, г–з) в 60 мл безводного бензола, 0,037 моль пиридина безводного при перемешивании в течение 30 мин. Затем порциями добавляли 0,04 моль ацетилхлорида и перемешивали в течение 2 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой очищенной до нейтрального значения pH среды в промывных водах и перекристаллизовывали из этилового спирта.

Для идентификации синтезированных соединений определяли температуру плавления, УФ-, ИК-спектры в дисках с калия бромидом, ЯМР ¹H спектры в растворе DMSO-d₆ [3]. Также использовали различные методы хроматографического анализа: тонкослойную (ТХС), газовую (хроматограф Agilent 6890N Series GC System с масс-селективным детектором) и жидкостную хроматографию (ГЖХ) (хроматограф LC 1200 Agilent Technologies Inc. с детектором на основе диодной матрицы DAD). Уль-

трафиолетовые спектры записаны на спектрофотометре СФ-56 «ОКБ СПЕКТР», (Россия), инфракрасные (ИК) спектры – на спектрофотометре ИК-Фурье (Россия) в дисках с калия бромидом. Спектры ЯМР-¹H и ¹³C сняты на спектрометре «Bruker» Avance III 400MHz (Германия) в ДМСО-d₆; внутренний стандарт – тетраметилсилан.

Изучение биологической активности синтезированных соединений осуществляли в соответствии с требованиями Фармакологического комитета, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [4]. Определение острой токсичности (расчет однократной полулетальной дозы — ЛД₅₀) соединений (III а–з, IV а, г–з) проводили в центре фармакологических исследований СПГХФУ на белых мышах-самцах, массой 18–20 г

Острую токсичность арилсалициламидов определяли экспресс-методом Прозоровского [5] на беспородных мышах-самцах (питомник лабораторных животных РАН «Рапполово», Ленинградская область). В эксперименте на одно соединение (III а–з, IV а, г–з) было использовано 40 беспородных белых мышей-самцов массой тела 18–20 г в возрасте 11 нед к моменту введения исследуемых веществ. Мыши содержались в условиях вивария на стандартном рационе со свободным доступом к воде. Карантин до постановки эксперимента продолжался 2 нед. В опытные группы случайным образом отбирали по 3–6 мышей без отклонений по внешним признакам и с отклонениями по массе не более чем на 10% от средней массы. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер (метка пикриновой кислотой). Осмотр животных проводили 1 раз в сутки в 1-й половине дня в течение 14 сут, взвешивали на 1-, 7- и 14-е сутки после введения веществ.



Соединения (III а–з, IV а, г–з) вводили в 1-й половине дня перорально (от 500 до 5000 мг/кг) и внутрибрюшинно (от 100 до 1580 мг/кг). Суспензию веществ для введения готовили путем растирания навески в ступке в 1% растворе крахмального клейстера до однородности (размер частиц – 15 мкм). Контрольной группе животных вводили 1% раствор крахмального клейстера. Критериями оценки острой токсичности соединений (III а–з, IVа, г–з) служили: число павших животных, сроки их гибели, картина интоксикации, изменения поведенческих реакций, результаты аутопсии павших и выживших животных [6]. Учет гибели и общего состояния животных проводили 1 раз в день ежедневно на протяжении всего эксперимента. Клинический осмотр каждого животного выполняли в течение 1-го часа после введения препаратов, а также через 1, 3, 7 и 14 сут в клетке содержания и на открытой площадке для выявления признаков отклонения в состоянии здоровья. Оценивали поведение, дыхание, состояние слизистых покровов, изменение массы тела, потребление пищи, воды, характер стула.

Противогименолепидозную активность синтезированных производных арилсалициламидов (III а–з, IV а, г–з) исследовали в НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Соединения использовали в микронизированном виде с величиной частиц 10–15 мкм, полученных методом размола.

Опыты проводили на экспериментальной модели гименолепидоза на белых мышах-самцах, массой 18–20 г, использовали экспериментально инвазированные *Hymenolepis nana* в дозе 200 инвазированных яиц на 1 животное. Каждую испытываемую дозу веществ изучали на 8 мышах, каждую дозу вводили в растворе крахмального клейстера перорально, однократно на 13-й день через зонд после заражения. Эффективность веществ (табл. 2) учитывали по результатам вскрытия кишечника декапитированных животных через 1 сут после введения препарата по числу животных, полностью освободившихся от инвазии.

Результаты и обсуждение

При пероральном введении соединений (III, IV) в крахмальном 1% растворе клейстера гибели и симптомов отравления у животных не отмечено. Дозу веществ, превышающую 5010 мг/кг, животным не удавалось ввести из-за предельно допустимых объемов жидкости для внутрижелудочного введения мышам, что не позволило рассчитать ЛД₅₀ соединений (III а–з, IV а, г–з). Сравнительную токсичность соединений (III а–з, IV а, г–з) удалось получить только при внутрибрюшинном введении (см. табл. 1). Препаратом сравнения служил фенасал (ни-

клозамид, йомезан – Германия), применяемый в ветеринарии. Степень токсичности синтезированных соединений оценивалась по классификации Hodge и Sterner [7].

При определении острой токсичности для соединений III было установлено, что токсичность амидов, содержащих во фрагменте салициламида атомы брома (см. табл. 1), выше таковой у содержащих атомы хлора. Введение метильной группы в фениламинный фрагмент арилсалициламидов приводит к снижению токсичности (III г, з). Замена ее на прококсигруппу еще больше снижает токсичность синтезированных амидов (III б, ж) по сравнению с метоксипроизводными (III в). Производные ацетокси-арилсалициламидов (IV а, г-з) менее токсичны по сравнению с соединениями, содержащими незамещенный фенольный гидроксил (III а, г-з). Зависимость токсичности от природы заместителя в разных фрагментах амидов (IV а, г-з) аналогична таковой для соединений (III а, г-з). Подобно фенасалу, синтезированный амид (IV з) относится к относительно безвредным соединениям (см. табл. 1).

Согласно полученным данным, наиболее эффективным способом снижения токсичности следует считать ацетилирование фенольного гидроксила во фрагменте 2-гидрокси-3,5-дигалогенбензойной кислоты

[3]. Установлено наименее токсичное соединение – 2,4-дихлор-6-([4-метил-3-хлорфенил]карбамоил)фенил-ацетат (IV з).

При исследовании противогименолепидозной активности установлено, что синтезированные арилсалициламиды (III а-з, IV а, г-з) обладают большей антигельминтной активностью, чем базовый препарат «Фенасал» (см. табл. 2). Соединение, содержащее во фрагменте фениламина салициламида пропилоксигруппу (III б), более активно, чем аналог, содержащий метоксигруппу (III в). Замена у соединения атомов брома на атомы хлора в салициловом фрагменте амида приводит к повышению антигельминтной активности. В арилсалициламидах (III ж, з), полученных на основе 2-гидрокси-3,5-дихлорбензойной кислоты (II б), при замене метильной группы в фениламинном фрагменте амида на алкоксигруппу, антигельминтная активность в целом также возрастает.

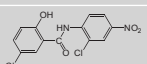
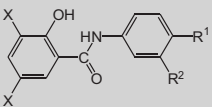
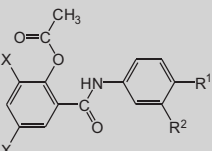
При сравнительной оценке эффективности соединений IV а и IV д, IV з и IV е было установлено, что замена метильной группы в фениламинном фрагменте на атом хлора не приводит к увеличению активности, как и замена атомов брома на атомы хлора в остатке ацилированной салициловой кислоты.

Таблица 1

Результаты определения острой токсичности производных арилсалициламидов (III а-з, IV а, г-з)

Table 1

Results of determining the acute toxicity of arylsaliicylamide derivatives (III a – h, IV a, d – h)

| Формула амидов, содержащих атомы брома | Соединение | Заместители в молекуле салициламида | | | ЛД ₅₀ при внутрибрюшинном введении в крахмальном 1% растворе клейстера, мг/кг | Градация степеней токсичности по Hodge и Sterner [8] |
|---|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|--|--|
| | | X | R ¹ | R ² | | |
|  | Фенасал | | | 2000 | Относительно безвредно | |
|  | III а | Br | Cl | Cl | 80 | Малотоксично и практически нетоксично |
| | III б | Br | OC ₃ H ₇ | Cl | 700 | |
| | III в | Br | OCH ₃ | Cl | 250 | |
| | III г | Br | CH ₃ | H | 326 | |
| | III д (Ронтанокс) | Br | CH ₃ | Cl | 178 | |
| | III ж | Cl | OC ₃ H ₇ | Cl | 500 | Практически нетоксично |
| | III е | Cl | Cl | Cl | 100 | |
| III з | Cl | CH ₃ | Cl | 400 | | |
|  | IVа | Br | Cl | Cl | 560 | Практически нетоксично |
| | IVг | Br | CH ₃ | H | >1000 | |
| | IVд | Br | CH ₃ | Cl | >1260 | |
| | IVе | Cl | Cl | Cl | 700 | |
| | IVз | Cl | CH ₃ | Cl | >1580 | Относительно безвредно |

Согласно результатам исследования биологической активности салициламидов (III а–з, IV а, г–з), наименее токсичным и достаточно активным [10] является 2,4-дихлор-6-([4-метил-3-хлорфенил]карбамоил)фенилацетат (IV з), поэтому данное соединение следует рекомендовать для расширенных фармакологических испытаний.

Заключение

Установлено, что синтезированные арилсалициламиды (III а–з, IV а, г–з) обладают большей антигельминтной активностью, чем базовый фенасал. При определении острой токсичности выявлено, что большинство синтезированных арилсалициламидов по классификации Hodge and Sterner практически не токсичны. Изучение связи антигельминтной активности и токсичности со строением показало, что амиды, содержащие атомы хлора во фрагменте кислоты, более активны, чем содержащие атомы брома; замена метильной группы в амиде на алкоксигруппу во фрагменте ариламина приводит к снижению острой токсичности и к увеличению антигельминтной активности. Обнаружено, что ацетилирование фенольного гидроксила арилсалицилами-

дов снижает острую токсичность. На основании результатов проведенного фармакологического скрининга для расширенных испытаний предложен 2,4-дихлор-6-([4-метил-3-хлорфенил]карбамоил)фенилацетат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Лебедева М.Н., Михайлицын Ф.С., Сергеев В.П. Создание отечественных противопаразитарных препаратов. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2001;4:13–6.
2. Марушко Ю.В., Грачева М.Г. Современное состояние проблемы гельминтозов у детей. Вопросы диагностики и лечения. Современная педиатрия. 2012; 43: 21–6.
3. Севбо Д.П., Малахова А.Ю., Ку克林 В.Н. Синтез строения арилсалициламидов, обладающих антигельминтной активностью. Бутилеровские сообщения, 2017; 9 (51): 115–24.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012; 944.
5. Прозоровский В.Б., Прозоровский М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. Фармакология и токсикология, 1978; 4 (41): 407–509.
6. Гицу Г.А., Малахова А.Ю., Михайлицын Ф.С. и др. Сравнительная оценка противогематолепидозной активности соединений ряда салициланилидов (бензамидов). Медицинская паразитология и паразитарные болезни, 2014;1: 44–45.
7. Hodge H.C., Sterner J.H. Tabulation of toxicity classes. American Industrial Hygiene Association Journal. 1949; 10: 93–6.

References

1. Lebedeva M.N., Mihajlicyn F.S., Sergeev V.P. Creation of domestic antiparasitic drugs. Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni. 2001; 4: 13–6 (in Russian).
2. Marushko Ju.V., Gracheva M.G. The current state of the problem of helminthiasis in children. Voprosy diagnostiki i lecheniya. Sovremennaya pediatriya, 2012; 43: 21–6 (in Russian).
3. Sevbo D.P. Malahova A.Ju., Kuklin V.N. Synthesis of the structure of arylsalicylamides with altigilmite activity. Butlerovskiye soobshcheniya, 2017, 9 (51): 115–24 (in Russian).
4. A guide to preclinical drug research. Part 1. (ed. A.N. Mironov). Moscow: Grif and K, 2012; 944 (in Russian).
5. Prozorovskij V.B., Prozorovskij M.P., Demchenko V.M. Express method for determining the average effective dose and its errors. Farmakologiya i toksikologiya. 1978, 4 (41): 407–509 (in Russian).
6. Gicu G.A., Malahova A.Ju., Mihajlicyn F.S. et al. Comparative evaluation of the antimino-lipidic activity of compounds of a number of salicylanilides (benzamides). Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni. 2014; 1: 44–5 (in Russian).
7. Hodge H.C., Sterner J.H. Tabulation of toxicity classes. American Industrial Hygiene Association Journal, 1949; 10: 93–6.

Поступила 28 сентября 2018 г.

Received 28 September 2018

Принята к публикации 30 ноября 2018 г.

Accepted 30 November 2018

Таблица 2

Антигельминтная активность производных арилсалициламидов

Table 2

Anthelmintic activity of arylsalicylamide derivatives

| Соединение | Эффективность лечения (% животных, полностью освобожденных от цестод) | | | | |
|--------------------|---|--------------|-----|-----|----|
| | Доза, мг/кг | | | | |
| | 1000 | 500 | 250 | 125 | 63 |
| Фенасал | 100 | 62 | 0 | 0 | 0 |
| III а | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| III б | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| III в | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| III г | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| III д Ронтанокс | – | Гибель мышей | 100 | 83 | 0 |
| III е | 100 | 100 | 98 | 0 | 0 |
| III з | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 |
| III ж | 100 | 100 | 100 | 100 | 41 |
| IV а | 100 | 100 | 44 | 0 | 0 |
| IV г | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| IV д | 100 | 100 | 81 | 12 | 0 |
| IV е | 100 | 100 | 98 | 0 | 0 |
| IV з | 100 | 100 | 93 | 0 | 0 |