



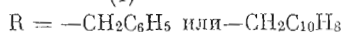
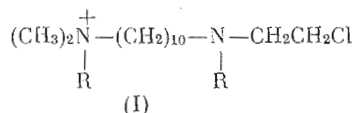
УДК 577.164.18.02 : 576.8.097.1

АЛКИЛИРУЮЩИЕ АГЕНТЫ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ  
НИКОТИНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ*Андрианова И. П., Брежестовский П. Д., Вульфшус Е. А.,  
Грачева Э. А., Гридасова Г. В., Ильин В. И.**Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР,  
Новосибирский государственный университет,  
Институт биофизики Академии наук СССР, Пуцзино*

Получены новые алкилирующие агенты на основе 2-хлорэтиламинов, песущие в своем составе группировку, комплементарную известным функционально важным участкам никотиночувствительного холинорецептора. Проведены предварительные биологические испытания синтезированных соединений на изолированных одиночных нейронах *Limnaea* и *Helix*.

Изучение топографии активной поверхности холинорецептора необходимо для выяснения явлений, лежащих в основе синаптических процессов. Одним из подходов к исследованию структуры рецептора является метод избирательной химической модификации. Использование субстратоподобных соединений, несущих в своем составе группировку, способную ковалентно связываться с функциональными группами на поверхности холинорецептора, позволяет идентифицировать его активные участки. Кроме того, этот метод дает возможность изучать механизм обратимого взаимодействия медиаторов и их аналогов с рецептором, открывает возможность для изучения некоторых существенных вопросов механизма действия рецептора: например, природы десенситизации, соотношения времени жизни комплекса с холиномиметическим веществом и времени активации ионного канала, связанного с рецептором. К настоящему времени возможности метода химической модификации применительно к холинорецептору использованы еще крайне недостаточно. Хотя установлено, что рецептор можно модифицировать реагентами разных классов, добиться высокой специфичности связывания удалось только в исключительных случаях [1].

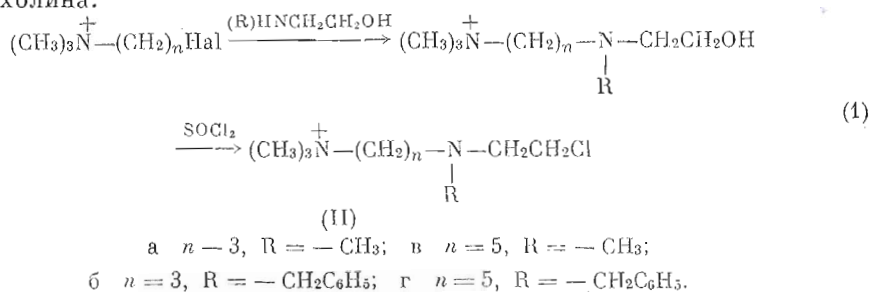
В частности, при изучении структуры никотиночувствительных рецепторов были использованы 2-галоидэтиламины формулы (1) [2, 3]



Указанные соединения являются аналогами известного блокатора никотиночувствительных рецепторов — декаметония — и должны, по всей вероятности, ковалентно связываться с одним из анионных центров. С помощью этих агентов авторам [2, 3] удалось необратимо блокировать холинорецептор.

Для нахождения других, кроме анионных, групп, входящих в состав активной поверхности рецептора, целесообразно создание структур, в ко-

торых меняется расстояние между адресующей и модифицирующей группировками. Из соединений такого типа мы прежде всего синтезировали 2-хлорэтиламини общей формулы (II) (схема (1)), содержащие в качестве адреса триметиламмониевую группу, идентичную «катионной головке» ацетилхолина.



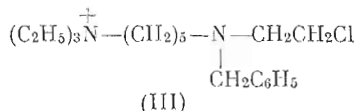
Соединения такой структуры позволяют провести модификацию функциональных групп, находящихся на заданном расстоянии от анионного центра.

Для получения соединений (II) исходный триметил- $\omega$ -галоидалкиламмоний обрабатывали 2-метил-(или 2-бензил-)аминоэтанолом в этаноле при 60–100° в течение 5–13 ч. Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью БХ. Для триметил-3-хлорпропиламмония требовалась более высокая температура и большее время реакции по сравнению с аналогичным бромистым алкилом, что согласуется с реакционной способностью галоидных алкилов как нуклеофильных агентов. Соотношение в реакционной смеси галоидный алкил — амин составляло 1 : 2. Избыток амина использовали для связывания выделяющегося галоидводорода.

Промежуточное 2-оксипропиламинопроизводное после осаждения из реакционной смеси и перевода в соль обработкой соответствующим галоидводородом вводили во взаимодействие с хлористым тиоилом. Строение конечных продуктов было подтверждено соотношением ионного и ковалентно связанного галоида.

Исходные триметил- $\omega$ -галоидалкиламмониевые соли легко доступны. Они образуются с высоким выходом при взаимодействии  $\alpha$ ,  $\omega$ -дигалоидалканов с рассчитанным количеством триметиламина в растворе бензола [4]. Меняя число метиленовых групп в исходном алкане, можно получать алкилирующие агенты с различным расстоянием между функциональными группами.

Известно, что в связи с наличием вблизи активного центра холинорецептора гидрофобных участков увеличение гидрофобности субстратоподобной молекулы приводит к увеличению прочности комплекса, образующегося при ее взаимодействии с рецептором [5]. В связи с этим возможно, что введение в катионную головку алкилирующего агента этильных групп вместо метильных повысит его сродство к холинорецептору. Для проверки этого предположения мы синтезировали соединение (III) по описанному выше способу.



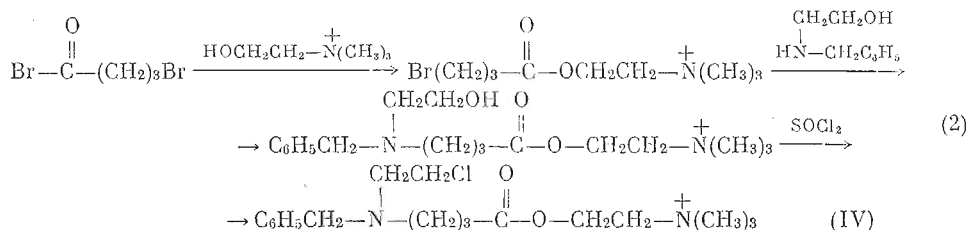
Для повышения специфичности алкилирующих агентов указанного типа и их правильной ориентации на холинорецепторе целесообразно ввести в молекулу субстратоподобного соединения кроме триметиламмониевой группировки, обладающей сродством к анионному центру холинорецептора, сложноэфирную группу, аналогичную эфирной части молекулы ацетилхолина, взаимодействующей с соответствующим участком холинорецептора.

Данные предварительных испытаний производных дикарбоновых кислот на холинорецептивных мембранах нейронов брюхоногих моллюсков

позволили предположить наличие на мембране группы, способной к образованию водородной связи с субстратом на расстоянии 12—14 Å от анионного центра [6]. Создание алкилирующего агента (IV) (схема (2)), несущего на этом расстоянии от «катионной головки» 2-хлорэтиламиногруппу, позволит, возможно, подтвердить существование такой функциональной группировки в холинорецепторе и необратимо заблокировать ее.

3-(Бензил-2-хлорэтиламино)бутирилхолин (IV) получали при обработке бромангида  $\gamma$ -броммасляной кислоты бромистым холином с последующей конденсацией полученного  $\gamma$ -бромбутирилхолина с 2-бензиламиноэтанолом при 50—60°. Проведение реакции в указанном температурном интервале позволяет выделить в качестве основного продукта 3-(бензил-2-оксиэтиламино)бутирилхолин. При повышении температуры до 100° появляются также продукты расщепления сложноэфирных связей.

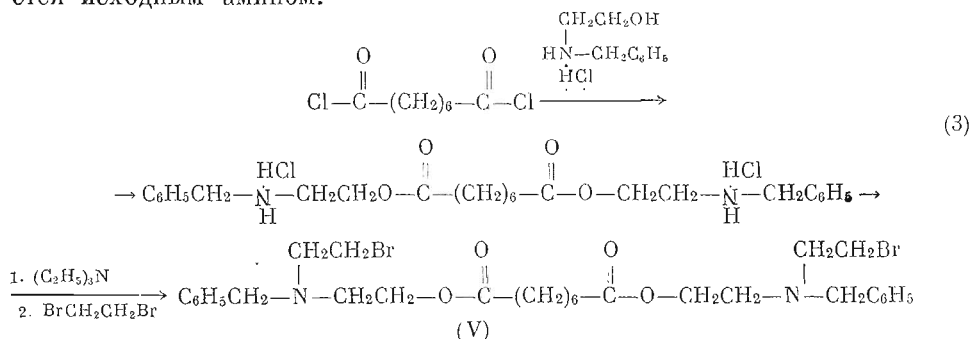
Обработка выделенного оксисоединения хлористым тионилем приводит к соответствующему 2-хлорэтиламинопроизводному структуры (IV).



Повышение специфичности модифицирующих соединений связано с введением в молекулу дополнительных функциональных групп комплементарных известным функционально важным участкам рецептора ацетилхолина. Известно, что дихолиновый эфир пробковой кислоты, взаимодействуя с двумя активными центрами на поверхности холинорецептора, способен образовывать с ним более устойчивый комплекс, чем ацетилхолин. В связи с этим для получения высокоспецифичного агента, алкилирующего группы, входящие в анионный центр никотиночувствительных холинорецепторов, мы получили соединение (V) (схема (3)).

Синтез этого алкилирующего агента оказался трудоемким в связи с лабильностью сложноэфирных групп, входящих в его состав.

Конденсацией дихлорангида пробковой кислоты с хлоргидратом бензиламинэтанола был получен хлоргидрат бис(2-бензиламиноэтилового эфира) пробковой кислоты, который переводили в основание обработкой триэтиламино. Алкилирование последнего кипящим дибромэтаном приводит к соединению (V) в форме основания. Выделяющийся HBr связывается исходным амином.



Во избежание возможного самоалкилирования промежуточным монобромэтилпроизводным реакцию проводили в 50-кратном избытке дибромэтана. После отделения выпадающего в осадок бромгидрата бис(2-бензиламиноэтилового эфира) пробковой кислоты целевой продукт (V) выделяли в виде бромгидрата при осаждении бромистым водородом из маточника,

предварительно очищенного от смолистых примесей кипячением с активированным углем. Бромгидрат бис[2-(бензил-2-бромэтиламино)этилового эфира] пробковой кислоты (V) выпадает в виде масла, которое переводят в аморфный порошок многократным переосаждением из хлороформа эфиром. Продукт выделяют с 20—30%-ным выходом в виде гигроскопичного порошка, распадающегося при нагревании с водой с выделением пробковой кислоты.

Предварительные биологические испытания синтезированных алкилирующих агентов на изолированных нейронах брюхоногих моллюсков методом фиксации мембранного потенциала показали, что соединения структуры (II) при  $n = 3,5$  и  $R = -CH_2C_6H_5$  необратимо блокировали никотиночувствительные рецепторы при  $pH \geq 8,5$ . Последние можно было защитить от модификации *d*-тубокурарином, соединениями структуры (II) при  $n = 3,5$  и  $R = -CH_3$ , а также частично пентаметонием. Ацетилхолин и вещества, взаимодействующие только с анионным участком холинорецептора, не защищали рецептор от алкилирования. Введение этильных групп в катионную головку агента (соединение (III)), как и предполагалось, повышает эффект алкилирования. Соединения структуры (II) при  $n = 3,5$  и  $R = -CH_3$  обратимо блокировали рецептор ацетилхолина, но не связывались с ним ковалентно.

Соединения (IV) и (V), несущие в своем составе сложнэфирные группы, также необратимо блокируют никотиночувствительные холинорецепторы. После алкилирования агентом (V) чувствительность рецептора к действию ацетилхолина восстанавливалась через 1,5 ч при отмывании буферным раствором ( $pH 7,5$ ). Блокирование рецептора, вызванное соединением (IV), сохранялось после 14-часовой отмывки тем же буфером. Из всех испытанных алкилирующих агентов только соединение (IV) вызывало деполяризацию мембраны.

Указанные результаты подтверждают целесообразность исследования синтезированных алкилирующих агентов в биологических системах, дальнейших поисков с целью повышения их специфичности и испытания этих соединений на простых моделях для облегчения анализа данных, полученных на уровне клетки.

#### Экспериментальная часть

Хроматографический анализ проводили на бумаге марки FN3 (фирма «Filtrak», ФРГ) в системе бутанол — этанол — уксусная кислота — вода 8 : 2 : 1 : 3. Обнаружение пятен проводили в камере с йодом. Соотношение ионного и ковалентносвязанного галоида определяли методом потенциометрического титрования. Содержание общего галоида находили после гидролиза соединений 0,5 н. раствором щелочи ( $100^\circ$ , 1 ч). Содержание ковалентно-связанного галоида определяли по разности общего и ионного галоида.

*Хлоргидрат 3-(метил-2-хлорэтиламино)пропилтриметиламмонийбромид (IIa)*. Смесь 2,16 г 3-хлорпропилтриметиламмонийбромид и 1,5 г 2-метиламиноэтанола в 5 мл абсолютного этанола нагревали 13 ч при  $100^\circ$ , охлаждали, высаживали эфиром. После декантации оставшийся маслообразный осадок многократно обрабатывали абсолютным эфиром для удаления непрореагировавшего амина. Остаток переосаждали из сухого изопропанола, содержащего HCl, абсолютным эфиром и сушили в вакуум-эксикаторе. Затем полученное оксисоединение суспендировали в 2 мл абсолютного бензола, охлаждали и добавляли по каплям 5 мл хлористого тионила. Реакционную смесь выдерживали 5 ч при комнатной температуре. Бензол и избыток хлористого тионила отгоняли в вакууме. Остаток переосаждали из изопропанола эфиром, фильтровали с защитой от влаги воздуха. Получали 1,6 г (52%) хлоргидрата (IIa),  $R_f$  0,15. Продукт переводили в перхлорат и пикрат при обработке 70%-ной хлорной или пикриновой кислотой в этаноле. Перхлорат после перекристаллизации

из метанола имеет т. пл. 242—244°,  $R_f$  0,36. Найдено, %: N 6,92;  $C_9H_{23}N_2Cl_3O_7$ . Вычислено, %: N 7,12. Пикрат после перекристаллизации из этанола имеет т. пл. 233—235°,  $R_f$  0,59. Найдено, %: N 17,37;  $C_{21}H_{27}N_8O_{14}Cl$ . Вычислено, %: N 17,2.

*Бромгидрат 3-(бензил-2-хлорэтиламино)пропилтриметиламмонийбромида (IIб)*. Аналогично изложенному выше из 1 г 3-бромпропилтриметиламмонийбромида и 1,2 г 2-бензиламиноэтанола при нагревании в течение 13 ч при 70° в 5 мл абсолютного этанола после высаживания эфиром получали маслообразный осадок, который очищали с помощью препаративной БХ, высушивали и обрабатывали 0,5 мл хлористого тионила в 1 мл абсолютного бензола. Избыток тионила отгоняли, остаток обрабатывали 5 мл изопропанола, содержащего HBr, и продукт высаживали 30 мл абсолютного эфира и еще раз переосаждали из изопропанола абс. эфиром. Выпавший осадок промывали абс. эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе. Получали 0,45 г (25%) соединения (IIб),  $R_f$  0,4. Т. пл. 117—120°. Найдено, %: N 6,17.  $C_{15}H_{27}N_2Br_2Cl$ . Вычислено, %: N 6,51.

*Бромгидрат 5-(метил-2-хлорэтиламино)пентилтриметиламмонийбромида (IIв)*. Аналогично изложенному выше из 2,88 г 5-бромпентилтриметиламмонийбромида и 1,5 г 2-метиламиноэтанола в 10 мл абсолютного этанола при нагревании в течение 5 ч при 70° после высаживания эфиром из сухого изопропанола, содержащего HBr, маслообразного осадка и высушивания его в эксикаторе в течение 12 ч получали 2,1 г (62%) бромгидрата 5-(метил-2-оксиэтиламино)пентилтриметиламмонийбромида, который после перекристаллизации из сухого изопропанола, содержащего HBr, имеет т. пл. 158—160° (в капилляре),  $R_f$  0,1. Полученное окисоединение хлорировали описанным выше способом и получали 0,8 г (88%) искомого продукта, который после перекристаллизации из смеси абсолютный изопропанол — метанол (1 : 1) имеет т. пл. 200—203°,  $R_f$  0,16. Найдено, %: N 7,4;  $C_{11}H_{27}N_2Br_2Cl$ . Вычислено, %: N 7,33.

*Бромгидрат 5-(бензил-2-хлорэтиламино)пентилтриметиламмонийбромида (IIг)*. Аналогично изложенному выше из смеси 1,44 г 5-бромпентилтриметиламмонийбромида и 1,49 г 2-бензиламиноэтанола в 5 мл абс. этанола в течение 10 ч при 100° и последующем хлорировании окисоединения описанным способом получали 1,57 г (73%) искомого продукта, который после перекристаллизации из *n*-бутанола имеет т. пл. 173—176°,  $R_f$  0,36. Найдено, %: N 6,09.  $C_{17}H_{31}N_2Br_2Cl$ . Вычислено, %: N 6,11.

*Бромгидрат 5-(бензил-2-хлорэтиламино)пентилтриэтиламмонийбромида (III)*. Раствор 10,7 г дибромпентана и 3 г триэтиламина в 10 мл бензола нагревали 12 ч при 70°. Осадок, отделенный фильтрованием и промытый на фильтре абс. эфиром, растворяли в абсолютном ацетоне. Остаток отделяли, фильтрат кипятили с активированным углем. Затем фильтровали через  $Al_2O_3$ , растворитель отгоняли, остаток сушили в вакуум-эксикаторе. Получали 7 г 5-бромпентилтриэтиламмонийбромида.  $R_f$  0,68.

К 6,6 г полученного продукта добавляли 6 г бензиламиноэтанола в 30 мл абс. спирта и кипятили 5 ч. Реакционную смесь обрабатывали эфиром, выпавший маслообразный осадок переосаждали из изопропанола, содержащего HBr, эфиром. Выпавший маслообразный осадок промывали многократно эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе. Выделенный 5-(бензил-2-оксиэтиламино)пентилтриэтиламмонийбромид хлорировали описанным выше способом. После перекристаллизации из изопропанола, содержащего HBr, получали 0,93 г искомого продукта с т. пл. 202—203° (в капилляре). Найдено, %: N 5,24;  $C_{20}H_{37}N_2ClBr_2$ . Вычислено, %: N 5,6.

*3-(Бензил-2-хлорэтиламино)бутирилхолин (IV)*. К 3,98 г бромистого холина при охлаждении и перемешивании на магнитной мешалке добавляли 5,7 г бромангидрида  $\gamma$ -броммасляной кислоты [7], перемешивали 4 ч. Затем к реакционной смеси добавляли эфир, выпавший осадок 4-кратно промывали эфиром. Выделяли 5,9 г бромбутирилхолина, который после перекристаллизации из сухого изопропанола имел  $R_f$  0,5. 4,1 г получен-

ного продукта нагревали при 50°7 ч с 3,57 г бензиламиноэтанола в 13 мл абс. этанола. Реакционную смесь охлаждали, добавляли 50 мл абс. эфира. Выпавший маслообразный осадок многократно промывали эфиром и затем с помощью препаративной БХ выделяли вещество с  $R_f$  0,38, которое после высушивания в вакуум-эксикаторе переводили в соответствующее хлорпроизводное описанным выше способом. Соединение (IV) представляет собой аморфный гигроскопичный порошок.  $R_f$  0,4. Найдено, %: С 42,41, Н 6,78;  $C_{18}H_{31}N_2OBr_2Cl$ . Вычислено, %: С 42,94, Н 6,36.

*Хлоргидрат бис(2-бензиламиноэтилового эфира) пробковой кислоты.* К 14 г хлоргидрата бензиламиноэтанола в 200 мл хлороформа добавляли 7,2 г дихлорангидрида пробковой кислоты. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч и оставляли на ночь. Выпавшие кристаллы отделяли фильтрованием, промывали хлороформом, ацетоном, эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе. Выход 6,5 г, т. пл. 198—200°,  $R_f$  0,7. Найдено, %: N 5,32.  $C_{26}H_{38}O_4N_2Cl_2$ . Вычислено, %: N 5,45.

*Бромгидрат бис [2-(бензил-2-бромэтиламино)этилового эфира] пробковой кислоты (V).* 1,2 г хлоргидрата бис(2-бензиламиноэтилового эфира) пробковой кислоты перемешивали с 20 мл сухого триэтиламина в 100 мл абсолютного бензола при комнатной температуре 3 ч. Осадок отделяли фильтрованием, промывали на фильтре бензолом. Выделяли 0,6 г хлоргидрата триэтиламина (рассчитанное количество). Маточник упаривали до полного исчезновения запаха амина, сушили в вакуум-эксикаторе. Остаток растворяли в дибромэтаноле, и раствор по каплям добавляли в колбу с кипящим дибромэтаноле. Общее количество дибромэтана 50 мл. Реакционную смесь после добавления всего количества амина выдерживали при температуре кипения дибромэтана 2 ч. Осадок отделяли. Маточник кипятили с активированным углем в течение часа, добавляли 50 мл абсолютного бензола, фильтровали, в раствор пропускали газообразный HBr. Выпавшее масло 4-кратно переосаждали из хлороформа эфиром и затем растирали с абсолютным эфиром до получения порошка, который сушили в вакуум-эксикаторе. Получали 0,2 г соединения (V) в виде гигроскопичного аморфного порошка.  $R_f$  0,85. Найдено, %: N 3,61.  $C_{30}H_{44}Br_4N_2O_4$ . Вычислено, %: N 3,47.

Авторы благодарны Д. Г. Кнорре и Б. Н. Вепринцеву за помощь в постановке работы и в обсуждении полученных результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вульфийс Е. А. (1975) В сб. Природа холинорецептора и структура его активного центра, Пуццано.
2. Rang H. P., Ritter J. M. (1969) Mol. Pharmacol., 5, 394—411.
3. Rang H. P., Ritter J. M. (1970) Mol. Pharmacol., 6, 383—390.
4. Английский патент (1957) 781, 502, С. А. 52, 3862.
5. Михельсон М. Я., Зеймаль Э. В. (1970) Ацетилхолин, стр. 134, Л.
6. Вульфийс Е. А., Гер. Б. А., Гоголадзе Т. В., Зеймаль Э. В., Вепринцев Б. Н. (1972) IV Международный биофизический конгресс, тезисы, т. III., стр. 281, М.
7. Kuschinsky G., Lange G., Sholtissek Ch. (1955) Biochim. Z., 327, 314—330.

Поступила в редакцию  
11.III.1975

#### ALKYLATING AGENTS FOR MODIFICATION OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS

ANDRIANOVA I. P., BREJESTOVSKI P. D., VULFIUS E. A.,  
GRACHEVA E. A., GRIDASOVA G. V., ILJIN V. I.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk, Novosibirsk-State University, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

The preparation of some new 2-chlorethylamines with specific groups complementary to the previously identified regions of nicotinic acetylcholine receptors is reported. The biological effects of these compounds were investigated on neurons of *Limnaea* and *Helix*.