

УДК 547.518

СИНТЕЗЫ ВЕЩЕСТВ С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ.

IV*. МОДИФИКАЦИЯ ЛУПИНИНА И МЕНТОЛА

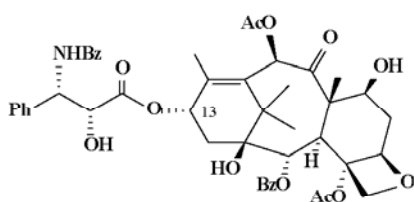
АМИНОКИСЛОТНЫМ ФРАГМЕНТОМ МОЛЕКУЛЫ ТАКСОЛА

О.Н. Зефирова, Е.В. Нуриева, В.Н. Нуриев, С.А. Кузнецов**, Д.Г. Вайсс**,
Р.Т. Тлегиенов***, Н.В. Зык, Н.С. Зефиров

(кафедра органической химии, кафедра физической химии; e-mail:
olgaz@org.chem.msu.ru)

В работе представлен метод синтеза (N-бензоилфенилизосерильных) производных L-лупинина и L-ментола, а также результаты тестирования активности полученных соединений.

В настоящее время одним из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов является таксол, выделяемый из экстрактов коры *Taxus brevifolia*. Действие этого вещества основано на его способности связываться с белком тубулином и нарушать динамику основного компонента cito-скелета клетки – микротрубочек (таксол стабилизирует микротрубочки и тем самым блокирует клеточное деление). Следует отметить, что клиническое применение таксола существенно ограничивается необходимостью его получения полусинтетическим путем из природных источников. Такая необходимость вызвана сложной структурой рассматриваемой молекулы и делает актуальной задачу создания структурно более простых аналогов таксола.



Таксол

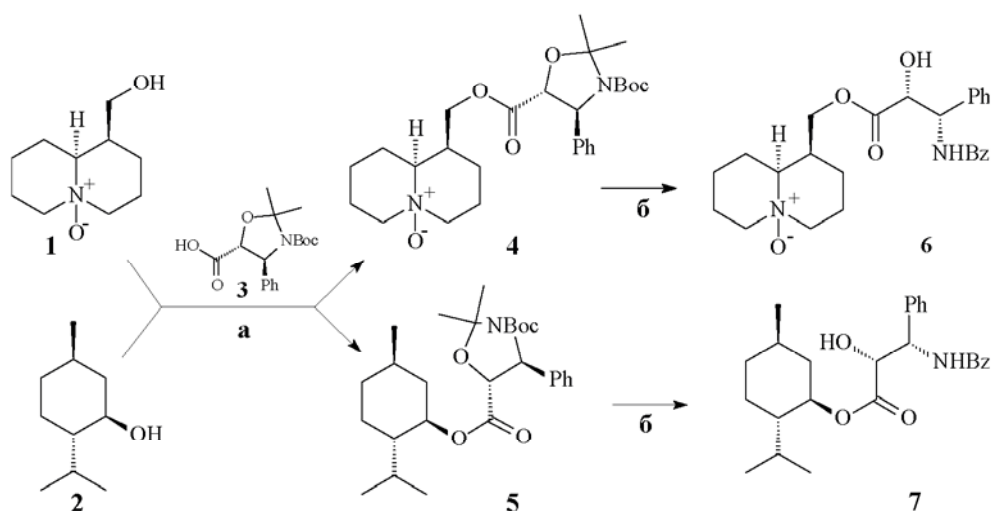
В рамках программы по синтезу аналогов, в которых сложный таксоновый скелет замещен на более простые адамантановый или бицикло[3.3.1]нонановый фрагменты [1–9], нами было показано, что агрегацию тубулина вызывают только каркасные соединения, содержащие в качестве единственного заместителя N-бензоилфенилизосерил (заместитель при C¹³ в так-

соле). Эти данные стимулировали проведение дополнительных исследований по модификации N-бензоилфенилизосерином различных моно- и полициклических структур. В качестве таких структур были выбраны природные соединения: лупинин (1), использованный в виде N-оксида, и ментол (2). Этерификацию осуществляли по разработанной ранее методике [1] защищенной формой аминокислоты (3) с последующим раскрытием оксазолидинового цикла (схема). Строение полученных в результате новых оптически активных промежуточных (4, 5) и конечных (6, 7) соединений установлено с помощью данных элементного анализа, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Общие выходы N-бензоилфенилизосерильных производных 6 и 7 составили 51 и 64% соответственно.

Испытания биологической активности на способность полученных веществ стимулировать полимеризацию белка тубулина *in vitro* и стабилизировать микротрубочки в клетках *in vivo* показали, что ни лупининовый (6), ни ментоловый (7) аналоги не оказывают никакого эффекта на микротрубочки (при этом, соединение 7 сильно влияет на адгезию клеток). Следует подчеркнуть, что для описанных ранее в литературе N-бензоилфенилизосерильных производных галактопиранозы, гибберелловой кислоты, гуанозина не была отмечена способность промотировать полимеризацию тубулина и стабилизировать микротрубочки в клетках [10, 11] (для гуанозинового аналога было указано только наличие слабого цитотоксического эффекта [11]). Результаты проведенных исследований подтверждают сделанный нами ранее вывод о

*Сообщения I–III см. [1–3]; ** Институт клеточной биологии и биологических систем, Ростовский университет, г. Ростов, Германия;
*** Каракалпакский государственный университет им. Бердаха, г. Нукус).

Схема



важной роли определенных каркасных фрагментов в структурах “упрощенных” аналогов таксола в обеспечении тубулин агрегирующей активности.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на приборе “Varian Avans-400” (рабочая частота 400 МГц) в CDCl_3 с использованием триметилсилана в качестве внутреннего стандарта. Контроль за ходом реакций осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах *Silufol*. Хроматографическое разделение проводили на колонках с силикагелем “Merck 60” (220–440 mesh ASTM).

3-Трет-бутил 5-[(1S,9aS)-5-оксидооктагидро-2Н-хинолизин-1-ил]метил (4S,5R)-2,2-диметил-4-фенил-1,3-оксазолидин-3,5-дикарбоксилат (4) синтезирован по методике [1] из 0,060 г (0,32 ммоль) N-оксида лупинина (1) и 0,050 г (0,16 ммоль) защищенной аминокислоты (3) в абс. CH_2Cl_2 . Продукт очищали хроматографически (элюент – этилацетат: петролейный эфир (1:10), 40–70°C). Получили 0,053 г соединения 4 в виде бесцветной жидкости. Выход 68%. Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., CDCl_3/TMS): м. 1.18–1.39 (19H, скелетн.+ *трет*-Bu); 1.61–1.96 в.ч. 1.67 и 1.77 м. (12H, скелет. + Me_2C); дд. 3.65 и 4.07 (2 H, CH_2O); 4.64 д. (1H, OCHCHN); 5.44 с. (1 H, OCHCHN); м. 7,27–7.36 (5H, Ph).

3-Трет-бутил 5-[(1R,2S,5R)-2-изопропил-5-метилциклогексил] (4S,5R)-2,2-диметил-4-фенил-1,3-оксазолидин-3,5-дикарбоксилат (5) синтезирован по методике [1] из 0,070 г (0,45 ммоль) (–)-ментола 2 и 0,068 г (0,21 ммоль) защищенной аминокислоты 3 в абс. CH_2Cl_2 . Продукт очищали хромато-

графически (элюент – этилацетат: петролейный эфир (1:7), 40–70°C). Получили 0,070 г соединения 5 в виде бесцветной жидкости. Выход 72%. Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., CDCl_3/TMS): 0.75 д. (3H, MeCH); 0.86–0.92 м. (6H, Me_2CH); 1.00–1.51+1.17 с. (16 H, скелетн.+*т*-Bu); 1.67–2.05+1.71+1.79 м. (8 H, скелетн. + Me_2C); 4.46 д. (1H, OCHCHN); 4.81 м. (1 H, CHO_2C); 5.12 с. (1H, OCHCHN); м. 7,26–7.37 (5H, Ph).

(1S,9aS)-5-Оксидооктагидро-2Н-хинолизин-1-ил]метил(2R,3S)-3-(бензоил-амино)-2-гидрокси-3-фенилпропаноат (6). Синтезирован по методике [1] из 0,053 г (0,11 ммоль) 4 в 5 мл 85%-й муравьиной кислоты. Промежуточный продукт бензоилировали 0,02 мл (0,17 ммоль) бензоилхлорида. Конечный δ , м.д., CDCl_3/TMS): 1.34–2.18 м. (17H, скелет.+OH); 3.66–4.13 м. (2 H, $\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}$); 5.08 д. (1 H, CHON); 5.92 дд. (1 H, CHN); шир. сигн. 7.16 (1 H, NH); 7,29–7.81 (10 H, аромат.). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., CDCl_3/TMS): 24.71; 24.91; 25.48; 25.58; 28.42; 28.43; 33.22; 48.71; 52.35; 52.97(CHN); 77.70(CHON); 126.856–134.42 (аром.); 166.55 (NHOCBz); 172.02(CO_2). Спектр ИК (KBr, cm^{-1}): 1530; 1630; 1670; 1730; 3250 (уш.); 3380.

(1R,2S,5R)-2-изопропил-5-метилциклогексил (2R,3S)-3-(бензоиламино)-2-гидрокси-3-фенилпропаноат (7). Синтезирован по методике [1] из 0,070 г (0,15 ммоль) циклического эфира 5 в 5 мл 85% муравьиной кислоты. Промежуточный эфир гидрокси-аминокислоты бензоилировали 0,02 мл (0,17 ммоль) бензоилхлорида. Конечный продукт очищали хроматографически [элюент: этилацетат: петролейный эфир (40–70°C), 1:9, затем 1:3]. Полу-

чено 0,048 г (выход 76%) соединения **7** в виде бесцветных кристаллов. $T_{пл} = 127-128^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_D^{26} = 44.04^{\circ}$ ($c = 0.005$, CH_2Cl_2). Найдено, %: С, 73.55; Н, 7.90; N, 3.15. $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{NO}_4$. Вычислено, %: С, 73.73; Н, 7.85; N, 3.31. Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., CDCl_3/TMC): 0.55 д. (3H, MeCH); 0.79 д. (3H, MeC); 0.88–1.25 м. в.ч. 0.93 д. (6H, скелет. + MeC); 1.48 м. (2H); 1.68–1.71 м. (2H); 1.83 м. (1H); 1.99 м. (1H); 3.44 (1H, OH); 4.60 (1H, CHOH); 4.87 м. (1H, CHO_2C); 5.73 дд. (1H, CHN); уш. сигн. 7.14 (1H, NH); 7.28–7.81 (10H, аромат.). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., CDCl_3/TMC): 15.46; 20.84; 21.95; 22.71; 25.60; 31.48; 34.00; 40.70; 46.78; 54.78 (CHN); 73.78(CHOH); 77.35 (CHO_2C) 126.86–138.97 (аром.); 166.37 (NHOCBz); 172.51 (CO_2). Спектр ИК (KBr, cm^{-1}): 1520; 1580; 1650; 1720; 3420 (уш.).

Для проведения испытаний биологической активности эфиров **6** и **7** были приготовлены 5 мМ ис-

ходные растворы испытуемых соединений и таксола в ДМСО. Тестирование было проведено *in vivo* и *in vitro* в интервале концентраций соединений **6** и **7** 10–100 мМ. В качестве позитивного контроля использовали 25 мМ раствор таксола. Была изучена способность испытуемых соединений стимулировать *in vitro* сборку микротрубочек (MT) из белка тубулина (концентрация 1–2 мг/мл), выделенного из мозга крупного рогатого скота [12]. Процесс образования MT анализировали с помощью световой видео микроскопии с усиленным контрастом (AVEC-DIC-микроскопия [13]) и метода седиментационного анализа [14]. Способность соединений **6** и **7** блокировать деление клеток *in vivo* была исследована с помощью флуоресцентной микроскопии на культуре клеток фибробластов *Vero* и эпителиальных клеток PtK_2 , стабильно трансфицированных и экспрессирующих флуоресцентно меченный YFP-тубулин.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и немецкой организации DAAD и программы Leonard-Euler Studentship 2005/2006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Селюнина Е.В., Зефирова О.Н., Зык Н.В., Зефилов Н.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. **43**. С. 237.
2. Аверина Н.В., Латина Т.В., Зефирова О.Н., Зефилов Н.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. **43**. С. 244.
3. Аверина Н.В., Зефирова О.Н., Борисова Г.С., Зефилов Н.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2005. **46**. С. 34.
4. Зефирова О.Н., Селюнина Е.В., Аверина Н.В., Зык Н.В., Зефилов Н.С. // ЖОрХ. 2005. **38**. С. 1176.
5. Зефирова О.Н., Селюнина Е.В., Нуриев В.Н., Зык Н.В., Зефилов Н.С. // ЖОрХ. 2003. **39**. С. 880.
6. Аверина Н.В., Борисова Г.С., Зефирова О.Н., Селюнина Е.В., Зык Н.В., Зефилов Н.С. // ЖОрХ. 2004. **40**. С. 528.
7. Зефирова О.Н., Нуриева Е.В., Чехлов А.Н., Алдошин С.М., Нестеренко П.Н., Зык Н.В., Зефилов Н.С. // ЖОрХ. 2004. **40**. С. 533.
8. Аверина Н.В., Зефирова О.Н., Зефилов Н.С., Чехлов А.Н., Шилов Г.В., Алдошин С.М. // ЖОрХ. 2004. **40**. С. 1488.
9. Зефирова О.Н., Нуриева Е.В., Зык Н.В. // ЖОрХ. 2005. **41**. С. 1313.
10. Denis J.-N., Green A. E., Serra A. A., Luche M.-J. // J. Org. Chem. 1986. **51**. P. 46.
11. Howarth J., Penny P., McDonnel S., O'Connor A. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003. **13**. P. 2693.
12. Kuznetsov S.A., Rodionov V.I., Bershadsky A.D., Gelfand V.I., Rosenblat V.A. // Cell Biol. Int. Rep. 1980. **4**. P. 1017.
13. Weiss D.G. Video-enhanced contrast microscopy // Cell Biology: A Laboratory Handbook. Vol. III. Chapter 6. 2005. P. 57.
14. Rodionov V.I., Gyoeva F.K., Kashina A.S., Kuznetsov S.A., Gelfand V.I. // J. Biol. Chem. 1990. **265**. P. 5702.

Поступила в редакцию 09.04.07

SYNTHESIS OF COMPOUNDS WITH POTENTIAL ANTITUMOUR ACTIVITY. IV. MODIFICATION OF LUPININE AND MENTHOL BY TAXOL AMINOACID MOIETY

O.N. Zefirova, E.V. Nurieva, V.N. Nuriev, S.A. Kuznetsov, D.G. Weiss, R.T. Tlegenov, N.V. Zyk, N.S. Zefirov

(Division of Organic Chemistry)

Preparation and results of biological tests of novel (2R,3S)-phenylisoserine-modified L-lupinine and L-menthol are described.