

УДК 547.518

СИНТЕЗ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ КОНЬЮГАТОВ БЕНЗИМИДАЗОЛА С АДАМАНТАНОМ

Е.В. Нуриева, А.А. Белоглазкина, Д.В. Шишов, В.В. Гоголь, Я.С. Глазкова, Б. Вобит*,
Н.С. Зефирова**, С.А. Кузнецов*, О.Н. Зефирова**

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

В работе представлен синтез 2-адамантил-6-[(1*H*-бензимидазол-1-илкарбонил)амино]-гексаноата и 2-адамантил-7-[(1*H*-бензимидазол-1-ил)-7-оксо-гептаноата и результаты их тестирования на цитотоксичность по отношению к клеткам карциномы легких человека A549. Показана невозможность присоединения 5-(2-адамантилоксикарбонил)пентилизоцианата к нокодазолу в разных условиях.

Ключевые слова: бензимидазол, колхицин, нокодазол, тубулин, цитотоксичность.

В ходе исследований необычных «гибридных» аналогов противоопухолевого препарата колхицина [1, 2] нами получены его конъюгаты с адамантаном (рис. 1, структуры **1a** и **1б**) с очень высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам карциномы легких A549 ($EC_{50}=5-6$ нМ) и не описанным ранее в литературе механизмом действия на клеточный белок тубулин [2]. В данной работе с целью проверки универсальности обнаруженного механизма мы попытались заменить колхициновый фрагмент остатком нокодазола (рис. 2, 3), молекула которого обладает колхициноподобной активностью.

Сравнение расположения молекул колхицина и нокодазола в области связывания с тубулином, выполненное на основе данных работы [3], показывает, что наиболее удобной позицией присоединения линкера с адамантаном является атом азота имидазольного цикла нокодазола, близко расположенный к атому азота амидной группы колхицина (рис. 2).

Анализ литературы свидетельствует о том, что оптимальным в препаративном плане методом модификации атома азота имидазольного фрагмента ноко-

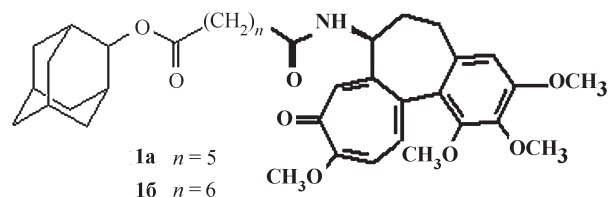


Рис. 1. Структура конъюгатов **1a** и **1б** (колхициновый фрагмент выделен темным цветом)

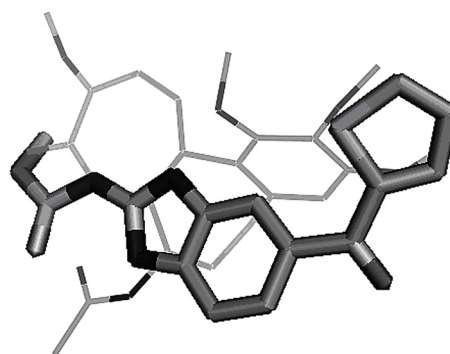


Рис. 2. Расположение молекул колхицина и нокодазола в области связывания колхицина с тубулином (атомы азота показаны черным цветом)

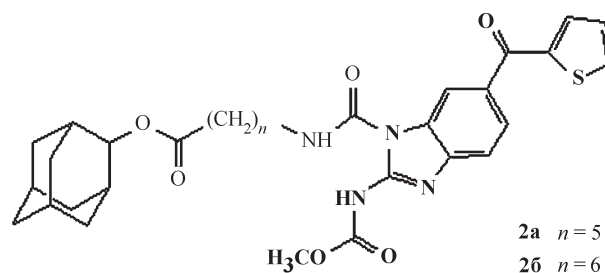


Рис. 3. Структуры предложенных конъюгатов **2a** и **2б** (темным выделен фрагмент нокодазола).

дазола является реакция с легко доступными изоцианатами, протекающая с высокими выходами [4–7]. На основании этих данных для синтетической реализации нами были предложены конъюгаты **2a,б** (рис. 3).

Для синтеза целевых соединений **2a** и **2б** в реакцию с дифенилазидофосфатом [8] (схема 1) ввели исходные моноэфиры **3a** и **3б** (полученные ранее взаи-

*Институт биологических наук, клеточной биологии и технологии биологических систем Ростовского университета, Ростов, Германия; **МГУ и Институт физиологически активных веществ Российской Академии наук.

модействием адамантола и полиангирида соответствующей дикарбоновой кислоты в присутствии DMAP [2]).

В результате были синтезированы соответствующие изоцианаты **4a** и **4b** (схема 1). В спектре ЯМР ^{13}C вещества **4a** наблюдали смещение сигнала изоцианатного атома углерода в область сильного поля ~ 128 м.д. по сравнению с таковым для карбоновой кислоты ~ 179 м.д.

Далее мы показали, что реакция изоцианата **4a** с модельным соединением (бензимидазолом) протекает при комнатной температуре с высоким выходом (схема 1). В спектре ЯМР ^1H продукта **5** присутствует пик протона амидной группы при 6.74 м.д., а в спектре ЯМР ^{13}C – сигнал атома углерода мочевиного фрагмента в области 149.92 м.д. Данные ИК-спектроскопии и элементного анализа также подтверждают строение соединения **5**.

Попытки проведения аналогичной реакции с нокодазолом не увенчались успехом: независимо от вариаций температуры и растворителя (CH_2Cl_2 , ДМСО и др.) из реакционной смеси были выделены только исходные вещества. Отметим, что к такому же результату привели и попытки N-ацилирования нокодазола с помощью хлорангирида кислоты **3a** (полученного по стандартной методике реакцией с SOCl_2 в присутствии Et_3N), а также с помощью самой кислоты **3a** как в системе DCC/DMAP, так и в присутствии 2-этокси-N-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолина (EEDQ). При этом аналогичный последнему варианту процесс с бензимидазолом (схема 2) протекает гладко и приводит к соединению

6 с выходом 97% (характеристики этого вещества см. в экспериментальной части).

Полученные в работе конъюгаты **5** и **6** были протестированы на противоопухолевую активность по отношению к клеткам A549 в стандартном колориметрическом тесте с использованием красителя 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил-2H-тетразолил-бромид (МТТ) по методике [9]. Это исследование показало резкое падение цитотоксичности соединений **5** и **6** ($\text{EC}_{50} > 10 \mu\text{M}$) по сравнению с соединениями-лидерами **1a** и **1b**. Возможность синтеза конъюгатов **2a** и **2b** или их аналогов с более высокой цитотоксичностью в настоящее время изучается.

Экспериментальная часть

Контроль хода реакций и чистоты веществ осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol-UV254. Хроматографическое разделение проводили на колонках с силикагелем Acros (40–60 мкм). Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали в растворе CDCl_3 при комнатной температуре на спектрометре «Bruker Avance 400» фирмы «Varian» с рабочей частотой соответственно 400 и 100 МГц. Химические сдвиги приведены в шкале δ (м.д.) относительно остаточного сигнала растворителя при 7.28 и 77.0 м.д. Элементный анализ выполняли на CHN-анализаторе «Vario micro cube». ИК-спектры регистрировали в пластинах с KBr на спектрофотометре «IR-200» («Thermo Nicolet»).

5-(2-Адамантилоксикарбонил)пентилизоцианат (4a). Смесь моноэфира дикарбоновой кислоты **3a** (0,111 г; 0,38 ммоль), триэтиламина (0,060 мл;

Схема 1

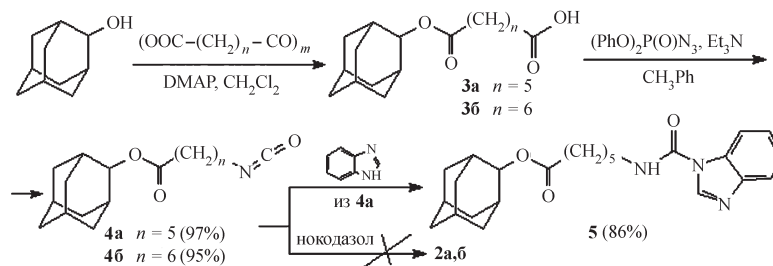
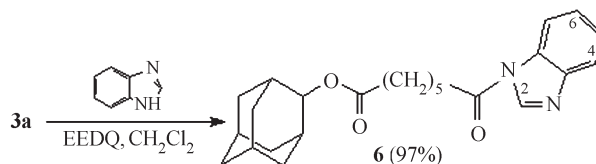


Схема 2



0,43 ммоль) и $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{N}_3$ (0,098 мл, 0,45 ммоль) в 10 мл толуола нагревали в течение 8 ч при 80°C. Растворитель упаривали при пониженном давлении, остаток хроматографировали (элюент: этилацетат – петролейный эфир (40–70°C), 1:15). Получено 0,108 г соединения **4a** (выход 97%) в виде бесцветной маслянистой жидкости, R_f 0,68. Спектр ЯМР ^1H : 1.41–1.48 м (2H), 1.56–1.59 м (2H, H^{Ad}), 1.67 м (4H), 1.75–1.79 м (4H, H^{Ad}), 1.85–1.87 (4H, H^{Ad}), 1.99–2.02 м (4H, H^{Ad}), 2.37 т (2H, $J=7.2$ Гц, CH_2CO_2), 3.32 т (2H, $J=6.7$ Гц, CH_2NCO), 4.93 м (1H, $\text{H}^{7\text{-Ad}}$). Спектр ЯМР ^{13}C : 24.50, 26.10, 26.98, 27.23, 30.79, 31.79, 31.97, 34.61, 36.32, 37.37, 42.79 (CH_2NCO), 76.90 ($\text{C}^{2\text{-Ad}}$), 128.27 (NCO), 172.82 (C=O). Спектр ИК (cm^{-1}): 1256, 1421, 1452, 1720 (C=O), 2277 (NCO), 2929, 3054.

6-(2-Адамантилоксикарбонил)гексизоцианат (4б) синтезировали аналогично соединению **4a** из кислоты **3б** (0,150 г; 0,49 ммоль), триэтиламина (0,074 мл, 0,56 ммоль) и $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{N}_3$ (0,115 мл; 0,53 ммоль). Получено 0,142 г изоцианата **4б** (выход 95%) в виде бесцветной маслянистой жидкости, R_f 0,70. Спектр ЯМР ^1H : 1.34–1.42 м (2H); 1.53–1.57 м (2H, H^{Ad}); 1.59–1.69 м (6H); 1.72–1.77 м (4H, H^{Ad}), 1.82–1.85 (4H, H^{Ad}); 1.97–2.01 м (4H, H^{Ad}); 2.33 т (2H, $J=7.2$ Гц, CH_2CO_2); 3.28 т (2H, $J=6.7$ Гц, CH_2NCO); 4.91 м (1H, $\text{H}^{2\text{-Ad}}$). Спектр ИК (cm^{-1}): 1264, 1420, 1448, 1723 (C=O), 2270 (NCO), 2900–3050 (уш. с).

2-Адамантил-6-[(1H-бензимидазол-1-илкарбонил)амино]гексаноат (5). Смесь изоцианата **4a** (0,100 г; 0,34 ммоль) и бензимидазола (0,057 г; 0,48 ммоль) в 5 мл хлористого метилена перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривали, остаток хроматографировали (элюент: этилацетат – петролейный эфир (40–70°C), 1:7). Получено 0,12 г соединения **4a** (выход 86%) в виде бесцветной маслянистой жидкости. Спектр ЯМР ^1H : 1.43–1.50 м (2H), 1.52–1.55 м (2H, H^{Ad}), 1.69–1.75 м (8H, $\text{H}^{\text{CH}_2+\text{H}^{\text{Ad}}}$), 1.80–1.83 м (4H, H^{Ad}), 1.96–1.99 м (4H, H^{Ad}), 2.38 т (2H, $J=7.1$ Гц, CH_2CO_2), 3.53 дд (2H, $J=6.9, 5.8$ Гц, CH_2NCO), 4.91 м (1H, $\text{H}^{2\text{-Ad}}$), 6.74 уш. с (1H, NH), 7.33–7.42 м (2H, $\text{H}^{5,6\text{-Ar}}$), 7.78 д (1H, $J=8.0$ Гц, $\text{H}^{4\text{-Ar}}$), 7.96 д (1H, $J=8.0$ Гц, $\text{H}^{7\text{-Ar}}$), 8.51 с (1H, $\text{H}^{2\text{-Ar}}$). Спектр ЯМР ^{13}C : 24.13, 25.97, 26.71, 26.6, 28.67, 31.53, 31.66, 34.30, 36.05, 37.09, 42.48 (CH_2NCO), 76.54 ($\text{C}^{2\text{-Ad}}$), 113.43, 120.22, 123.80, 124.83, 131.36 ($\text{C}^{7a\text{-Ar}}$), 140.49 ($\text{C}^{2\text{-Ar}}$), 143.57 ($\text{C}^{3a\text{-Ar}}$), 149.92 (N–C=O), 173.20 (C=O). Спектр ИК (cm^{-1}): 966, 985,

1043, 1101, 1215, 1255, 1290, 1319, 1340, 1452, 1477, 152, 1543, 1610, 1726 (C=O), 2856, 2910, 2927, 3059, 3109. Элементный анализ. Найдено (%): C (70,44), H (7,68), N (10,19). $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3$. Вычислено (%): C (70,39), H (7,63), N (10,26).

2-Адамантил-7-(1H-бензимидазол-1-ил)-7-оксогепаноат (6). Раствор кислоты **3a** (0,021 г; 0,071 ммоль), бензимидазола (0,010 г; 0,085 ммоль) и EEDQ (0,021 г; 0,085 ммоль) в 5 мл CH_2Cl_2 перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривали, остаток хроматографировали (элюент: этилацетат – петролейный эфир (40–70°C), 1:4, затем хлористый метилен – метанол, 1:20). Получено 0,027 г соединения **6** (выход 97%) в виде бесцветной маслянистой жидкости. Спектр ЯМР ^1H : 1.48–1.61 м (4H), 1.70–1.81 м (6H), 1.83 м (4H), 1.89–1.95 м (2H), 1.95–2.04 м (4H, H^{Ad}), 2.40 т (2H, $J=7,4$ Гц, CH_2CO_2), 3.03 т (2H, $J=7,3$ Гц, CH_2CON), 4.94 м (1H, $\text{H}^{2\text{-Ad}}$), 7.37–7.46 м (2H, $\text{H}^{5,6\text{-Ar}}$), 7.81 дд (1H, $J=7.4, 1.1$ Гц, $\text{H}^{4\text{-Ar}}$), 8.25 д (1H, $J=7.1$ Гц, $\text{H}^{7\text{-Ar}}$), 8,41 с (1H, $\text{H}^{2\text{-Ar}}$). Элементный анализ. Найдено (%): C (73,12), H (7,64), N (7,18). $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$. Вычислено (%): C (73,07), H (7,66), N (7,10).

МТТ-тест на цитотоксичность

Клетки карциномы легких человека A549 высаживали в плашки с 96 ячейками (на ячейку 3000–6000 клеток в 200 $\mu\text{л}$ культуральной среды DMEM с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота). Затем клетки обрабатывали 24 ч растворами веществ **5** или **6** в ДМСО в интервале концентраций 0,005–10,000 μM или колхицином в концентрации 0,001–0,300 μM в качестве положительного контроля (8 ячеек для каждого значения концентрации). Раствор МТТ 5 мг/мл готовили в фосфатно-солевом буфере и фильтровали через 0,22 мм фильтр. За 2 ч до окончания выдержки тестируемого соединения в каждую ячейку добавляли 20 $\mu\text{л}$ стерильного раствора МТТ так, чтобы конечная концентрация составила 0,45 мг/мл. После удаления клеточной среды в каждую ячейку добавляли 100 $\mu\text{л}$ лизирующего раствора (ДМСО, содержащий 10% додецилсульфата натрия и 0,6% уксусной кислоты). Образовавшиеся кристаллы формазана солибилизировали тщательным перемешиванием на качалке. Оптическую плотность измеряли при 590 нм с референсным фильтром 690 нм на приборе «EL808 Ultra Microplate Reader» («Bio-Tek Instruments», США).

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда Александра Гумбольдта (3.4-Fokoop-Rus/1015567) и РФФИ (проекты № 12-03-00720_а и № 11-03-12088_офи-м).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zefirova O.N., Nurieva E.V., Lemcke H., Ivanov A.A., Shishov D.V., Weiss D.G., Kuznetsov S.A., Zefirov N.S. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. **18**. P. 5091.
2. Zefirova O.N., Nurieva E.V., Shishov D.V., Baskin I.I., Fuchs F., Lemcke H., Weiss D.G., Schröder F., Zefirov N.S., Kuznetsov S.A. // *Bioorg. Med. Chem.* 2011. **19**. P. 5529.
3. Nguyen T.L., McGrath C., Hermone A.R., Burnett J.C., Zaharevitz D.W., Day B.W., Wipf P., Hamel E., Gussio R. // *J. Med. Chem.* 2005. **48**. P. 6107.
4. Пилюгин В. С., Михайлюк А. Н., Косарева В. М., Валитов Р. Б., Киселева Г. В., Кузнецова С. Л. // *ЖОХ.* 2003. **73**. С. 1367. (англ. Pilyugin V.S., Mikhailiuk A.N., Kosareva V.M., Valitov R.B., Kiseleva G.V., Kuznetsova S.L. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2003. **73**. P. 1293).
5. Hernandez-Luis F., Hernandez-Campos A., Yopez-Mulia L., Cedillo R., Castillo R. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001. **11**. P. 1359.
6. Chassaing C., Berger M., Heckerath A., Ilg T., Jaeger M., Kern C., Schmid, K., Uphoff M. // *J. Med. Chem.* 2008. **51**. P. 1111.
7. Ross S. T., Kruse L. I., Kingsbury W. D., Erhard K. F., Harrsch P. B. // *Eur. J. Med. Chem.* 1989. **24**. P. 363.
8. Cremlyn R. J. W. // *Aust. J. Chem.* 1973. **26**. P. 1591.
9. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. **65**. P. 55.

Поступила в редакцию 13.09.12

SYNTHESIS AND BIOTESTS OF BENZIMIDAZOLE CONJUGATE WITH ADAMANTANE

E.V. Nurieva, A.A. Beloglazkina, D.V. Shishov, V.V. Gogol, Y.S. Glazkova, B. Wobith, N.S. Zefirov, S.A. Kuznetsov, O.N. Zefirova

(Division of Organic Chemistry)

The synthesis of 2-adamantyl-6-[(1*H*-benzimidazole-1-ylcarbonyl)amino]hexanoate and 2-adamantyl-7-(benzimidazole-1-yl)-7-oxo-heptanoate and the results of their testing for cytotoxicity against human lung carcinoma cells A549 are presented in the paper. The impossibility of 5-(2-adamantylloxycarbonyl)pentylisocyanate addition to nocodazole under various conditions is demonstrated.

Key words: benzimidazole, colchicine, nocodazole, tubulin, cytotoxicity.

Сведения об авторах: *Нуриева Евгения Владимировна* – науч. сотр. кафедры органической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (E.Selunina@org.chem.msu.ru); *Белоглазкина Анастасия Александровна* – студентка химического факультета МГУ (anastas-beloglaz@mail.ru); *Шишов Дмитрий Вениаминович* – аспирант химического факультета МГУ (shishov_d@mail.ru); *Гоголь Владимир Владимирович* – студент химического факультета МГУ (Vl.gogol@gmail.com); *Глазкова Яна Сергеевна* – студентка химического факультета МГУ (janglaz@bk.ru); *Биргит Вобит* – ассистент Института биологических наук, клеточной биологии и технологии биологических систем Ростокского университета, Германия (birgit.wobith@uni-rostock.de); *Зефилов Николай Серафимович* – зав. кафедрой органической химии химического факультета МГУ, профессор Института физиологически активных веществ РАН, докт. хим. наук, акад. РАН (zefirov@org.chem.msu.ru); *Кузнецов Сергей Анатольевич* – доцент Института биологических наук, клеточной биологии и технологии биологических систем Ростокского университета, Германия, докт. биол. наук (sergei.kuznetsov@uni-rostock.de); *Зефирова Ольга Николаевна* – доцент кафедры органической химии химического факультета МГУ, ст. науч. сотр. Института физиологически активных веществ РАН, докт. хим. наук (olgaz@org.chem.msu.ru).