



СИНТЕЗ И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РЯДА ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ 2,3-АЛЛЕНАТОВ

© 2020 г. Р. Н. Маликова*, И. М. Сахаутдинов*., М. А. Максимова**,
У. Ш. Кузьмина**, Ю. В. Вахитова**, М. С. Юнусов*

*Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,
Россия, 450054, Республика Башкортостан, Уфа, пр-т Октября, 71

**Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
Россия, 450054, Республика Башкортостан, Уфа, пр-т Октября, 71

Поступила в редакцию 22.05.2019 г.

После доработки 05.06.2019 г.

Принята к публикации 09.07.2019 г.

Получена серия новых фталиimid- и малеопимаримид производных 2,3-диеноатов (алленоатов) и исследовано их цитотоксическое действие в отношении клеточных линий опухолевого (HerG2, Jugkat) и нормального происхождения (НЕК293). Наибольшим цитотоксическим действием обладают *N*-производные аминокислот, содержащие имидамалеопимаровый фрагмент, которые можно отнести к перспективным веществам с потенциальной противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: *N*-производные аминокислот, 2,3-диеноаты, ω-карбоксииаллилфталиимиды, ω-карбоксииаллилимиды малеопимаровой кислоты, противоопухолевая активность, цитотоксическая активность

DOI: 10.31857/S0132342320010054

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день известно около 200 природных и более 2700 синтезированных алленовых соединений [1, 2]. Интенсивные исследования по созданию потенциально биологически активных соединений привели к открытию целого ряда новых алленов, которые являются универсальными строительными блоками и обладают высокой противораковой, цитотоксической, антибактериальной, противовирусной и другими активностями [2–5]. Вдохновленные интригующей биоактивностью многих природных алленовых соединений, в том числе производимых живыми организмами, данный фрагмент в настоящее время систематически вводят в фармакологически активные классы соединений (стероиды, простагландины, аминокислоты, нуклеозиды). Например, феромон, выделенный из самца жука зерновки бобовой *Acanthoscelides obtectus* (Say), представляет собой интерес как пестицид [6]. Алленовый каротиноид фукоксантин, содержащийся в бурых, золотистых и диатомовых водорослях, получил повышенное внимание в связи с противораковой активностью [7]. Это соедине-

ние ингибирует рост клеток меланомы [8], лейкозных клеток человека [9], клеток рака простаты [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью выявления зависимости структура–активность в данной работе синтезированы новые и ранее известные алленоаты на основе фталиimid- и малеопимаримид производных аминокислот. Выбор именно таких *N*-замещенных аминокислот обусловлен тем, что соединения, содержащие остаток фталиимида присутствуют в структуре таких лекарственных препаратов, как фталазол, обладающий противомикробным действием, талидомид – седативное снотворное средство и ряда других. Малепимаровая кислота и ее производные являются аддуктами канифоли с малеиновым ангидридом и так же обладают широким спектром биологической активности. Среди прочих методов получения алленов особый интерес вызывает реакция Виттига, которая протекает в мягких условиях и позволяет варьировать заместители в α-положении у исходных карбоновых кислот и илидов и получать ди-, три- и тетразамещенные аллены, которые сложно получить другими методами. В ходе реакции хлорангидриды *N*-замещенных карбоновых кислот с триэтиламиноом дают кетены, которые *in situ* во-

Сокращения: МРІ – малеопимаримид; РНТИ – фталиимид.
Автор для связи: (тел.: +7 (906) 104-48-19; эл. почта: ioh039@mail.ru).

влекаются в реакцию олефинирования по Виттигу с метил(трифенилфосфоранилиден)ацетатом ($\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Me}$) или метил-2-(трифенилфос-

форанилиден)пропионатом ($\text{Ph}_3\text{P}=\text{CMeCO}_2\text{Me}$) с образованием ди- и тризамещенных алленоатов соответственно (схема 1).

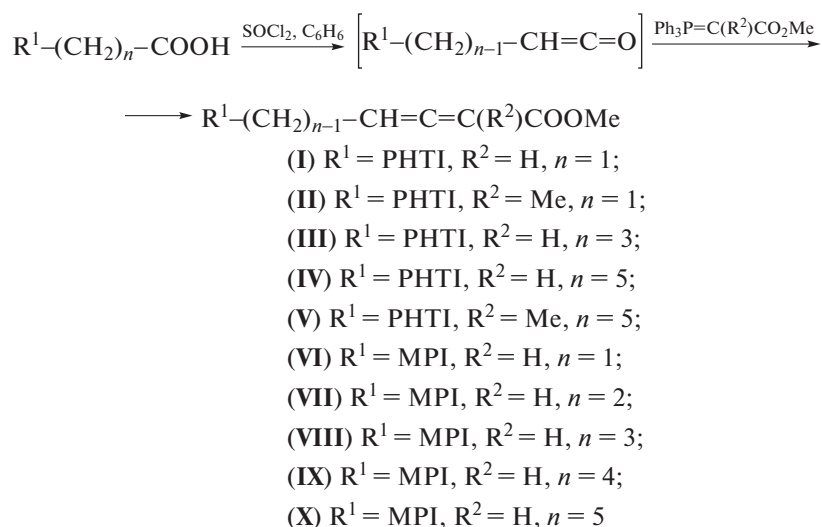


Схема 1. Синтез алленоатов из фталимид- и малеопимаримид производных аминокислот.

Структуры полученных соединений доказаны физико-химическими методами анализа. Для корректного отнесения сигналов в спектрах ЯМР продуктов реакций использовали методы гомо- и гетероядерной двумерной корреляции HSQC и HMBC. Для синтезированных алленоатов в спектре ЯМР ^{13}C информативными являются сигналы двух терминальных углеродных атомов в области δ_c 87.72–106.49 м.д., а также центрального четвертичного углеродного атома алленового фрагмента, проявляющийся в области δ_c 208.31–219.84 м.д.

Как видно из табл. 1, большинство из изученных соединений (I)–(X) проявляют цитотоксическую активность *in vitro*. Наименьшую цитотоксическую активность имеют аллены (II), (V) – соединения с метильной группой в альфа-положении к сложноэфирному фрагменту. Наиболее выраженное действие в отношении клеток опухолевого происхождения проявляют алленаты (VI), (IX), (X), полученные на основе *N*-малеопимаримидзамещенных глицина, аминоксариановой и аминоксариановой кислот. Подчеркнем, что наибольшую чувствительность к данным соединениям проявляют клетки лимфобластной лейкемии Jurkat.

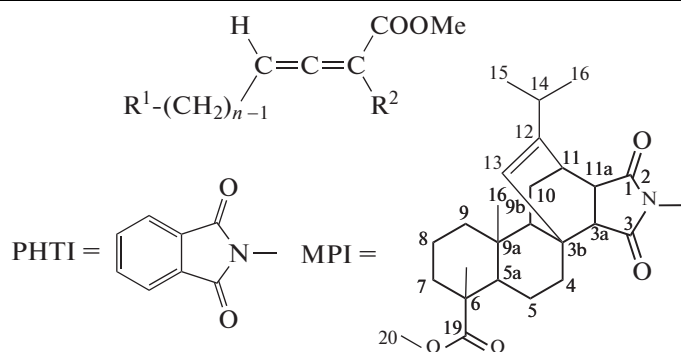
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК-спектры записывали на приборе IR-Prestage-21 (Fourier Transform Spectrophotometer – Shimadzu). Спектры ЯМР получены в CDCl_3 (δ , м.д.) на спектрометре Bruker-AM 500 с рабочей частотой 500 (^1H), 125.76 МГц (^{13}C), внутренний

стандарт – тетраметилсилан (Me_4Si). За ходом реакции следили с использованием тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А (Россия), вещества обнаруживали с помощью УФ-облучения, паров йода, опрыскивания пластинок раствором нингидринового проявителя или раствором анисового альдегида с последующим нагреванием при 100–120°C. Масс-спектры получены на хроматомасс-спектрометре LCMS-2010EV фирмы “Shimadzu” в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД). Температуру плавления определяли на нагревательном столике “Voetius”. Продукты реакции выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле Chemapol с размером частиц 40/100 и 100/160 мкм, элюент петролейный эфир–этилацетат, 7/3. Элементный анализ выполнен с помощью автоматического CHNS-анализатора EUROEA-3000. *N*-Фталимидзамещенные аминокислоты получены по известной методике [4]. Основные физико-химические характеристики соединений (IV), (V), а также алленов (VI), (VII), (VIII), (X), полученных, соответственно, из метил-*N*-малеопимаримидзамещенных глицина, β -аланина, γ -аминоасляной и аминоксариановой кислот, были описаны нами в предыдущих работах [11–15]. Характеристики впервые синтезированных алленоатов приведены ниже.

Общая методика получения алленоатов межмолекулярной реакцией Виттига. К суспензии 5 ммоль *N*-замещенной аминокислоты в 10 мл сухого бензола добавляли пятикратный избыток хлористого тионила. Смесь кипятили с обратным холодильником с хлоридкальциевой трубкой в

Таблица 1. Цитотоксическая активность соединений (I)–(X) *in vitro*



Соединения	Выход, %	R ¹	n	R ²	IC ₅₀ , мкМ		
					HEK293	Jurkat	HepG2
(I)	63	PHTI	1	H	25.3 ± 2.9	10.4 ± 0.7	11.1 ± 0.2 ^б (p = 0.0019)
(II)	73	PHTI	1	Me	110.0 ± 12.5	23.0 ± 2.7 ^а (p = 0.0003)	71.2 ± 3.3 ^б (p = 0.0004)
(III)	87	PHTI	3	H	18.6 ± 2.1	5.5 ± 0.8 ^а (p = 0.0002)	22.9 ± 0.2 ^б (p = 0.0139)
(IV)	56	PHTI	5	H	42.2 ± 4.4	20.4 ± 1.7 ^а (p = 0.0002)	118.8 ± 7.8 ^б (p = 0.0002)
(V)	42	PHTI	5	Me	89.1 ± 4.9	31.3 ± 3.1 ^а (p = 0.0002)	>1 мМ
(VI)	73	MPI	1	H	79.15 ± 3.99	3.82 ± 0.78 ^а (p = 0.0002)	81.22 ± 7.88
(VII)	84	MPI	2	H	20.98 ± 1.14	6.12 ± 1.36	30.69 ± 9.55
(VIII)	70	MPI	3	H	14.3 ± 0.8	4.4 ± 1.2 ^а (p = 0.0327)	8.1 ± 3.2
(IX)	75	MPI	4	H	11.82 ± 0.69	1.58 ± 0.16 ^а (p = 0.0002)	16.53 ± 1.12 ^б (p = 0.0011)
(X)	70	MPI	5	H	13.52 ± 0.22	2.02 ± 0.26 ^а (p = 0.0002)	18.87 ± 0.58

Примечания. ^{а, б} Различия значений IC₅₀ в клетках Jurkat^а и HepG2^б относительно значений IC₅₀ в клетках HEK293 статистически достоверны (однофакторный парный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Тьюки).

течение 3 ч. Растворитель и избыток хлористого тионила упаривали на роторном испарителе. Полученный хлорангидрид кислоты далее использовали без дополнительной очистки. К раствору 1.67 г (5 ммоль) метил(трифенилфосфоранилиден)ацетата или 1.74 г (5 ммоль) метил-2-(трифенилфосфоранилиден)пропионата в CH₂Cl₂ прибавляли по каплям эквимольное количество Et₃N, раствор охлаждали до –10°C. К этому раствору медленно по каплям добавляли охлажденный раствор полученного хлорангидрида кислоты. Реакционную массу перемешивали в течение 0.5 ч и в течение 4–6 ч выдерживали при 0°C. Растворитель отгоняли, продукты реакции выделяли колоночной хроматографией.

Метил-4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-2-метилбуга-2,3-диеноат (II). Получен на основе *N*-фталимидзамещенного глицина в количестве 1.03 г и метил-2-(трифенилфосфоранилиден)пропионата. Выход 0.94 г (73%). Белое кристаллическое вещество, т. пл. 102–104°C. Спектр ЯМР ¹H: 2.04 (с, 3 H, CH₃), 3.72 (с, 3 H, CH₃), 7.08 (м, 1 H, CH), 7.74 (м, 2 H, C₆H₄), 7.83 (м, 2 H, C₆H₄). Спектр ЯМР ¹³C: 18.54 (CH₃), 53.83 (CH₃), 91.95 (CH), 106.49 (C), 125.37 (CH_{аром}), 133.79 (C_{аром}), 136.61 (CH_{аром}), 167.36 (C=O), 168.23 (C=O), 208.31 (=C=). Масс-спектр: *m/z* 258 [MН]⁺, 257 [M][–]. Вычислено C₁₄H₁₁NO₄ (257.24), %: C, 65.37; H, 4.31; N, 5.44; O, 24.88. Найдено, %: C, 65.32; H, 4.40; N, 5.39.

Метил-8-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)окта-2,3-диеноат (IV). Получен на основе 5-*N*-фталимидзамещенной аминокснковой кислоты в количестве 1.3 г и метил(трифенилфосфоранилиден)ацетата. Выход 0.83 г (56%). Белое маслообразное вещество. Спектр ЯМР ^1H : 1.52 (м, 2H, CH_2), 1.74 (м, 2H, CH_2), 2.319 (м, 2H, CH_2), 3.65 (м, 2H, CH_2), 3.69 (с, 3H, CH_3), 5.58 (м, 2H, 2= CH), 7.70 (м, 2H, C_6H_4), 7.80 (м, 2H, C_6H_4). Спектр ЯМР ^{13}C : 25.78 (CH_2), 26.88 (CH_2), 27.77 (CH_2), 37.53 (CH_2), 51.87 (CH_3), 88.14 (CH), 94.78 (CH), 123.11 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 132.05 ($\text{C}_{\text{аром}}$), 133.84 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 166.45 (C=O), 168.3 (C=O), 212.29 (=C=). Масс-спектр: m/z 300 [MH] $^+$, 299 [M] $^-$. Вычислено $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ (299.32), %: C, 68.21; H, 5.72; N, 4.68; O, 21.38. Найдено, %: C, 68.12; H, 5.81; N, 4.65.

Метил-8-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-2-метилокта-2,3-диеноат (V). Получен на основе 5-*N*-фталимидзамещенной аминокснковой кислоты в количестве 1.3 г и метил-2-(трифенилфосфоранилиден)пропионата. Выход 0.65 г (42%). Прозрачное маслообразное вещество. Спектр ЯМР ^1H : 1.42 (м, 2H, CH_2), 1.74 (м, 2H, CH_2), 1.81 (с, 3H, CH_3), 2.13 (м, 2H, CH_2), 3.63 (с, 3H, CH_3), 3.72 (м, 2H, CH_2), 5.38 (м, 1H, CH), 7.65 (м, 2H, C_6H_4), 7.88 (м, 2H, C_6H_4). Спектр ЯМР ^{13}C : 15.84 (CH_3), 23.42 (CH_2), 26.18 (CH_2), 37.01 (CH_2), 42.21 (CH_2), 51.14 (CH_3), 96.37 (C), 102.54 (CH), 123.08 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 131.82 ($\text{C}_{\text{аром}}$), 133.44 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 162.35 (C=O), 171.63 (C=O), 219.84 (=C=). Масс-спектр: m/z 314 [MH] $^+$, 313 [M] $^-$. Вычислено $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ (313.34), %: C, 68.99; H, 6.11; N, 4.47; O, 20.42. Найдено, %: C, 68.90; H, 6.19; N, 4.35.

Метил-12-изопропил-2-(7'-метокси-7'-оксогекса-4',5'-диен-1'-ил)-6,9а-диметил-1,3-диоксогексадекагидро-3б,11-этенонфто[2,1-е]изоиндол-6-карбоксилат (IX). Получен на основе метил-5-*N*-малеопимаримидзамещенной аминокснковой кислоты в количестве 2.56 г и метил(трифенилфосфоранилиден)ацетата. Выход 2.05 г (75%), желтое маслообразное вещество. ИК, ν см^{-1} : 2956, 2939, 1658, 1465, 740. Спектр ЯМР ^1H : 0.54 (с, 3H, H17), 0.90 (м, 6H, H15, 16), 0.96 и 1.41 (м, 2H, H9), 1.12 (с, 3H, H18), 1.15 и 1.45 (м, 2H, H5), 1.20 и 1.66 (м, 2H, H10), 1.40 (м, 1H, H9b), 1.52 (м, 2H, H8), 1.54 и 1.70 (м, 2H, H7), 1.68 и 2.45 (м, 2H, H4), 1.72 (м, 2H, H2'), 1.74 (м, 1H, H5a), 2.18 (м, 1H, H14), 2.40 (м, 2H, H3'), 2.49 (м, 1H, H3a), 2.72 (м, 1H, H11a), 2.98 (м, 1H, H11), 3.31 (м, 2H, H1'), 3.61 (с, 3H, H20), 3.68 (с, 3H, H8'), 5.33 (с, 1H, H13), 5.54 (м, 1H, H4' $_{\text{аллен}}$), 5.56 (м, 1H, H6' $_{\text{аллен}}$). Спектр ЯМР ^{13}C : 15.56 (C17), 16.57 (C18), 17.11 (C8), 20.06 (C15), 20.88 (C16), 21.65 (C5), 24.72 (C2'), 26.64 (C3'), 27.76 (C10), 32.87 (C14), 35.22 (C4), 35.34 (C11), 36.43 (C7), 38.03 (C1'), 37.03 (C9a), 38.09 (C9), 40.48 (C3b), 44.77 (C11a), 47.34 (C6), 49.55 (C5a), 51.89 (C20),

51.96 (C8'), 52.43 (C3a), 54.22 (C9b), 88.58 (C4' $_{\text{аллен}}$), 94.24 (C6' $_{\text{аллен}}$), 124.18 (C13), 146.91 (C12), 166.30 (C7'), 177.23 (C1), 178.40 (C3), 179.10 (C19), 212.13 (C5'). Масс-спектр: m/z 550 [M] $^-$, 552 [MH] $^+$. Вычислено $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_6$ (551.71), %: C, 71.84; H, 8.22; N, 2.54. Найдено, %: C, 71.98; H, 8.40; N, 2.49.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Цитотоксические свойства соединений определяли *in vitro* с помощью МТТ-метода в 96-луночных планшетах [16]. Клетки линии НЕК293 и НерG2 культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия), клетки линии Jurkat – в среде RPMI (Биолот, Россия) в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 мМ *L*-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина сульфата. После 24 ч культивирования в каждую лунку вносили исследуемые соединения в конечных концентрациях 1, 10, 100 мкМ (в 0.1% DMSO) и инкубировали в течение 48 ч, после чего добавляли МТТ-реагент и определяли оптическую плотность при 540 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 600 нм с помощью планшетного анализатора (2300 EnSpire® MultimodePlateReader; PerkinElmer, США). Значение концентрации соединений, вызывающее 50%-е подавление жизнеспособности клеток (IC_{50}), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPadPrism v. 5.02 (GraphPadSoftware Inc., США). Данные, полученные в 3 независимых экспериментах, выражали в виде среднего значения 3 измерений для каждой концентрации \pm стандартная ошибка среднего, по отношению к значениям контроля (0.1% DMSO), принятого за 100%.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена по теме АААА-А17-117011910025-6 госзадания и при финансовой поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 18-53-41004. Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Химия” (УФИХ РАН), “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”, Уфа).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dembitsky V.M., Maoka T.* // *Prog. Lipid Res.* 2007. V. 46(6). P. 328–375.
2. *Hoffmann-Röder A., Krause N.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. V. 43. P. 1196–1216.
3. *Ban H.S., Onagi S., Uno M.* // *ChemMedChem.* 2008. V. 3. P. 1094–1103.
4. *Гринштейн Дж., Виноц М.* Химия аминокислот и пептидов. М: Мир, 1965. С. 578.
5. *Zhang F, Liu Sh., Lu X., Guo L., Zhang H., Che Y.* // *J. Nat. Prod.* 2009. V. 72. P. 1782–1785.
6. *Horler D.F.* // *J. Chem. Soc. C.* 1970. V. 6. P. 859.
7. *Dembitsky V. M., Maoka T.* // *Progress in Lipid Research.* 2007. V. 46. P. 328–375.
8. *Kim K.-N., Ahn G.* // *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2013. V. 35. P. 39–46.
9. *Hosokawa M., Wanezaki S.* // *Food Sci. Technol. Res.* 1999. V. 5. P. 243.
10. *Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H., Sugawara T., Miyashita K., Nagao A.* // *J. Nutr. L.* 2001. V. 131. P. 3303.
11. *Сахаутдинов И.М., Батыршин И.Р., Фатыхов А.А.* // *Ж. структ. хим.* 2013. Т. 54. № 2. С. 331–335.
12. *Sakhautdinov I.M., Gumerov A M., Baturshin I.R.* // *Heterocycles.* 2014. V. 89. P. 641–651.
13. *Сахаутдинов И.М., Гумеров А.М., Гибадуллина Г.Г.* // *Химия природ. соед.* 2015. Т. 51. С. 332.
14. *Сахаутдинов И.М., Гумеров А.М., Маликова Р.Н., Фатыхов А.А., Юнусов М.С.* // *Химия природ. соед.* 2016. Т. 52. № 4. С. 562–565.
15. *Malikova R.N., Sakhautdinov I.M., Abdullin M.F., Mukhametyanova A.F., Yunusov M.S.* // *Chem. Nat. Compd.* 2017. V. 53. P. 341–344.
16. *Mosmann T.* // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.

Synthesis and Cytotoxic Activity of a Number of Functionalized 2,3-Allenates

R. N. Malikova*, I. M. Sakhautdinov*[#], M. A. Maksimova, U. Sh. Kuzmina**,
Yu. V. Vakhitova**, and M. S. Yunusov***

[#]Phone: +7 (906) 104-48-19; e-mail: ioh039@mail.ru

*Ufa Institute of Chemistry UFRS RAS, Prospect Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

**Institute of Biochemistry and Genetics, Prospect Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

A series of new functionalized allenates was obtained and their cytotoxic effect was investigated against tumor cell lines (HepG2, Jurkat) and normal origin (HEK293). Allenic compounds with diterpene fragment have the highest cytotoxic effect, which can be attributed to promising substances with potential antitumor activity.

Keywords: N-derivatives of amino acids, 2,3-dienoates, ω -carboxyallenylphthalimides, ω -carboxyallenylimides of maleopimaric acid, anti-tumor activity, cytotoxic activity