

© Коллектив авторов, 2006

Р. И. Тарасова¹, О. В. Воскресенская¹, Р. М. Елисеенкова³, И. И. Семина²,
Е. В. Шиловская², Ш. К. Латыпов³, А. А. Баландина³, А. А. Бредихин³

СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНЫЙ СИНТЕЗ И НЕЙРОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО ФОСФОРИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

¹ Казанский государственный технологический университет;

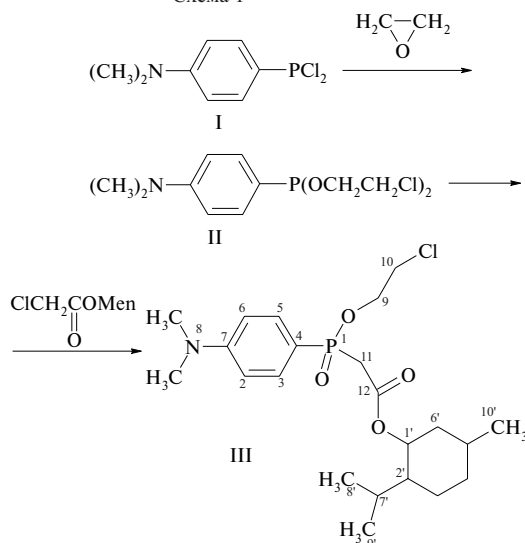
² Казанский государственный медицинский университет;

³ Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова Казанского научного центра РАН

Разработан стереоселективный синтез оптически активного ментилового эфира 2-хлорэтоксид-4'-диметиламинофенилфосфорилуксусной кислоты (КАПАМ). Структура КАПАМ подтверждена данными элементного анализа, масс-спектра, ИК и ЯМР (³¹P, ¹H, ¹³C) спектроскопии. Изучены фармакологические эффекты КАПАМ. Соединение обладает нейротропной активностью депримирующего типа и миорелаксантным действием.

Изученные нами перспективные лекарственные средства фосеназид и гидразид 2-хлорэтоксид-4'-диметиламинофенилфосфорилуксусной кислоты (КАПАХ) относятся к новому классу нейроактивных соединений — гидразидам фосфорилуксусной кислоты, не обладающих антихолинэстеразным действием и характеризующимся оригинальным комплексом эффектов на ЦНС [1, 2]. Особый интерес представляет КАПАХ который, наряду с антидепрессивным действием, улучшает память и повышает способность к обучению [3]. По данным рентгенографических исследований кристаллы КАПАХ представляют собой рацемическую смесь *R,S*-энантимеров.

Схема 1



В настоящей работе изучен синтез и фармакологические эффекты оптически активного ментилового эфира 2-хлорэтоксид-4'-диметиламинофенилфосфорилуксусной кислоты (КАПАМ), который по данным рентгеноструктурного анализа (РСА) имеет *S_p* конфигурацию и является одним из предшественников оптических антиподов КАПАХ.

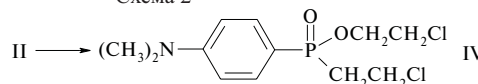
Синтез КАПАМ проводился аналогично разработанной нами ранее “one pot” технологии получения КАПАХ [4] по приведенной ниже схеме 1.

По данным спектра ЯМР ³¹P в реакционной смеси содержится 78 % целевого продукта (III) при соотношении диа-

стереомеров *S_p* и *R_p* как 10:1. Кристаллизацией из реакционной смеси выделен диастереомер *S_p* с выходом 38,9 %. Химическая структура диастереомера (*S_p*-III) подтверждена данными элементного анализа, спектров ИК, ЯМР (¹H, ³¹P, ¹³C) и масс-спектром.

Помимо диастереомера (*S_p*-III) в реакционной смеси идентифицированы 2-хлорэтиловый эфир 4'-диметиламинофенил-2-хлорэтилфосфиновой кислоты (IV) и 4-диметиламинофенилфосфонистая кислота (V). Продукт (IV) нами получен встречным синтезом по схеме 2.

Схема 2



Полученные результаты показали, что взаимодействие бис-2-хлорэтилового эфира 4-диметиламинофенилфосфонистой кислоты с ментильным эфиром хлоруксусной кислоты протекает стереоселективно, что может быть обусловлено пространственным фактором из-за наличия ментильного фрагмента. При аналогичном взаимодействии с метилхлорацетатом процесс протекает нестереоспецифично и образуется рацемическая смесь соответствующего фосфорилацетата, взаимодействие которого с гидразин-гидратом по данным рентгенографических исследований приводит к образованию КАПАХ в виде рацемата.

Экспериментальная химическая часть

ИК спектры соединений сняты на ИК спектрометре VESTOR-22 (фирма “Bruker”, Германия) в вазелиновом масле. Спектры ЯМР ¹H, ¹³C, ³¹P, ³¹P-{¹H} записаны при 30 °C на приборах Bruker AVANCE-600 (150,86 МГц, ¹³C; 600,00 МГц, ¹H), Bruker CXP-100 (36,48 МГц, ³¹P) в CDCl₃ относительно сигнала остаточных протонов или углерода растворителя, или внешнего стандарта — H₃PO₄. Хромато-масс-спектр снят на масс-спектрометре MAT-212. Хроматограмма: температура инжектора 220 °C, начальная температура колонки 100 °C, время термостатирования при начальной температуре 6 мин, конечная температура 220 °C, время выдержки при конечной температуре 20 мин, скорость нагрева 6 °/мин.

Запись масс-спектра начиналась спустя 4 мин после введения раствора образца. Оптическое вращение измерено на

Таблица 1
Хроматографическое разделение продуктов реакции на колонке с силикагелем

Фракция	Элюент	Выход на навеску (%)	Продукт	ЯМР ³¹ P δ м.д. (хлороформ)	ТСХ, элюент**, R _f
1	хлороформ	3,0	ClCH ₂ C(O) – OMe[n-]		1,00
2	хлороформ – эфир	а) 48	а) (S _p -III)	а) 37,28	а) 0,65
3	эфир	б) 12	б) (IV)	б) 41,84	б) 0,55
		а) 1,2	а) (S _p -III)	а) 37,21	а) 0,65
		б) 0,7	б) (R _p -III)	б) 36,60	б) 0,55
4	этанол	в) 5,8	в) (IV)	в) 41,77	в) 0,45
		2,0	(V)	24,1*	0 – 0,1

* Спектр снят в этаноле.

** Хлороформ – этилацетат (1:1).

поляриметре “Perkin-Elmer 341” с натриевой лампой (δ = 589 нм). Синтез исходного (1R,2S,5R)-ментилового эфира хлоруксусной кислоты проводился по методу [5].

(1R,2R,5R)-Ментильный эфир 2-хлорэтоксид-4'-диметиламинофенилфосфорилуксусной кислоты (III).

К раствору 27,25 г (0,122 М) 4-диметиламинофенилди-хлорфосфина в 40 мл сухого бензола приливают раствор 34,6 г (0,15 М) (1R,2S,5R)-ментилового эфира хлоруксусной кислоты в 40 мл сухого бензола. Затем при перемешивании и охлаждении до 0 – 5 °С в токе сухого азота в течение 1 ч вводят 21 г (0,48 М) окиси этилена с такой скоростью, чтобы температура реакционной смеси не поднималась выше 10 °С. После завершения реакции смесь перемешивают 0,5 ч при 10 °С, доводят до комнатной температуры, перемешивают 1 ч. Избыток окиси этилена в течение 1 ч отдувают сухим азотом при атмосферном давлении и затем 0,5 ч в вакууме при 10 мм. рт. ст. Вторую стадию процесса проводят при медленном нагревании реакционной смеси до 110 – 140 °С с одновременной отгонкой бензола в течение 2 ч. При хранении реакционная смесь частично закристаллизовалась. Кристаллы отфильтровывают, промывают эфиром и пересаждают гексаном из раствора хлороформа. По-

лучают 21 г (38,9 %) (S_p-III) диастереомера. Т.пл. 123 – 124 °С, [α]_D²⁰ – 34,7 ° (с 1, MeOH). C₂₂H₃₅ClNO₄P. Масс-спектр, m/z: 443.3 [M].

Сигналы протонов ментильного фрагмента (Me_n, помечены штрихами) отнесены по данным литературы [6 – 8]. Отнесение линий в спектре ¹³C проведено на основании данных 2D HSQC спектра [9, 10].

Спектр ЯМР ¹H (600 МГц, CDCl₃, δ м.д., J Гц): 7,68 дд (H^{3,5}, 2H, ³J_{HR} 12,1, ³J_{HH} 8,8); 6,0 д, (H^{2,6}, 2H, ³J_{HH} 7,7); 4,24 м, 4,08 м (POCH₂, 2H, ³J_{HR} 12); 3,66 м (CH₂Cl, 2H); 3,12 д (PCH₂, 2H, ³J_{HR} 18,3); 3,04 с ((CH₃)₂N, 6H); 4,61 тд (H¹, 1H, ³J_{HH} 11, 4,4); 1,80 м (H⁶, H⁷, 2H); 1,62 м (H³, H⁴, 2H); 1,39 уш. (H⁵, 1H); 1,30 тт (H², 1H, ³J_{HH} 11,7, 2,9); 0,97 м (H³, 1H); 0,83 м (H⁶, H⁷, CH₃⁸, CH₃¹⁰, 8H); 0,68 д (CH₃⁹, 3H, ³J_{HH} 7,0).

Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 165,37 д (C³, ²J_{PC} 4,8); 152,01 уш. (C⁷); 133,50 (C⁵, ²J_{PC} 12,0); 116,49 д (C⁴, J_{PC} 150,2); 112,84 д (C⁶, ³J_{PC} 13,8); 64,11 д (POCH₂, ²J_{PC} 5,4); 42,64 д (CH₂Cl, ³J_{PC} 6,6); 40,90 с ((CH₃)₂N); 38,94 д (PCH₂, J_{PC} 90,7); 75,54 (C¹); 46,65 (C²); 40,49 (C⁶); 34,07 (C⁴); 31,28 (C⁵); 25,74 (C⁷); 23,09 (C³); 21,87 (CH₃¹⁰); 20,83 (CH₃⁸); 16,01 (CH₃⁹).

Спектр ЯМР ³¹P (CHCl₃) δ 37,21 м.д.

ИК спектр (вазелиновое масло, см⁻¹): 1202 ср. [δ C(O)O], 1231 с. (ν P=O), 1525 ср., 1606 с. (ν C=C, Ar), 1720 с. (ν C=O).

Фильтрат после отделения кристаллов (S_p-III) по данным спектра ЯМР ³¹P содержал: диастереомер (S_p-III) — 71 %, диастереомер (R_p-III) — 7 %, 2-хлорэтиловый эфир 4'-диметиламинофенил-2-хлорэтилфосфиновой кислоты (IV) — 19 %, 4-диметиламинофенилфосфонистую кислоту (V) — 3 %. Фильтрат растворяют в хлороформе (1:3) и пропускают через колонку с силикагелем. Результаты хроматографирования представлены в табл. 1.

Из фракции 4 выделены кристаллы 4-диметиламинофенилфосфонистой кислоты (V). Т.пл. 162 – 163 °С. C₈H₁₂NO₂P.

Спектр ЯМР ³¹P (этанол) δ 24,1 м.д., без развязки от протонов — дублет δ 25,89 м.д. и 22,36 м.д.

2-Хлорэтиловый эфир 4'-диметиламинофенил-2-хлорэтилфосфиновой кислоты (IV).

К раствору 2,7 г (0,012 М) 4-диметиламинофенилди-хлорфосфина (I) в 4 мл сухого бензола в токе сухого азота при

Таблица 2

Психотропная активность КАПАМ (S_p-III)

Соединение	Латентный период захода в темный отсек камеры на модели УРПИ		Двигательная активность (число пересеченных линий)		Исследовательская активность (число заглядываний)		Время удержания в тесте “вращающийся стержень”		Время неподвижности “зависания” в тесте “поведенческое отчаяние”	
	M ± m (с)	%	M ± m (с)	%	M ± m (с)	%	M ± m (с)	%	M ± m (с)	%
Контроль	180,0 ± 0	100	4,8 ± 1,0	100	12,0 ± 2,2	100	21,7 ± 5,2	100	262,8 ± 16,6	100
КАПАМ (S _p -III) (500 мг/кг)	174,5 ± 9,2	96,9	0,7 ± 0,4*	14,5	0,8 ± 0,3*	6,6	4,3 ± 0,9*	19,8*	243,2 ± 24,2	92,5
Контроль	35,9 ± 10,9	100							245,2 ± 18,6	100
КАПАХ (100 мг/кг)	84,5 ± 17,7*	233*							239,8 ± 13,3	97,9
Контроль	180,0 ± 0	100	6,8 ± 2,5	100	13,8 ± 1,6	100	25,3 ± 9,3	100	262,8 ± 16,6	100
КАПАМ (S _p -III) (50 мг/кг)	116,0 ± 38,0	64	4,6 ± 1,8	67,6	5,0 ± 1,8*	36,2*	35,0 ± 5,7	138,3	256,2 ± 15,8	97,4
Контроль	35,9 ± 10,9	100	6,7 ± 1,2	100	12,8 ± 1,1	100	23,8 ± 4,6	100	146,8 ± 15,6	100
КАПАХ (10 мг/кг)	98,9 ± 28,0*	280*	6,6 ± 2,1	98,5	13,3 ± 2,2	103,9	22,6 ± 3,7	94,9	101,3 ± 14,4*	69*
Контроль	163,0 ± 7,0	100	5,8 ± 2,3	100	10,0 ± 1,0	100	13,0 ± 2,3	100	284,0 ± 25,8	100
КАПАМ (S _p -III) (5 мг/кг)	31,6 ± 13,1*	19,3*	3,0 ± 1,0	51,7	3,0 ± 1,4*	30*	15,0 ± 6,2	115	271,0 ± 18,0	95,4
Контроль	77,3 ± 21,2	100							146,8 ± 15,6	100
КАПАХ (1 мг/кг)	138,3 ± 20,8*	179*							97,6 ± 13,3*	66,4*

* Разница достоверна относительно контроля при p < 0,05.

0 °С прибавляют 2 г (0,048 М) окиси этилена, выдерживают реакционную смесь при 0 °С в течение 0,5 ч, доводят до комнатной температуры и перемешивают еще 1 ч. Освобождаются от избытка окиси этилена продуванием сухим азотом при атмосферном давлении и затем в вакууме при 10 мм рт. ст. Реакционную смесь медленно нагревают в течение 1 ч до 80–100 °С с одновременной отгонкой бензола и хроматографируют на колонке с силикагелем. Получают фракцию (ТСХ: элюент хлороформ – этилацетат 1:1) R_f 0,45. После удаления растворителя — густое масло. ЯМР ^{31}P (хлороформ) δ 41,87 м.д. $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{P}$.

Экспериментальная фармакологическая часть

В работе использовано 270 белых мышей массой 17–21 г. Острую токсичность КАПАМ (диастереомера S_p -III) при внутрибрюшинном введении определяли на мышак-самцах.

Для предварительной оценки нейротропной активности КАПАМ применяли метод ориентировочной реакции [11].

Для оценки влияния КАПАМ на процессы памяти и обучения использовали методику условной реакции пассивного избегания (УРПИ). Выработку последней осуществляли в камере, состоящей из двух отсеков — светлого и темного, снабженного электродным полом. Об эффективности соединения судили по изменению латентного периода захода в темный отсек камеры.

Изучение антидепрессивной активности проводили на модели “поведенческое отчаяние” по длительности периода неподвижности (“зависания”) у мышей [12].

Для выявления миорелаксантного действия использовали метод “вращающегося стержня”.

КАПАМ вводили в дозах, составляющих 1/10, 1/100 и 1/1000 от максимально высокой дозы, которую возможно было ввести внутрибрюшинно за 40 мин до тестирования. В качестве растворителя использовали 20 % диметилсульфоксид (ДМСО).

В качестве препарата сравнения использован ближайший аналог соединения S_p -III препарат КАПАХ.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием t -критерия Стьюдента.

При определении острой токсичности КАПАМ не удалось определить величину ЛД₅₀, поэтому это соединение вводили в максимально высокой дозе, которая составила 5000 мг/кг. В этой дозе гибели животных не отмечалось.

КАПАМ в дозах, составляющих 1/100 и 1/1000 от максимально вводимой дозы (50 и 5 мг/кг), в отличие от КАПАХ, не проявляет способности улучшать процессы памяти

и обучения на модели УРПИ, что может свидетельствовать об отсутствии у него мнотропного действия (табл. 2).

В экспериментах по изучению ориентировочно-двигательной реакции КАПАМ во всех исследуемых дозах оказывает нейротропное действие депримирующего типа, достоверно угнетая ориентировочную реакцию, однако в малых дозах (50 и 5 мг/кг) не оказывает влияния на двигательную активность.

В дозе 500, но не 50 и 5 мг/кг, КАПАМ проявляет выраженное миорелаксантное действие, сокращая время удержания на вращающемся стержне до 19,8 % относительно контроля. Препарат сравнения КАПАХ не проявляет подобного действия ни в одной из исследуемых доз.

КАПАМ лишен антидепрессивной активности.

Таким образом, КАПАМ, в отличие от КАПАХ (обладающего ноотропной и антидепрессивной активностью), характеризуется угнетающим влиянием на центральную нервную систему, а в дозе 500 мг/кг оказывает выраженное миорелаксантное действие.

Работа выполнена при поддержке российского фонда фундаментальных исследований (грант № 03-03-33084).

ЛИТЕРАТУРА

1. Р. И. Тарасова, В. В. Москва, *Журн. общ. химии*, **67**(9), 1483 – 1496 (1997).
2. I. Semina, E. Shilovskaya, R. Tarasova, et al., *Phosphorus, Sulfur et Silicon*, 144 – 146, 753 – 756 (1999).
3. И. И. Семина, Е. В. Шиловская, Р. И. Тарасова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **36**(4), 3 – 6 (2002).
4. Р. И. Тарасова, И. И. Семина, В. А. Павлов, В. В. Москва, Патент РФ № 2141961 (1999), *Бюл. изобрет.*, № 33 (2002).
5. Л. А. Чугаев, *Журанл физико-химического общества*, **34**, 602 – 622 (1902).
6. Sh. K. Latypov, J. M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.*, **60**, 504 – 515 (1995).
7. J. M. Seco, Sh. K. Latypov, E. Quinoa, R. Riguera, *Tetrahedron*, **25**, 8541 – 8564 (1997).
8. Sh. K. Latypov, A. V. Aganov, S. Tahara, Y. Fukushi, *Tetrahedron*, **55**, 7305 – 7318 (1999).
9. A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, *J. Magn. Reson.*, **55**, 301 – 315 (1983).
10. A. Bax and S. Subramanian, *J. Magn. Reson.*, **67**, 565 – 569 (1986).
11. G. R. Boiseier, P. Simon, G. N. Lwoff, et al., *Therape*, **19**(3), 571 – 573 (1964).
12. R. D. Porsolt, A. Bertin, M. Talfre, *Arch. int. Pharmacodyn. et Ther.*, **229**(2), 327 – 336 (1977).

Поступила 01.02.05

STERESELECTIVE SYNTHESIS AND NEUROTROPIC ACTIVITY OF PHOSPHORYLACETIC ACID DERIVATIVE

R. I. Tarasova¹, O. V. Voskresenskaya¹, R. M. Eliseenkova³, I. I. Semina², E. V. Shilovskaya², Sh. K. Latypov³, A. A. Balandina³, and A. A. Bredikhin³

¹ Kazan State Technological University, Kazan, Tatarstan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Tatarstan, Russia

³ Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Tatarstan, Russia

Stereoselective synthesis of optically active methyl ester of 2-chloroethoxy-4'-dimethylaminophenylphosphorylacetic acid (CAPAM) is described. The structure of CAPAM is confirmed by elemental analysis, mass-spectra, IR and NMR (^{31}P , ^1H , ^{13}C) spectroscopy. CAPAM was tested for neuropharmacological effects. The substance showed neurotropic activity of deprivation type and myorelaxant action.