

В. Е. Катаев¹, О. И. Милицина¹, И. Ю. Стробыкина¹, Г. И. Ковыляева¹,
Р. З. Мусин¹, О. В. Федорова², Г. Л. Русинов², М. Н. Зуева³, Г. Г. Мордовской³,
А. Г. Толстиков⁴

СИНТЕЗ И ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ДИЭФИРОВ НА ОСНОВЕ ИЗОСТЕВИОЛА И ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

¹ Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова, Казань; e-mail kataev@iopc.knc.ru;

² Институт органического синтеза УрО РАН, Екатеринбург;

³ Свердловское областное НПО "Фтизиопульмонология", Екатеринбург;

⁴ Институт технической химии УрО РАН, Пермь

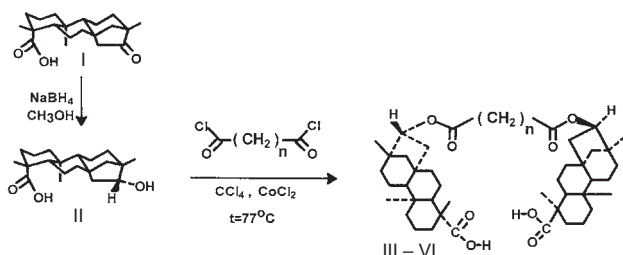
Осуществлен синтез диэфиров на основе изостевиола и дикарбоновых кислот и исследована их противотуберкулезная активность. Показано, что изостевиол и его производные обладают заметной туберкулостатической активностью в опытах *in vitro*, которая зависит от длины полиметиленового спейсера. Сделано предположение о существовании некоторых особенностей механизма противотуберкулезного действия производных изостевиола.

Природные соединения, выделяемые из высших растений, представляют собой перспективную основу для дизайна новых биологически активных соединений. В течение ряда лет нами проводится работа по функционализации дитерпеноида изостевиола [1 – 3], однако его биологическую активность до сих пор не изучали.

Известно, что изостевиол (*энт*-16-оксобейеран-19-овая кислота, I), наряду с росторегулирующими свойствами [4], ингибирует активность глюкоза-6-фосфатазы, снижая, таким образом, выделение глюкозы из печени [5], подавляет транспорт моносахаридов, например D-глюкозы и D-фруктозы через мембрану клетки, а также препятствует поглощению кислорода [6, 7].

Мы предположили, что изостевиол и его производные могут вмешиваться в процессы формирования оболочки микобактерии туберкулеза [8], поскольку изостевиол ингибирует процессы окислительного фосфорилирования [9, 10]. Кроме того, особый интерес могут представить производные изостевиола, обладающие структурой, облегчающей им прохождение через многослойную оболочку микобактерии [11]. Поэтому в настоящей работе мы синтезировали бис(изостевиоил) алканоны — аналоги подандов, описанных в [12] и обладающих значительной антимикобактериальной активностью.

I был получен кислотным гидролизом гликозидов, содержащихся в растении *Stevia rebaudiana Bertoni* [13]. По аналогии с [14], взаимодействием I с боргидридом натрия с выходом 80 % была получена оксикислота (II). Реакция идет стереоспецифично с образованием 16(R)-диастереомера [14].



$n = 1$ (III), $n = 4$ (IV), $n = 6$ (V), $n = 8$ (VI)

Функционализацию I осуществили, введя в молекулу еще один *энт*-бейерановый каркас, присоединив его к первому по атому С16 посредством диэфирного полиметиленового спейсера. Диэфиры изостевиола (III – VI) были синте-

зированы взаимодействием соединения (II) с хлорангидридами двухосновных карбоновых кислот с выходами 30 – 35 % (после хроматографирования на силикагеле).

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры записаны на спектрофотометре UR-20 в интервале 400 – 3600 см^{-1} и на Фурье-спектрометре Vector 22 фирмы Bruker в интервале 400 – 4000 см^{-1} . Кристаллические образцы исследовались в виде эмульсии в вазелиновом масле и в таблетках КВг. Спектры ЯМР ^1H получены на приборах Avance 600 и Bruker MSL400. Масс-спектры получены на приборе MX-1310 при ионизирующем напряжении 60 эВ, токе коллектора электронов 30 мкА, с использованием системы прямого ввода вещества в источник ионов при температуре 120 °С. Прогрев ампулы-испарителя осуществлялся в интервале 120 – 250 °С. Точные значения масс ионов определялись методом совмещения по реперным пикам перфторкеросина. Масс-спектры матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) получены на время-пролетном масс-спектрометре Duamo MALDI TOF фирмы Finnigan, США. Для лазерной десорбции применялся импульсный УФ-лазер с длиной волны 337 нм. Матрицей служила дигидроксибензойная кислота (ДНВ). Образец готовили методом "высушенной капли": смесь раствора матрицы в этаноле (1 масс. %) и раствора анализируемого вещества в метаноле (0,1 масс. %) наносилась на подложку и высушивалась при температуре 40° С. Колоночная хроматография проводилась на силикагеле марки Chemapol. Реакционные смеси анализировали методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254.

Общий метод синтеза диэфиров на основе изостевиола и дикарбоновых кислот. К раствору 1,2 ммоль оксикислоты (II) в абсолютном четыреххлористом углероде прикапывали раствор 0,6 ммоль хлорангидрида двухосновной карбоновой кислоты в том же растворителе. Добавляли 0,6 ммоль CoCl_2 . Реакционную смесь кипятили 15 ч. За ходом реакции следили по ТСХ. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле (петролейный эфир – бензол).

Бис[4а-карбокси-*энт*-19-нор-бейеран-16(R)-ил]малонат (III). Выход 30 %. Т. пл. 296 – 298 °С, $[\alpha]_D^{20} - 56^\circ$ (с 0,39, C_6H_6). ИК-спектр, ν , см^{-1} : 1222, 1264, 1302, 1725 (О-С-О), 1693 (СООН). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д. (J, Гц): 0,70 с (3H, 20- H_3); 0,90 с (3H, 17- H_3); 1,20 с (3H, 18- H_3); 2,06 д (1H, 3- H_{eq} , J 13,6); 3,36 с (2H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$); 4,72 дд (1H, 16- H , J

10,2, 5,1). Масс-спектр, $[M]^+$: $m/z_{\text{эксп}}$ 708,4535, $m/z_{\text{расч}}$ 708,4600. $C_{43}H_{64}O_8$.

Бис[4а-карбоксит-19-нор-бейеран-16(R)-ил]адипинат (IV). Выход 24 %, т. пл. 133 – 138 °С, $[\alpha]_D^{20} - 88^\circ$ (с 0,234, C_6H_6). ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 1181, 1255, 1734 (O–C–O), 1693 (COOH). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м. д. (J, Гц): 0,68 с (3H, 20- H_3); 0,90 с (3H, 17- H_3); 1,20 с (3H, 18- H_3); 2,08 д (1H, 3- H_{eq} , J 12,6); 2,36 м (2H, O=C– CH_2); 4,56 дд (1H, 16-Н, J 10,5, 3,1). $[M + Na]^+_{\text{эксп}}$ 774 (MALDI-TOF). $[M + Na]^+_{\text{расч}}$ 774,06. $C_{46}H_{70}O_8$.

Бис[4а-карбоксит-19-нор-бейеран-16(R)-ил]суберикат (V). Выход 35 %. Т. пл. 108 – 112 °С, $[\alpha]_D^{20} - 109^\circ$ (с 0,14, C_6H_6). ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 1181, 1255, 1734 (O–C–O), 1693 (COOH). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м. д. (J, Гц): 0,71 с (3H, 20- H_3); 0,91 с (3H, 17- H_3); 1,20 с (3H, 18- H_3); 2,11 д (1H, 3- H_{eq} , J 13,1); 2,34 м (2H, O=C– CH_2); 4,57 дд (1H, 16-Н, J 10,5, 3,1). $[M + Na]^+_{\text{эксп}}$ 802 (MALDI-TOF). $[M + Na]^+_{\text{расч}}$ 802,11. $C_{48}H_{74}O_8$.

Бис[4а-карбоксит-19-нор-бейеран-16(R)-ил]себацциат (VI). Выход 35 %, т. пл. 105 – 110 °С, $[\alpha]_D^{20} - 99^\circ$ (с 0,17, C_6H_6). ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 1181, 1255, 1733 (O–C–O), 1694 (COOH). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м. д. (J, Гц): 0,76 с (3H, 20- H_3); 0,91 с (3H, 17- H_3); 1,20 с (3H, 18- H_3); 2,13 д (1H, 3- H_{eq} , J 13,1); 2,33 м (2H, O=C– CH_2); 4,62 дд (1H, 16-Н, J 10,2, 4,0). $[M + Na]^+_{\text{эксп}}$ 830 (MALDI-TOF). $[M + Na]^+_{\text{расч}}$ 830,17. $C_{50}H_{78}O_8$.

Противотуберкулезная активность синтезированных соединений в отношении *Mycobacterium tuberculosis* (H_37Rv) *in vitro* представлена в таблице. Для сравнения здесь приведена также активность самого изостевиола и пиразинамида [15].

Экспериментальная биологическая часть

Изучение туберкулостатической активности проводили методом серийных разведений на плотной питательной среде “Новая”. В пробирки с засеянным тест-микробом (штамм H_37Rv) закапывали по 0,3 мл каждого разведения соединений и инкубировали при 37 °С в течение 10 – 12 суток [16]. Установлено, что производные изостевиола, не имеющие гетероциклических и оксигенированных фармакофоров, тем не менее обладают умеренной туберкулостатической активностью, которая зависит от длины полиметиленового спейсера (табл. 2). Диэфир на основе себацционовой кислоты (VI) не уступает по активности пиразинамиду [15] и некоторым подандам, содержащим гетероциклические фрагменты [17].

Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего поиска новых противотуберкулезных препаратов в ряду производных изостевиола.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 04-03-32133, 04-03-32063, 04-03-96011) и Фонда МНТЦ (проект № 708).

Туберкулостатическая активность в опытах *in vitro* для изостевиола (I) и соединений III – VI

Соединение	Минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл
I	50
III	25
IV	50
V	50
VI	12,5
Пиразинамид	12,5

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Альфонсов, О. В. Андреева, Г. И. Бакалейник и др., *Ж. общей химии*, **73**(7), 1186 – 1197 (2003).
2. V. A. Alfonsov, O. V. Andreeva, G. A. Bakaleynik, et al., *Mendeleev Comm.*, **13**(5), 234 – 235 (2003).
3. В. А. Альфонсов, В. Е. Катаев, И. Ю. Стробыкина и др., *Ж. общей химии*, **75**(2), 276 – 281 (2005).
4. J. Hershenhorn, M. Zohar, B. Crammer, et al., *Plant Growth Regul.*, **23**, 173 – 178 (1997).
5. E. Ishii and A. Bracht, *J. Med. Biol. Res.*, **20**(6), 837 – 843 (1987).
6. E. Ishii, A. Schwab, and A. Bracht, *Pharmacol. Biochem.*, **36**(9), 1417 – 1433 (1987).
7. N. S. Yamamoto, A. M. Kelmer Bracht, E. L. Ischii, et al., *Experientia*, **41**(1), 55 – 57 (1985).
8. A. M. Chakrabarty, *Mol. Microbiol.*, **28**(5), 875 – 882 (1998).
9. A. Kelmer Bracht, M. Alvarez, and A. Bracht, *Pharmacol. Biochem.*, **34**(6), 873 – 882 (1985).
10. S. Chen, T. Cheng, and P. Chan, *Int J. Cardiol.*, **97**(2), 1 – 75 (2004).
11. О. В. Федорова, Г. Л. Русинов, Г. Г. Мордовской и др., *Хим.-фарм. журн.*, **31**(7), 21 – 23 (1997).
12. В. А. Потемкин, М. А. Гришина, О. В. Федорова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **37**(9), 17 – 21 (2003).
13. В. А. Альфонсов, Г. А. Бакалейник, А. Т. Губайдуллин и др., *Ж. общей химии*, **68**(11), 1813 – 1821 (1998).
14. В. А. Альфонсов, Г. А. Бакалейник, А. Т. Губайдуллин и др., *Ж. общей химии*, **70**(6), 1018 – 1025 (2000).
15. M. H. Synamon, R. J. Speirs, and J. T. Welch, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**(2), 462 – 463 (1998).
16. В. Н. Василев, *Микобактериозы и микозы легких*, Изд-во “Медицина и физкультура”, София (1971), сс. 377 – 379.
17. И. Г. Овчинникова, О. В. Федорова, Г. Л. Русинов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **37**(11), 17 – 19 (2003).

Поступила 23.08.05

SYNTHESIS AND ANTI-TUBERCULOUS ACTIVITY OF DIESTERS BASED ON ISOSTEVIOL AND DICARBOXYLIC ACIDS

V. E. Kataev¹, O. I. Militsina¹, I. Yu. Strobkykina¹, G. I. Kovylyayeva¹, R. Z. Musin¹, O. V. Fedorova², G. L. Rusinov², M. N. Zueva², G. G. Mordovskoi³, and A. G. Tolstikov⁴

¹ Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Tatarstan, 420088 Russia

² Institute of Organic Synthesis, Ural Division of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620219 Russia

³ Phthisiopulmonology Research Institute, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russia

⁴ Institute of Technical Chemistry, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

e-mail kataev@iopkc.knc.ru;

Dieters based on isosteviol and dicarboxylic acids were synthesized and tested for antituberculous activity. Isosteviol and some of its derivatives exhibit appreciable tuberculostatic properties *in vitro*, the activity being dependent on the length of spacer connecting two ent-beyeran frameworks. Peculiarities of the antituberculous action of isosteviol derivatives are discussed.