

Е. Д. Матвеева, Т. А. Подругина, И. Г. Морозкин,
С. Е. Ткаченко^а, Н. С. Зефирова

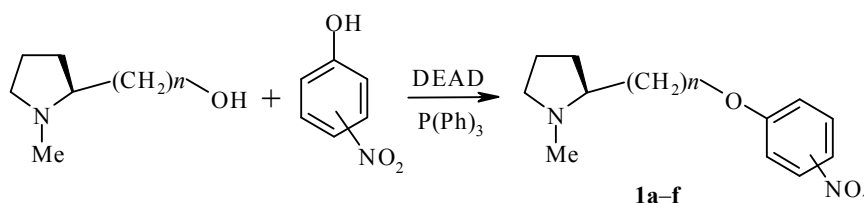
СИНТЕЗ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ИЗОСТЕРНЫХ АНАЛОГОВ НИКОТИНА*

Разработан метод синтеза изостерных аналогов никотина – простых эфиров *S*(-)-1-2-пирролидинметанола и *S*(-)-1-2-пирролидинэтаноло и нитрофенолов на основе реакции Мицунобу. Приведены результаты тестирования синтезированных соединений в качестве блокаторов кальциевых каналов.

Ключевые слова: эфиры пролинола и гомопронинола, нейропротекторы, блокаторы кальциевых каналов, реакция Мицунобу.

Простые эфиры пиридинового ряда, включающие в качестве второго фрагмента производные пирролидина, проявляют агонистическую активность в отношении ацетилхолиновых рецепторов, в некоторых случаях превышающую активность (*S*)-никотина [1]. В настоящей работе предпринят направленный поиск соединений в ряду простых эфиров биоизостерных аналогов никотина, способных не только проявлять собственно агонистические свойства (сродство к никотиновому рецептору), но и обладать выраженной нейропротекторной активностью. Нейропротекторные свойства веществ представляются как специфическая блокада нейротоксичного глутамат-индуцированного входа ионов кальция.

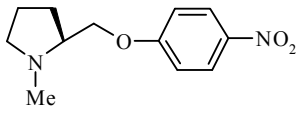
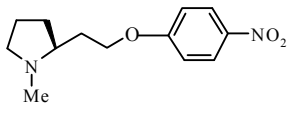
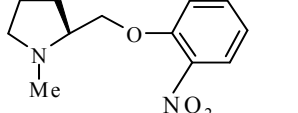
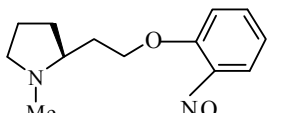
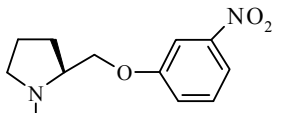
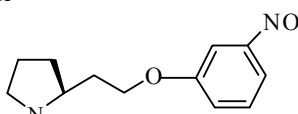
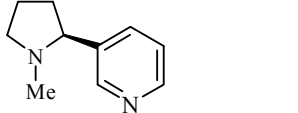
Биоизостерными аналогами оксипиридинов могут выступать нитрофенолы, которые и были использованы для синтеза эфиров пролинолов по реакции Мицунобу [1–3].



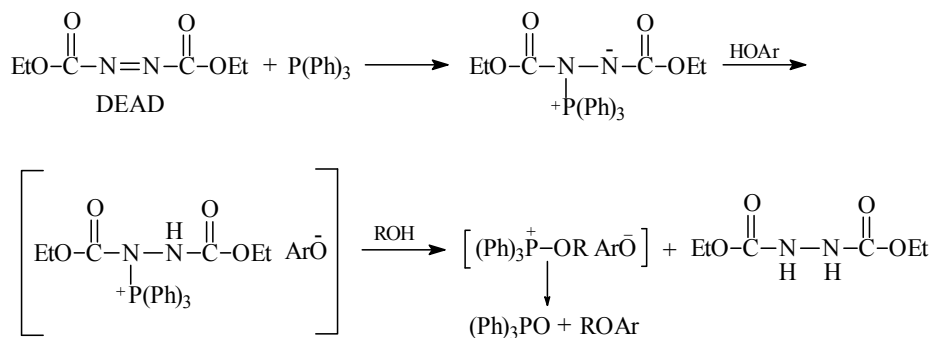
Реакция *o*-, *m*-, *p*-нитрофенолов с *N*-метилпролинолом и *N*-метилгомопролинолом в присутствии трифенилфосфина и диэтилазодикарбоксилата (DEAD) протекает в ТГФ при комнатной температуре в течение 12 ч (контроль ТСХ). Выходы простых эфиров, рассчитанные на количество прореагировавшего нитрофенола, приведены в таблице.

* Посвящается памяти А. Н. Коста в связи с 85-летием со дня рождения.

Выходы, спектры ЯМР ¹H и активность соединений 2

Вещество	Выход эфира, %	Активность гидрохлоридов, %	Спектры ЯМР ¹ H гидрохлоридов, δ, м. д.
1a 	89	2a 65	7.96 (2H, д, Н аром.); 6.86 (2H, д, Н аром.); 4.28 (1H, д. д, CHO); 4.11 (1H, д. д CHO); 3.74–3.58 (1H, м, CH(CH ₂ O)); 3.58–3.42 (1H, м, CH(NCH ₃)); 3.08–2.90 (1H, м CH(NCH ₃)); 2.78 (3H, с NCH ₃); 2.34–1.71 (4H, м, CH ₂ CH ₂)
1b 	90	2b 73	8.15 (2H, д, Н аром.); 7.03 (2H, д, Н аром.); 4.24 (2H, д. д, CH ₂ O); 3.79–3.48 (2H, CH ₂ , м, (NCH ₃)); 3.32–3.02 (1H, м, CH(NCH ₃)); 2.89 (3H, с, NCH ₃); 2.77–2.29 (2H, м, CH ₂ (CH ₂ O)); 2.25–1.69 (4H, м, CH ₂ CH ₂)
1c 	98	2c 74	7.89 (1H, д. д., Н аром.); 7.65–7.43 (1H, м, Н аром.); 7.22 (1H, д, Н аром.); 7.08 (1H, т, Н аром) 4.52 (1H, д. д, CHO); 4.24 (1H, д. д, CHO); 3.87–3.73 (1H, м, CH(CH ₂ O)); 3.70–3.56 (1H, м, CH(NCH ₃)); 3.22–3.03 (1H, м, CH(NCH ₃)); 2.97 (3H, с, NCH ₃); 2.40–1.88 (4H, м, CH ₂ CH ₂)
1d 	95	2d 77	7.86 (1H д. д, Н аром); 7.66–7.44 (1H, м, Н аром.); 7.17 (1H, д, Н аром.); 7.04 (1H, т, Н аром); 4.18 (2H, д. д, CH ₂ O); 3.78–3.42 (2H, м, CH ₂ (NCH ₃)); 3.24–3.06 (1H, м, CH(NCH ₃)); 2.92 (3H, с, NCH ₃); 2.50–2.22 (2H, м, CH ₂ (CH ₂ O)); 2.20–1.71 (4H, м, CH ₂ CH ₂)
1e 	61	2e 80	7.83–7.60 (м, Н аром.); 7.44–7.12 (м, Н аром.); 4.42 (1H, д. д, CHO); 4.24 (1H, д. д, CHO); 3.98–3.77 (1H, м, CH(CH ₂ O)); 3.77–3.56 (1H, м, CH(NCH ₃)); 3.31–3.12 (1H, м, CH(NCH ₃)); 3.02 (3H, с, NCH ₃); 2.5–1.90 (4H, м, CH ₂ CH ₂)
1f 	53	2f 79	7.81–7.62 (м, Н аром.); 7.44–7.10 (м, Н аром.); 4.44 (2H, м, CH ₂ O); 3.95–3.67 (2H, м, CH ₂ (NCH ₃)), 3.52–3.24 (1H, м, CH(NCH ₃)); 3.00 (3H, с, NCH ₃); 2.94–2.50 (2H, м, CH ₂ (CH ₂ O)); 2.48–1.90 (4H, м, CH ₂ CH ₂)
	—	77	—

Данные по выходам соответствующих простых эфиров коррелируются с повышением pK_a кислотной компоненты, но наибольшие выходы продуктов реакции **1a–f** достигаются для *o*- и *n*-нитрофенолов. Поскольку механизм реакции предполагает кислотно-основное взаимодействие диэтилазодикарбоксилатного бетаина с кислотной компонентой (нитрофенол), то величина pK_a 7 [4, 5] кислотной компоненты играет существенную роль для успешного протекания процесса.



Это согласуется с литературными данными по синтезу простых эфиров 3-оксипиридина (pK_a 8.72 [4]), выход которых в реакции Мицунобу не превышает 15% [1, 2].

Увеличение длины углеродной цепи на одну метиленовую группу при переходе от пролинола к гомопрлинолу существенным образом не сказывается на протекании реакции и выходах соответствующих простых эфиров.

Для проведения биологических испытаний эфиры **1a–f** переводили в водорастворимую форму – гидрохлориды. Строение и состав полученных гидрохлоридов **2a–f** подтверждены данными спектров ЯМР ^1H и элементным анализом.

Все полученные гидрохлориды протестированы на физиологическую активность в качестве блокаторов глутаматных рецепторов. Результаты представлены в таблице. Следует отметить, что помимо серии изучаемых нами простых эфиров также впервые был проверен на физиологическую активность в качестве блокатора глутаматных рецепторов (*S*)-никотин. Как видно из таблицы, наиболее удачным оказалось соединение **2a**, поскольку оно обладает наивысшей в данной серии физиологической активностью, которая превосходит активность (*S*)-никотина.

Таким образом, в рамках исследованной серии соединений было показано, что биоизостерные аналоги никотина, включающие пирролидиновый фрагмент, обладают более высокими нейропротекторными свойствами по сравнению с соединением-лидером – (*S*)-никотином.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H зарегистрированы на приборе Varian с рабочей частотой 200 Гц в D_2O . За ходом реакции следили с помощью ТСХ на пластинках Silufol. Хроматографическое разделение проводили на колонках с силикагелем Merck 60, 70-230 меш ASTM. Тесты на специфическую блокаду нейротоксического глутаматиндуцированного входа ионов Ca^{2+} проведены в ИФАВ РАН.

ТГФ последовательно перегоняли над щелочью, натрием и алюмогидридом лития, т. кип. 65 °С. Диэтиловый эфир последовательно перегоняли над щелочью, натрием и алюмогидридом лития, т. кип. 34 °С. Хлороформ встряхивали с концентрированной серной кислотой, промывали водой, сушили CaCl₂ и перегоняли, т. кип. 61 °С. Трифенилфосфин дважды перекристаллизовывали из изопропилового спирта, сушили в вакууме, т. пл. 79–80 °С. Этилхлорформиат фирмы Aldrich, т. кип. 93 °С, $n_D^{20} = 1.3950$.

(S)-(-)-Метил-2-пирролидинметанол фирмы Aldrich, т. кип. 67–69 °С/12 мм рт. ст., $n_D^{20} = 1.4690$, $[\alpha]^{19} -49.5^\circ$ ($c = 5$, MeOH).

(S)-(-)-Метил-2-пирролидинэтанол фирмы Aldrich, т. кип. 110–112 °С/14 мм рт. ст., $n_D^{20} = 1.4713$. 3-Гидроксипиридин фирмы Aldrich, т. пл. 126–129 °С, т. кип. 151–153 °С.

Метод оценки кальций-блокаторных свойств соединений. Взаимодействие соединений с системой глутамат-зависимого Ca²⁺-захвата исследовалось на P2-фракции синапсом, выделенных из мозга новорожденных (8–11 дн) крыс по описанной методике [6]. Синапсомы помещают в инкубационный буфер А (132 ммоль/л NaCl, 51 ммоль/л KCl, 5 ммоль/л HEPES) и выдерживают при температуре 0 °С в течение всего эксперимента. Аликвоты синапсом (50 мкл) помещают в среду А, содержащую исследуемые вещества и препарат ⁴⁵Ca²⁺. Захват Ca²⁺ стимулируется введением в смесь 10 мл раствора 20 мкл глутамата. После инкубации 5 мин при 30 °С процесс прерывают путем фильтрации через GFV-фильтры, а препарат трижды промывают холодной уксусной кислотой, после чего на сцинтилляционном счетчике SL-4000 проводят детектирование радиоактивной метки. Специфический захват Ca²⁺ измеряют по формуле:

$$K_{(42/21)} = [(Ca_4 - Ca_2)/(Ca_2 - Ca_1)] 100\%,$$

где Ca₁ – захват в контрольном эксперименте (без глутамата и тестируемого вещества); Ca₂ – захват в присутствии глутамата (только глутамат-индуцированный захват); Ca₃ – захват в присутствии тестируемого вещества (без глутамата); Ca₄ – захват в присутствии глутамата и тестируемого вещества. В отдельных случаях специфический захват кальция оценивают также по формулам:

$$K_{(43/21)} = [(Ca_4 - Ca_3)/(Ca_2 - Ca_1)] 100\% \\ \text{или } K_{(3/1)} = [(Ca_3)/(Ca_1)] 100\%.$$

Диэтилгидразодикарбоксилат. К охлажденному до 10 °С раствору 6.8 г (0.136 моль) гидразингидрата в 60 мл 96% спирта при перемешивании прибавляют по каплям 30.7 г (0.283 моль) этилхлорформиата с такой скоростью, чтобы температура не поднималась выше 20 °С. После добавления половины этилхлорформиата раствор 12.2 г Na₂CO₃ в 60 мл воды прибавляют по каплям одновременно со второй половиной этилхлорформиата при температуре ниже 20 °С. После этого соль со стенок смывают 25 мл воды и перемешивают еще 30 мин. Затем осадок отфильтровывают, промывают 100 мл воды. Сушат при 80 °С. Получают 13.4 г (56%) диэтилгидразодикарбоксилата. Т. пл. 131–132 °С.

Диэтилазодикарбоксилат. В смесь 13.4 г (76.16 ммоль) диэтилгидразодикарбоксилата, 60 мл воды и 60 мл бензола медленно, при перемешивании пропускают хлор при T ≤ 15 °С до тех пор, пока привес не составил 7 г. После этого прекращают пропускать хлор. Смесь перемешивают до образования прозрачного оранжевого бензольного слоя после остановки перемешивания. Этот слой отделяют, промывают водой и раствором Na₂CO₃ до нейтральной реакции, сушат Na₂SO₄. Упаривают растворитель, остаток перегоняют в вакууме. Получают 10.5 г (81%) диэтилазодикарбоксилата, т. кип. 107–109 °С/15 мм рт. ст., $n_D^{20} = 1.4201$.

Общая методика получения гидрохлоридов простых эфиров нитрофенолов 2a–f по реакции Мицунобу. К раствору 1.71 г (6.5 ммоль) трифенилфосфина в ТГФ прибавляют по каплям при перемешивании при –3 °С 1.02 мл (6.5 ммоль) диэтилазодикарбоксилата. К полученному прозрачному раствору прибавляют одной порцией 0.625 г (4.5 ммоль) нитрофенола. Перемешивают 10 мин. После этого прибавляют N-метилпролинол (4.34 ммоль) или гомопролинол. Смесь перемешивают в токе аргона 24 ч, растворитель упаривают, а остаток хроматографируют на колонке с силикагелем, элюируют хлороформом. После выделения трифенилфосфиноксида и диэтилгидразодикарбоксилата элюирование продолжают смесью CHCl₃ – MeOH, 10 : 1. Растворитель упаривают.

Полученное масло растворяют в минимальном объеме метанола, охлаждают и по каплям прибавляют диэтиловый эфир, насыщенный HCl. Выпавший белый осадок отфильтровывают, промывают эфиром.

4-[(1-Метил-2(S)-пирролидинил)метокси]нитробензола гидрохлорид (2a). Т. пл. 133 °С. Найдено, %: С 49.38; Н 6.25; N 9.99. C₁₂H₁₇ClN₂O₃. Вычислено, %: С 52.83; Н 6.29; N 10.28.

4-[(1-Метил-2(S)-пирролидинил)этокси]нитробензола гидрохлорид (2b). Т. пл. 93-94 °С. Найдено, %: С 52.57, Н 6.29; N 9.25. C₁₃H₁₉ClN₂O₃. Вычислено, %: С 54.45; Н 6.68; N 9.77.

2-[(1-Метил-2(S)-пирролидинил)этокси]нитробензола гидрохлорид (2d). Найдено, %: С 53.05; Н 6.54; N 9.32. C₁₃H₁₉ClN₂O₃. Вычислено, %: С 54.45; Н 6.68; N 9.77.

2-(1-Метил-2(S)-пирролидинил)метокси)нитробензола гидрохлорид (2c). Найдено, %: С 50.08; Н 6.43; N 9.95. C₁₂H₁₇ClN₂O₃. Вычислено, %: С 52.83; Н 6.29; N 10.28.

3-[(1-Метил-2(S)-пирролидинил)этокси]нитробензола гидрохлорид (2f). Найдено, %: С 51.45; Н 6.18; N 9.50. C₁₃H₁₉ClN₂O₃. Вычислено, %: С 54.45; Н 6.68; N 9.77.

3-[(1-Метил-2(S)-пирролидинил)метокси]нитробензола гидрохлорид (2e). Найдено, %: С 48.99; Н 6.30; N 10.47. C₁₂H₁₇ClN₂O₃. Вычислено, %: С 52.83; Н 6.29; N 10.28.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Интеграция» и РФФИ, грант № 99-03-33055.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. A. Melwin, Lin Nan-Horng, *J. Med. Chem.*, **39**, 817 (1996).
2. A. O. Koren, A. G. Horti, A. G. Mukhin, *J. Med. Chem.*, **41**, 3690 (1998).
3. D. L. Comins, J. G. Ianhua, *Tetrah. Lett.*, **33**, 2819 (1992).
4. A. Hampton, *J. Chem. Soc.*, N 1, 505 (1954).
5. T. Hantzsch, *Ber.*, **32**, 3071, 3066 (1899).
6. Л. С. Соляков, *Нейрохимия*, **8**, 395 (1989).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова,
Москва 119899, Россия
e-mail: edmatveeva@mail.ru

Поступило в редакцию 20.06.2000

^aИнститут физиологически
активных веществ РАН,
Черноголовка 142432, Московской обл,
Россия