

И. Иовель, Л. Голомба, Л. Звейнице, И. Шестакова, Э. Лукевиц

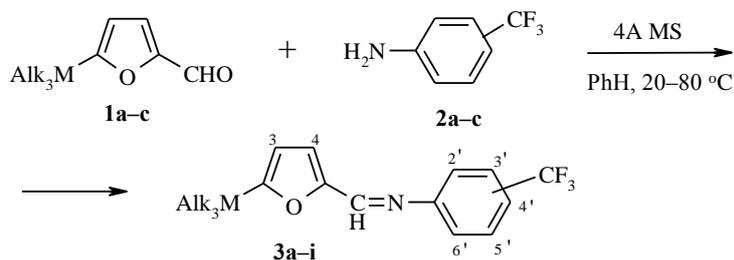
**СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
НЕКОТОРЫХ ТРИФТОРМЕТИЛПРОИЗВОДНЫХ 5-*трет*-БУТИЛ-2-
ФУРИЛМЕТИЛИДЕН-АНИЛИНОВ И ИХ СИЛИЛЬНЫХ АНАЛОГОВ**

Конденсацией 5-*трет*-бутилфурфура и его триметил- и триэтил-силильных аналогов с 2-, 3- и 4-трифторметиланилинами в присутствии молекулярных сит 4А синтезированы соответствующие альдимины. Исследована их нейротропная и противоопухолевая активность. Тест на фенаминовую двигательную активность показал, что *трет*-бутилпроизводные обладают высокой эффективностью, а также уменьшают время этанолового наркоза. Некоторые силильные производные проявляют значительную антикоразоловую активность. Для *трет*-бутилпроизводных характерна высокая цитотоксичность на клетках фибросаркомы легких человека (3-трифторметилзамещенное) и гепатомы мышей (2-трифторметилзамещенное). Большинство синтезированных соединений способствует генерации NO в клетках.

Ключевые слова: силлилпроизводные, трифторметиланилины, фурановые основания Шиффа, нейротропная активность, цитотоксичность.

Производные гетероциклических соединений, в том числе фурановых, включающие трифторметильные и силильные группы, вызывают интерес как ценные синтоны и потенциально биологически активные соединения. Целью настоящей работы является получение ряда оснований Шиффа, содержащих указанные группировки, и исследование их биологической активности. Целевые азометины синтезированы с использованием разработанного нами [1–4] эффективного метода – конденсациями гетероциклических альдегидов с аминами в присутствии молекулярных сит.

Триметил- и триэтилсиллилпроизводные фурфура **1b,c** взаимодействуют с 3- и 4-трифторметиланилинами **2b,c** уже при комнатной температуре. Эти же альдегиды с амином **2a** реагируют только при нагревании (80 °C), как и альдегид **1a**, со всеми изученными аминами.



1a, 3a–c M = C, Alk = Me; **1b, 3d–f** M = Si, Alk = Me, **1c, 3g–i** M = Si, Alk = Et;
 gj pwbz CF₃: **2a, 3a, 3d, 3g** 2'-; **2b, 3b, 3e, 3h** 3'-; **2c, 3c, 3f, 3i** 4'-

Полученные данные (табл. 1) показывают, что минимальная активность

характерна для *трет*-бутилзамещенного альдегида **1a** и анилина **2a**, при конденсации которого 2-трифторметильная группа, по-видимому, создает стерические трудности.

Биологические свойства синтезированных соединений определялись различными методами: нейротропная активность – на белых мышах линии ICR (табл. 2), а цитотоксичность – на опухолевых клетках *in vitro* (табл. 3).

Исследованные альдимины, за исключением соединения **3f** (LD₅₀ 365 мг/кг), являются малотоксичными веществами, LD₅₀ которых превышает 1000 мг/кг. Поэтому терапевтический индекс нейротропно активных соединений в изучаемом ряду может быть достаточно высоким.

Изучение двигательной активности животных в тестах "вращающегося стержня" и "трубы" показало, что только имин **3b** обладает выраженными депримирующими свойствами (ED₅₀ 14.5 мг/кг в тесте "трубы"). У других соединений эта активность значительно ниже или практически отсутствует. Большинство соединений проявили анальгезирующие свойства (за исключением **3d,g**); максимальное действие в этом тесте характерно для **3e,i,b**. Ни одно из синтезированных веществ (за исключением сильнотоксичного **3f**) не влияет на тракцию (тест подтягивания на перекладине).

Почти все исследованные соединения **3a–h** несколько уменьшают продолжительность жизни мышей в условиях гипоксической гипоксии – 75–99% (по сравнению с контрольными – 100%). Изученные вещества мало влияют на фенаминовую гипертермию – данные близки к контрольным (100%).

трет-Бутилпроизводные **3a–c**, в особенности **3b**, а также триэтилсилильное **3g** заметно сокращают время этанолового наркоза. Продолжительность гексеналового наркоза увеличивается в присутствии большинства соединений.

Антиконвульсивные свойства по отношению к коразоловым судорогам проявили почти все синтезированные имины, особенно триэтилсилилпроизводные **3g,h**. Изученные соединения в зависимости от структуры оказывают специфическое действие на фармакологические эффекты фенамина. Так, *трет*-бутилпроизводные **3a–c** значительно усиливают стимулирующую активность фенамина – в 5.39, 3.17 и 8.59 раз соответственно. Силильные производные или не влияют на действие фенамина (**3f,g**), либо антагонизируют ему (**3d,e** и особенно **3h**).

Т а б л и ц а 1

Характеристики реакций конденсации				
Соединение	Темп., °С	Время, ч	Чистота, % (ГЖХ)	Выход, %
3a	80	22	98.5	43
3b	80	8	98	63
3c	80	8	99	71
3d	20, 80	48, 3	100	72
3e	20	20	100	100
3f	20	20	100	94
3g	20, 80	48, 6	100	38
3h	20	20	100	89
3i	20	20	100	100

Токсичность и нейротропная активность альдеминов 3а-і

Имин	LD ₅₀ *, мг/кг	ED ₅₀ ** , мг/кг						Тест					
		вращаю- щегося стержня	трубы	анальгезия	тракция	гипокси- ческая гипоксия	фенами- новая гипер- термия	фенами- новая гипер- активность	гексена- ловый наркоз	этанол- ловый наркоз	коразо- ловые судороги		
3а	-	-	-	-	-	76	94	539	144	59	124		
3б	-	>1000	14.5 (± 23.9)	83.9 (± 53.7)	>1000	99	98	317	88	25	104		
3с	-	>1000	551.0 (± 144.0)	178.1 (± 406.0)	>1000	75	101	859	159	55	91		
3д	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	92	101	52	90	103	154		
3е	-	528.8 (± 176.0)	>1000	77.0 (± 17.3)	>1000	87	103	60	103	79	122		
3ф	365 (± 168)	158.0 (± 51.7)	194.0 (± 25.0)	137.0 (± 40.1)	208.0 (± 40.3)	89	101	101	147	117	123		
3г	>1000	628.8 (± 281.0)	>1000	>1000	>1000	88	102	109	123	48	187		
3h	>1000	>1000	>1000	177.0 (± 299.0)	>1000	93	102	17	93	62	210		
3i	>1000	>1000	>1000	81.6 (± 47.7)	>1000	104	103	147	147	131	128		

* Средняя летальная доза.

** Средняя эффективная доза (в скобках указана средняя статистическая ошибка).

Цитотоксичность *in vitro* альдиминов **3a-i***

Имин	Линия клеток					
	HT-1080			MG-22A		
	IC ₅₀		TG ₁₀₀	IC ₅₀		TG ₁₀₀
	CV	МТТ		CV	МТТ	
3a	42	124	23	8	0.43	100
3b	17	0.15	400	5	12	150
3c	28	>100	300	5	4	7
3d	11	28	400	7	9	500
3e	>100	>100	7	>100	>100	12
3f	34	>100	67	60	37	26
3g	11	19	450	12	20	200
3h	20	30	200	22	19	200
3i	14	18	450	8	15	250

* IC₅₀ – концентрация, обеспечивающая 50% гибель клеток, мкг/мл; CV – окрашивание кристаллическим фиолетовым; МТТ – окрашивание бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия; TG₁₀₀ – специфическая NO-генерирующая способность.

Цель цитотоксических исследований – определение способности синтезированных веществ угнетать *in vitro* рост опухолевых клеток, а также выявление активности этих соединений в процессе внутриклеточного синтеза радикалов оксида азота, повышенная концентрация которых является причиной гибели клеток [5]. Концентрации веществ, обеспечивающие 50% гибель клеток (IC₅₀), определяли по стандартной методологии [6] на двух линиях опухолевых клеток: HT-1080 (фибросаркома легких человека) и MG-22A (гепатома мышей).

Среди исследованных соединений лишь имин **3e** не проявил цитотоксичности. Остальные силильные производные обладают умеренным цитотоксическим эффектом. Однако многие из них показали высокий уровень генерирования NO, в особенности триэтилсилильные производные **3g,i** на линии клеток HT-1080 и имин **3d** на клетках MG-22A. Наибольшая цитотоксическая активность обнаружена у углеродных аналогов – *трет*-бутилпроизводных; при этом их действие специфично на различных клетках и в различных тестах. Максимальная цитотоксичность характерна для 3-трифторметилпроизводного **3b** – IC₅₀ = 0.15 мкг/мл на линии клеток HT-1080, а также для 2-трифторметилпроизводного **3a** – IC₅₀ = 0.43 мкг/мл на линии клеток MG-22A. В обоих случаях эта цитотоксичность проявилась при окрашивании бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) митохондриальных энзимов, что свидетельствует о повышении интенсивности их окислительно-восстановительных свойств в присутствии тестируемых веществ. Соединение **3c** показало заметную цитотоксическую активность на линии клеток гепатомы мышей при окрашивании как с помощью МТТ (IC₅₀ = 4 мкг/мл), так и в тесте при окрашивании клеточных мембран кристаллическим фиолетовым (IC₅₀ = 5 мкг/мл). При этом во всех тестах на цитотоксичность морфологических изменений клеток не происходило.

Спектры ЯМР ^1H исследованы на спектрометре фирмы Varian Mercury (200 МГц) для растворов в CDCl_3 , внутренний стандарт ТМС. Масс-спектры получены на хромато-масс-спектрометре HP 6890 GC/MS, оборудованном капиллярной колонкой HP-5 MS (30.0 м × 250 мкм × 0.25 мкм), при программировании температуры от 70 до 260 °С (10 °С/мин).

Бензол перед использованием перегоняли над CaH_2 . Анилина получали от фирмы Acros и использовали без дополнительной очистки. В работе применяли молекулярные сита 4А (VEB Laborchemie Apolda).

Общая методика синтеза альдиминов 3а–i. В круглодонную колбу с обратным холодильником помещают 10 мл сухого бензола и по 5 ммоль исходных альдегида и амина, затем 5 г свежeproкаленных молекулярных сит и проводят реакцию при комнатной температуре или при нагревании на водяной бане при 80 °С в атмосфере аргона, периодически отбирая пробы и анализируя их с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ в системе гексан–этилацетат, 3 : 1, а также методом ГЖХ-МС. В течение определенного времени в зависимости от субстратов (табл. 1) происходит практически полное их превращение в соответствующие продукты. По окончании реакции сита отфильтровывают, промывают их бензолом, фильтрат упаривают при пониженном давлении (40 °С/15 мм) и удаляют незначительные остатки исходных веществ в вакууме (45–50 °С/0.1 мм). Продукты представляют собой маслообразные вещества желтого цвета.

Нейротропную активность изучали на мышцах линии ICR. Методика экспериментов подробно описана в работах [7, 8].

Цитотоксические свойства соединений были изучены на культурах монослойных опухолевых клеток, согласно методике [6]. Количество живых клеток определяли двумя независимыми колориметрическими методами по интенсивности окрашивания клеточных мембран кристаллическим фиолетовым и митохондриальных энзимов бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия, характеризующей интенсивность их окислительно-восстановительных свойств.

Специфическую NO-генерирующую способность тестируемых веществ в экстраполяции на 100% живых клеток вычисляли по уравнению:

$$\text{TG}_{100} = G_{\text{EX}} \cdot 100/C \text{ (нмоль} \cdot 10^2/200 \text{ мкл)},$$

где G_{EX} – концентрация NO (нмоль) в 200 мкл (объем панельной лунки) культуральной среды, генерируемая живыми клетками после инкубации с 50 мкг/мл тестируемого вещества, согласно методу [9]; C – процент живых клеток после инкубации с 50 мкг/мл тестируемого вещества, определяемый по интенсивности окрашивания клеточных мембран кристаллическим фиолетовым [6].

N-(5-трет-Бутил-2-фурилметилен)-2-трифторметиланилин (3а). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 296 (7, $[\text{M} + \text{H}]^+$), 295 (37, M^+), 281 (15), 280 (100, $[\text{M} - \text{Me}]^+$), 172 (36, $[\text{HCNC}_6\text{H}_4\text{CF}_3]^+$), 145 (42, $[\text{C}_6\text{H}_4\text{CF}_3]^+$), 126 (8), 125 (7), 109 (15), 95 (15), 81 (9), 79 (16), 65 (8), 53 (11). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.33 (9H, с, 3CH₃); 6.18 (1H, д, $J = 4.0$, H-4); 6.95 (1H, д, $J = 4.0$, H-3); 6.70 (1H, д, $J = 8.2$, H-3'); 7.20 (1H, т, $J = 8.2$, H-5'); 7.51 (1H, т, $J = 8.2$, H-4'); 7.64 (1H, д, $J = 8.2$, H-6'); 8.09 (1H, с, CH=N).

N-(5-трет-Бутил-2-фурилметилен)-3-трифторметиланилин (3b). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 296 (5, $[\text{M} + \text{H}]^+$), 295 (37, M^+), 281 (17), 280 (100, $[\text{M} - \text{Me}]^+$), 172 (45, $[\text{HCNC}_6\text{H}_4\text{CF}_3]^+$), 145 (47, $[\text{C}_6\text{H}_4\text{CF}_3]^+$), 140 (5), 126 (10), 109 (15), 95 (12), 81 (10), 79 (17), 65 (6), 53 (11). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.38 (9H, с, 3CH₃); 6.20 (1H, д, $J = 4.0$, H-4); 6.98 (1H, д, $J = 4.0$, H-3); 7.29–7.53 (4H, м, H-2', H-4', H-5', H-6'); 8.18 (1H, с, CH=N).

N-(5-трет-Бутил-2-фурилметилен)-4-трифторметиланилин (3c). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 296 (4, $[\text{M} + \text{H}]^+$), 295 (37, M^+), 281 (15), 280 (100, $[\text{M} - \text{Me}]^+$), 172 (37, $[\text{HCNC}_6\text{H}_4\text{CF}_3]^+$), 145 (40, $[\text{C}_6\text{H}_4\text{CF}_3]^+$), 126 (9), 109 (12), 95 (12), 81 (7), 79 (9), 65 (5), 53 (8). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.33 (9H, с, 3CH₃); 6.18 (1H, д, $J = 4.0$, H-4); 6.93 (1H, д, $J = 4.0$, H-3); 7.22 (2H, д, $J = 8.8$, H-3', H-5'); 7.60 (2H, д, $J = 8.8$, H-4', H-6'); 8.09 (1H, с, CH=N).

N-(5-Триметилсиллил-2-фурилметилен)-2-трифторметиланилин (3d). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 312 (23, $[\text{M} + \text{H}]^+$), 311 (100, M^+), 296 (6, $[\text{M} - \text{Me}]^+$), 200 (86), 172 (16, $[\text{HCNC}_6\text{H}_4\text{CF}_3]^+$), 152 (21), 145 (23, $[\text{C}_6\text{H}_4\text{CF}_3]^+$), 126 (13), 125 (10), 107 (5), 95 (5), 81 (6), 77 (30). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.33 (9H, с, 3CH₃); 6.78 (1H, д, $J = 4.0$, H-4); 7.02 (1H, д, $J = 8.0$, H-3'); 7.09 (1H, д, $J = 4.0$, H-3); 7.24 (1H, т, $J = 8.0$, H-5'); 7.47 (1H, т, $J = 8.0$, H-4'); 7.66 (1H, д, $J = 8.0$, H-6'); 8.18 (1H, с, CH=N).

N-(5-Триметилсиллил-2-фурилметилен)-3-трифторметиланилин (3e). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 312 (22, $[M + H]^+$), 311 (100, M^+), 296 (32, $[M - Me]^+$), 268 (5), 252 (5), 230 (5), 218 (14), 202 (52), 172 (12, $[HCNC_6H_4CF_3]^+$), 152 (15), 145 (32, $[C_6H_4CF_3]^+$), 141 (16), 126 (10), 125 (10), 95 (10), 77 (51), 73 (10), 59 (9). Спектр ЯМР 1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.33 (9H, с, 3CH₃); 6.73 (1H, д, $J = 4.0$, H-4); 7.02 (1H, д, $J = 4.0$, H-3); 7.27–7.55 (4H, м, H-3', H-4', H-5', H-6'); 8.27 (1H, с, CH=N).

N-(5-Триметилсиллил-2-фурилметилен)-4-трифторметиланилин (3f). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 312 (11, $[M + H]^+$), 311 (53, M^+), 296 (100, $[M - Me]^+$), 200 (86), 178 (4), 145 (19, $[C_6H_4CF_3]^+$), 141 (12), 126 (7), 95 (5), 77 (7), 73 (6), 59 (9). Спектр ЯМР 1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.33 (9H, с, 3CH₃); 6.75 (1H, д, $J = 4.0$, H-4); 7.04 (1H, д, $J = 4.0$, H-3); 7.26 (2H, д, $J = 8.6$, H-3', H-5'); 7.64 (1H, д, $J = 8.6$, H-4', H-6'); 8.29 (1H, с, CH=N).

N-(5-Триэтилсиллил-2-фурилметилен)-2-трифторметиланилин (3g). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 354 (5, $[M + H]^+$), 353 (30, M^+), 324 (11, $[M - Et]^+$), 201 (13), 200 (100), 172 (10, $[HCNC_6H_4CF_3]^+$), 152 (10), 145 (10, $[C_6H_4CF_3]^+$), 126 (9), 125 (9), 105 (12), 95 (6), 77 (28), 59 (5). Спектр ЯМР 1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.84 (6H, кв, $J = 7.2$, 3CH₂); 0.98 (9H, т, $J = 7.2$, 3CH₃); 6.76 (1H, д, $J = 3.4$, H-4); 7.03 (1H, д, $J = 7.8$, H-3'); 7.09 (1H, д, $J = 3.4$, H-3); 7.24 (1H, т, $J = 7.8$, H-5'); 7.52 (1H, т, $J = 7.8$, H-4'); 7.65 (1H, д, $J = 7.8$, H-6'); 8.23 (1H, с, CH=N).

N-(5-Триэтилсиллил-2-фурилметилен)-3-трифторметиланилин (3h). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 354 (22, $[M + H]^+$), 353 (82, M^+), 325 (17), 324 (68, $[M - Et]^+$), 296 (12), 248 (7), 238 (7), 220 (19), 218 (37), 203 (25), 202 (100), 184 (15), 172 (28, $[HCNC_6H_4CF_3]^+$), 152 (27), 145 (59, $[C_6H_4CF_3]^+$), 133 (33), 126 (25), 125 (23), 105 (53), 95 (30), 77 (75), 59 (22). Спектр ЯМР 1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.85 (6H, кв, $J = 7.2$, 3CH₂); 1.00 (9H, т, $J = 7.2$, 3CH₃); 6.80 (1H, д, $J = 4.0$, H-4); 7.09 (1H, д, $J = 4.0$, H-3); 7.31–7.58 (4H, м, H-3', H-4', H-5', H-6'); 8.28 (1H, с, CH=N).

N-(5-Триэтилсиллил-2-фурилметилен)-4-трифторметиланилин (3i). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 353 (23, M^+), 334 (5, $[M - F]^+$), 325 (25), 324 (100, $[M - Et]^+$), 296 (5), 266 (7), 248 (2), 238 (2), 220 (7), 145 (18, $[C_6H_4CF_3]^+$), 133 (3), 126 (7), 95 (5), 77 (4), 59 (6). Спектр ЯМР 1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.85 (6H, кв, $J = 7.2$, 3CH₂); 0.99 (9H, т, $J = 7.2$, 3CH₃); 6.78 (1H, д, $J = 4.0$, H-4); 7.04 (1H, д, $J = 4.0$, H-3); 7.24 (2H, д, $J = 8.4$, H-3', H-5'); 7.62 (1H, д, $J = 8.4$, H-4', H-6'); 8.22 (1H, с, CH=N).

Авторы благодарны Dr. chem. hab. Л. Игнатович за предоставление образцов 5-трет-бутилфурфуrolа и его сильных аналогов, а также Латвийскому совету по науке за финансирование работы (грант № 181).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. Иовель, Л. Голомба, Ю. Попелис, А. Гаухман, Э. Лукевиц, *ХГС*, 324 (2000).
2. И. Иовель, Л. Голомба, С. Беляков, Э. Лукевиц, *ХГС*, 778 (2000).
3. И. Иовель, Л. Голомба, Ю. Попелис, С. Гринберга, Э. Лукевиц, *ХГС*, 890 (2000).
4. I. Iovel, L. Golomba, S. Belyakov, A. Kemme, E. Lukevics, *Appl. Organometal. Chem.*, **15**, 733 (2001).
5. J. F. Kerwin, F. R. Lankaster, P. L. Feldman, *J. Med. Chem.*, **38**, 4343 (1995).
6. P. J. Freshney, *Culture of Animal Cells (A Manual of Basic Technique)*, Wiley-Liss, New York, 1994, 296.
7. Э. Лукевиц, И. Сегал, А. Заблоцкая, С. Германе, *ХГС*, 793 (1996).
8. Э. Лукевиц, М. Трушуле, С. Германе, И. Туровский, *ХГС*, 265 (1997).
9. D. J. Fast, R. C. Lynch, R. W. J. El, *Leukocyt. Biol.*, **52**, 255 (1992).

*Латвийский институт органического синтеза, Riga LV-1006
e-mail: iovel@osi.lv*

Поступило в редакцию 08.11.2002