

Г. Вейнберг, Р. Бокалдере, К. Диковская, М. Ворона,
 Д. Мусель, Х. Кажока, И. Туровскис, И. Шестакова,
 И. Канепе, И. Домрачева, Э. Лукевиц

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ ПЕНИЦИЛЛИНА

Взаимодействием гетероциклических тиолов с сульфоксидами 6,6-дигидро и 6 α -хлорпеницилланатов синтезированы производные 4-гетерилдитио-2-азетидинонов, а также продукты их циклизации в 2 β -гетерилтиометил-, 2 β -галометилзамещенные пеницилланаты, эфир 3-хлор-3-метил-7 α -хлорцефам-4-карбоновой кислоты, а также осуществлена десульфуризация 6 α -хлорпеницилланата никелем Ренея. Для синтезированных веществ установлена прямая зависимость между интенсивностью их цитотоксического действия *in vitro* в отношении опухолевых клеток и их влиянием на внутриклеточную генерацию радикалов окиси азота.

Ранее на примерах сульфонов 7 α -хлор- и 7 α -метоксицефалоспороанатов нами была выявлена способность этих соединений угнетать *in vitro* рост различных типов опухолевых клеток, причем одновременно наблюдаются интенсивное внутриклеточное генерирование радикалов окиси азота [1]. В настоящей работе главными объектами аналогичного исследования являлись 4-гетерилдитиозамещенные азетидиноны, образующиеся при взаимодействии гетероциклических тиолов с сульфоксидами 6,6-дигидро- и 6 α -хлорпеницилланатов, а также продукты их циклизации в соответствующие 2 β -гетерилтиометил- и 2 β -галометилзамещенные пеницилланаты.

Термическое расщепление тиазолидинового цикла в сульфоксидах сложных эфиров пенициллановых кислот I с образованием промежуточных сульфеновых кислот, вступающих в реакцию с 2-меркаптобензотиазолом (IIa, BT) или 1-метил-2-меркаптоимидазолом (IIб, МИ) с получением изомерных 4-гетерилдитиозамещенных азетидинонов III и IV, было реализовано согласно известным методикам (см. схему 1) [2—4].

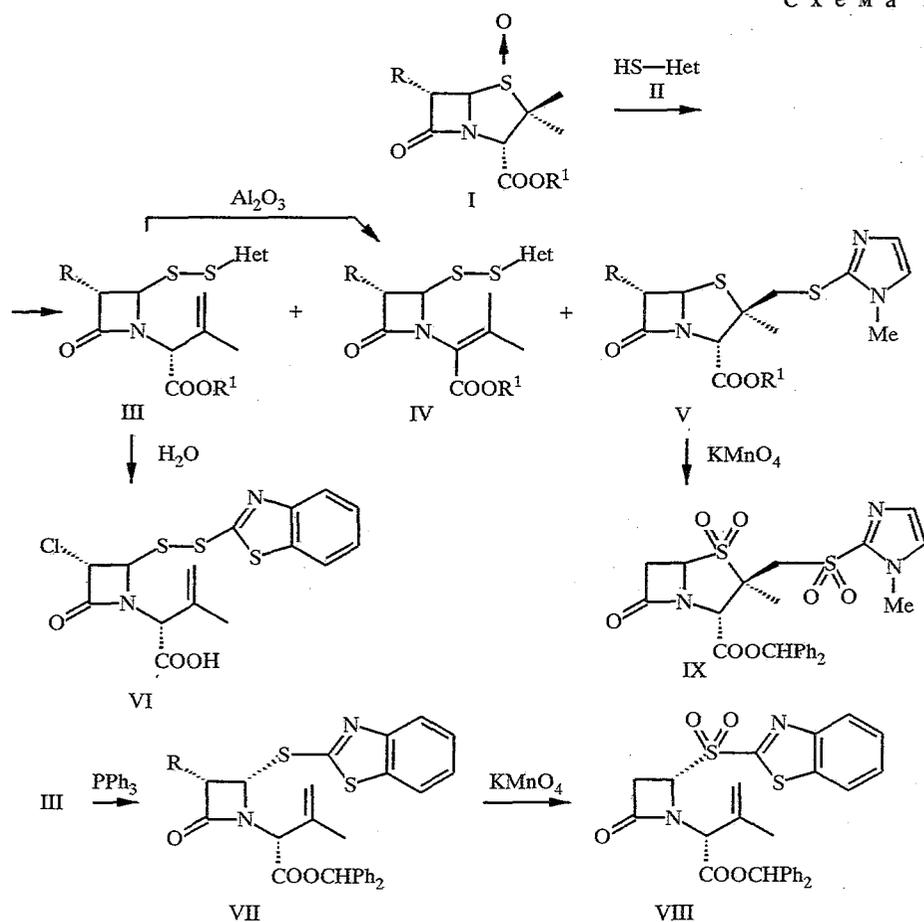
Анализ строения продуктов реакции реакции свидетельствует о влиянии бензотиазольной гетероциклической системы на предпочтительное образование только одних изопрופןильных изомеров азетидинона IIIa—г. Изомеризация IIIa в изопропилидензамещенное IVa была реализована с помощью окиси алюминия.

Аналогичная реакция I с IIб приводит к образованию сложной смеси, состоящей из изомерных азетидинонов IIIд—ж, IVб—г и пеницилланатов Va,б. Соотношение изомерных азетидинонов, содержащих этот гетероцикл, установлено с помощью ВЭЖХ (см. табл. 1). Из данных таблицы 1 видно, что этот показатель зависит от наличия или отсутствия атома хлора в положении 3 азетидинона и природы сложноэфирной группы.

4-(Бензотиазол-2)дитиозамещенный азетидинон со свободной карбоксильной группой VI был выделен в результате гидролитического расщепления связи Si—O в IIIг.

4-Моноитиозамещенные азетидиноны VII получены десульфуризацией IIIa,б трифенилфосфином согласно методу [5]. При этом в случае VIIб удаление атома серы сопровождалось изменением конфигурации заместителей у атома C(4).

Сульфоны VIII и IX синтезированы окислением тиогруппы в VIIa и Va перманганатом калия. Неоднократные попытки окислить таким образом VIIб, в том числе с использованием перекиси водорода и *meta*-хлорнадбензойной кислоты, приводили к разложению в нем β -лактамного цикла.



I а R = H, R¹ = CHPh₂; б R = Cl, R¹ = CHPh₂; в R = Cl, R¹ = *t*-Bu; г R = Cl, R¹ = SiMe₃;
 II а Het = бензотиазол-2 (БТ), б Het = 1-метилимидазол-2 (МИ); III а R = H, R¹ = CHPh₂
 Het = БТ; б R = Cl, R¹ = CHPh₂, Het = БТ; в R = Cl, R¹ = *t*-Bu, Het = БТ; г R = Cl, R¹ = SiMe₃,
 Het = БТ; д R = H, R¹ = CHPh₂, Het = МИ; е R = Cl, R¹ = CHPh₂, Het = МИ; ж R = Cl, R¹ = *t*-Bu,
 Het = МИ; IV а R = H, R¹ = CHPh₂, Het = БТ; б R = H, R¹ = CHPh₂, Het = МИ; в R = Cl, R¹ =
 CHPh₂, Het = МИ; г R = Cl, R¹ = *t*-Bu, Het = МИ; V а R = H, R¹ = CHPh₂; б R = Cl, R¹ = *t*-Bu;
 VII а R = H, б R = Cl

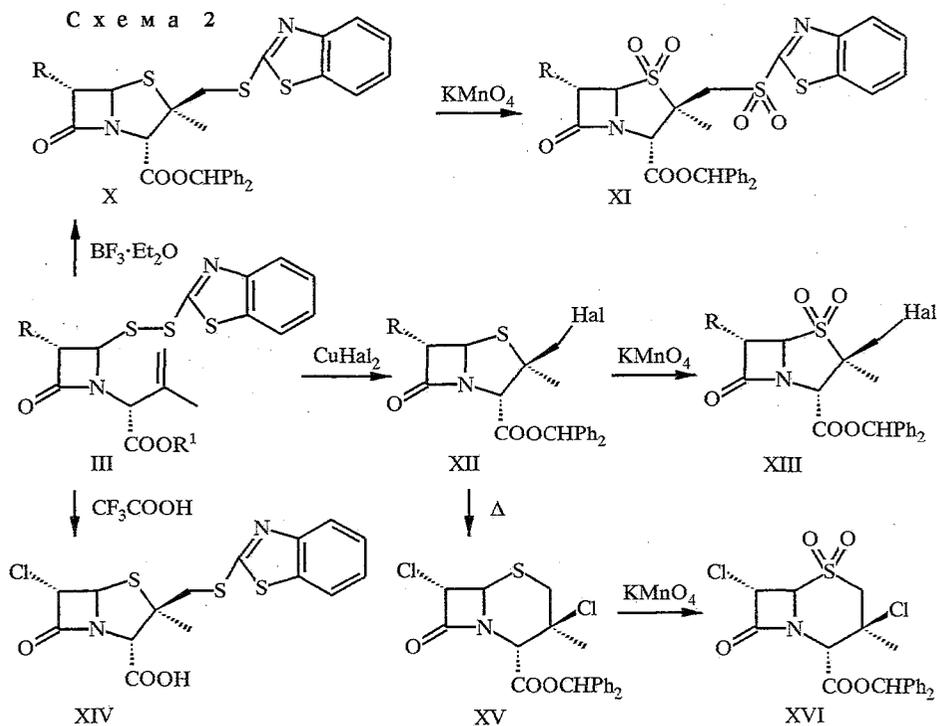
Таблица 1

Соотношение изомерных 4-(1-метилимидазол-2)-дитиоазетидинов III и IV, выделенных из реакционной смеси

Исходный пенициллин	R	R ¹	Соотношение III/IV
Ia	H	CHPh ₂	90 : 10 (IIIд/IVб)
Iб	Cl	CHPh ₂	9 : 91 (IIIе/IVв)
Iв	Cl	<i>t</i> -Bu	85 : 15 (IIIж/IVг)

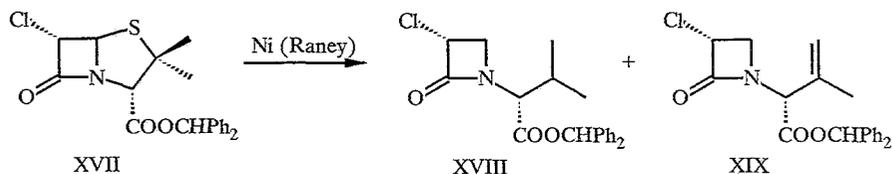
На схеме 2 представлены реакции, базирующиеся на внутримолекулярном замыкании тиазолидинового цикла в эфирах 4-(бензотиазол-2) дитио-замещенных азетидинов, сопровождающемся функционализацией 2β-метильной группы [3, 6]. Циклизация азетидинов III в 2β-(бензотиазол-2-тио)метилпеницилланаты X реализована с помощью эфирата трифторида бора, а в 2β-галометилпеницилланаты XII — галогенидов меди. Обработка

III в трифторуксусной кислоте, наряду с отщеплением *tert*-бутильной группы, способствовала образованию $\beta\alpha$ -хлор-2 β -(бензотиазолил-2-тио)метилпенициллановой кислоты (XIV). Термическая обработка XIIб способствовала его изомеризации в бензгидрильный эфир $\beta\alpha$ -хлор-3-метил-3-хлорцефам-4-карбоновой кислоты (XV). Аналоги пенициллина и цефалоспорина X, XII и XV окислены в соответствующие сульфоны XI, XIII, XVI перманганатом калия в смеси уксусная кислота—вода.



III а R = H, R¹ = CHPh₂; б R = Cl, R¹ = CHPh₂; в R = Cl, R¹ = *t*-Bu; X, XI а R = H, б R = Cl;
 XII, XIII а R = H, Hal = Cl; б R = Cl, Hal = Cl; в R = Cl, Hal = Br

Десульфуризация $\beta\alpha$ -хлорпеницилланата XVII, по аналогии с методом, предложенным в работе [7], привела к образованию неразделимой смеси азетидинонов XVIII и XIX (2 : 1).



Биологическая часть проведенного исследования включала определение цитотоксических свойств синтезированных веществ в отношении опухолевых и нормальных клеток, а также их способности генерировать внутриклеточный синтез радикалов окиси азота, повышенная концентрация которых, как известно, является причиной гибели клеток [8].

Концентрации веществ, обеспечивающие 50% гибель клеток *in vitro* (TD₅₀), определялись по стандартной методологии [9] на четырех линиях опухолевых клеток: HT-1080 (фибросаркома человека), MG-22A (мышьяная гепатома), B16 (мышьяная меланома) и Neuro 2A (мышьяная нейробластома), а также на Fibroblasts (нормальные клетки мышьяного фибробласта).

Согласно проявленному биологическому эффекту синтезированные соединения можно разделить на три группы. В первую входят вещества, не обладающие цитотоксическими свойствами в концентрациях 100 (мкг/мл или более (см. табл. 2). К ним относятся: монотиозамещенный азетидинон VIIб, сульфоны 2β-(1-метилимидазолил-2-тио)- и 2β-(бензотиазолил-2-тио)метилпеницилланатов IX, XIб, 3,6-дихлорцефалоспорианат XVI и сульфен 2β-хлорметил-6,6-дигидропеницилланата XIIIа.

Вторую группу, проявляющую умеренный цитотоксический эффект (см. табл. 2), составили сульфены 2β-(бензотиазолил-2-тио)метил-6,6-дигидропеницилланата XIа, 2β-галометилпеницилланатов XIIIб,в и некоторые структурные типы азетидинов.

В третью группу (см. табл. 3) наиболее активных веществ вошли только азетидиноны. Их цитотоксическое действие *in vitro* распространяется на широкий диапазон опухолевых клеток. В подавляющем большинстве (кроме соединения VIII) в концентрациях 10 мкг/мл (токсичных для большинства опухолевых клеток) они не угнетали рост нормальных клеток Fibroblasts, что свидетельствует об их избирательной токсичности.

При этом для всех трех групп веществ наблюдается корреляционная зависимость между величинами цитотоксических концентраций и интенсивностью внутриклеточной генерации радикалов окиси азота, свидетельствующая о взаимосвязи этих двух биологических эффектов и, следовательно, о перспективности поиска новых цитотоксических средств среди эфиров 2-[4-(гетерилдитио)-2-оксазетидинил-1]-2-(изопренил)уксусной кислоты.

Таблица 2

Биологические свойства синтезированных соединений

Соединение	Цитотоксический эффект (мкг/мл) и специфическая NO генерирующая способность в отношении опухолевых клеток					
	MG-22A			HT-1080		
	TD ₅₀ (CV)*	TD ₅₀ (МТТ)* ²	TG ₁₀₀ * ³	TD ₅₀ (CV)	TD ₅₀ (МТТ)	TG ₁₀₀
VIIб	>100	>100	12	>100	>100	16
IX	>100	>100	18	>100	>100	22
XIб	100	>100	61	>100	>100	41
XVI	100	>100	26	>100	>100	29
XIIIа	100	53	800	>100	90	142
XIа	50	50	850	50	50	243
XIIIб	13	46	1100	40	42	467
XIIIв	9	42	800	45	34	797
IIIб	27	38	1100	41	45	498
IIIж	18	29	400	35	35	104
VI	44	44	750	55	48	97
Смесь XVIII и XIX	40	53	600	46	55	99

* Концентрация, обеспечивающая 50% гибель клеток (окрашивание CV — кристаллический фиолетовый).

*² Концентрация, обеспечивающая 50% гибель клеток (окрашивание МТТ — бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия).

*³ Специфическая NO генерирующая способность.

Цитотоксический эффект (мкг/мл) и специфическая NO генерирующая способность в отношении опухолевых и нормальных клеток

Соединение	MG-22A			HT-1080			B16			Neuro 2A			Fibroblasts
	TD ₅₀ (CV)*	TD _{50,2} (MTT) ²	TG ₁₀₀ ³	TD ₅₀ (CV)	TD ₅₀ (MTT)	TG ₁₀₀	TD ₅₀ (CV)	TD ₅₀ (MTT)	TG ₁₀₀	TD ₅₀ (CV)	TD ₅₀ (MTT)	TG ₁₀₀	TD ₅₀ (CV)
IIa	3,5	7,0	1350	6,0	10	910	5,0	3,8	625	80	>100	26	>10
IIIb	3,2	4,0	700	5,1	5,4	850	5,7	7,6	621	53	54	850	>10
IIIд	8,0	6,0	750	31	7,0	555	8,0	28	750	52	53	750	>10
VIIa	5,0	5,0	1350	6,0	7,0	1450	1,5	2,2	100	>100	2,0	28	>10
VIIб	4,5	4,0	650	6,0	7,0	633	32	49	1100	49	56	800	>10
VIII	4,5	4,1	1150	4,1	4,6	1350	3,2	4,3	674	6,4	7,1	900	1,0

* Концентрация, обеспечивающая 50% гибель клеток (окрашивание CV — кристаллическим фиолетовым).

² Концентрация, обеспечивающая 50% гибель клеток (окрашивание MTT — бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия).

³ Специфическая NO генерирующая способность.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ПМР сняты на спектрометре Bruker WH-90/DS (90 МГц) в CDCl_3 , внутренний стандарт ТМС. Элементные анализы выполнены с помощью анализатора Carlo Erba 1108. Данные ВЭЖХ получены на приборе Du Pont Model 8800, снабженном УФ детектором ($\lambda = 254 \text{ нм}$) и колонкой (4,6×250 мм), заполненной фазой Syshmetry C_{18} , в системе ацетонитрил—0,1 М фосфатный буфер с рН 2,5, 60 : 40, скорость 0,8...1,5 мл/мин.

Контроль за ходом реакции осуществлялся методом ТСХ на пластинках Merck Kieselgel, с УФ проявлением. Для препаративной колоночной хроматографии применялся силикагель марки Merck Kieselgel (0,063...0,230 мм). В экспериментах применялись реагенты и материалы фирм Aldrich, Acros и Sigma.

Бензгидриловый эфир 2-[4-(2-бензотиазолилдитио)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (ША) и бензгидриловый эфир 2-[4-(2-бензотиазолилдитио)-3-хлор-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (ШБ) синтезированы согласно методам, приведенным в работах [2, 3].

трет-Бутиловый эфир 2-[4-(1-бензотиазолилдитио)-3-хлор-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (ШВ). К раствору *трет*-бутилового эфира 6-аминопенициллановой кислоты 1,7 г (6,26 ммоль) в 23 мл дихлорметана добавляют изопропилнитрит 0,78 мл (7,5 ммоль), три капли трифторуксусной кислоты и полученный раствор перемешивают при 30 °С 30 мин, контролируя завершение реакции по исчезновению пятна исходной аминокислоты с R_f 0,31 и появлению нового пятна с R_f 0,71 на ТСХ в системе гексан—этилацетат, 1 : 1. Растворитель упаривают при пониженном давлении. Кристаллический *трет*-бутиловый эфир 6-диазопенициллановой кислоты (ИК спектр: 2980, 2940, 2080, 1770, 1740 см^{-1}) растворяют в 20 мл дихлорметана и к полученному раствору добавляют 2 мл этилацетата, насыщенного хлористым водородом (2 М раствор). Смесь перемешивают 20 мин при комнатной температуре и растворитель упаривают при пониженном давлении. Остаток фракционируют на хроматографической колонке с силикагелем (элюент гексан—этилацетат, 2 : 1). Фракции с R_f 0,63 объединяют и упаривают. Получают 900 мг (49%) *трет*-бутилового эфира 6 α -хлорпенициллановой кислоты. Спектр ПМР (CDCl_3): 1,53 (9H, с, *t*-Bu); 1,55 (3H, с, CH_3); 1,61 (3H, с, CH_3); 4,44 (1H, с, $\text{C}_3\text{-H}$); 4,77 (1H, д, $J = 1$, $\text{C}_5\text{-H}$); 5,33 (1H, д, $J = 1$, $\text{C}_6\text{-H}$).

К раствору *трет*-бутилового эфира 6 α -хлорпенициллановой кислоты 200 мг (0,69 ммоль) в 15 мл дихлорметана при 0 °С добавляют *мета*-хлорнадбензойную кислоту 118 мг (0,69 ммоль) и затем две дополнительные порции этой кислоты по 33 мг с интервалом в 10 мин. Смесь перемешивают при комнатной температуре 1 ч, разбавляют 80 мл дихлорметана, промывают 5% раствором Na_2SO_3 (30 мл), 5% раствором Na_2CO_3 (2×30 мл) и сушат над безводным Na_2SO_4 . Растворитель упаривают при пониженном давлении и остаток фракционируют на хроматографической колонке с силикагелем (элюент этилацетат—гексан, 1 : 2). Фракции с R_f 0,17 объединяют и упаривают. Получают 201 мг (95%) *трет*-бутилового эфира сульфоксида 6 α -хлорпенициллановой кислоты в виде смеси 1*S*- (90%) и 1*R*-изомеров (9%), согласно данным ВЭЖХ. Спектр ПМР (CDCl_3) 1*S*-изомера: 1,26 (3H, с, CH_3); 1,51 (9H, с, *t*-Bu); 1,66 (3H, с, CH_3); 4,44 (1H, с, $\text{C}_3\text{-H}$); 4,97 (1H, д, $J = 1$, $\text{C}_5\text{-H}$); 5,06 (1H, д, $J = 1$, $\text{C}_6\text{-H}$). Спектр ПМР (CDCl_3) 1*R*-изомера: 1,26 (3H, с, CH_3); 1,47 (9H, с, *t*-Bu); 1,66 (3H, с, CH_3); 4,37 (1H, с, $\text{C}_3\text{-H}$); 4,77 (1H, д, $J = 2$, $\text{C}_5\text{-H}$); 5,05 (1H, д, $J = 2$, $\text{C}_6\text{-H}$). ИК спектр (нуйол): 1810, 1740, 1050 ($\text{S}=\text{O}$) см^{-1} .

Раствор *трет*-бутилового эфира сульфоксида 6 α -хлорпенициллановой кислоты 500 мг (1,63 ммоль) и 2-меркаптобензотиазола 272 мг (1,63 ммоль) в 20 мл сухого толуола кипятят 2 ч, контролируя завершение реакции с помощью ТСХ в системе гексан—этилацетат, 1 : 1. Реакционную смесь охлаждают и толуол упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент гексан—этилацетат, 2 : 1). Фракции с R_f 0,50 объединяют и упаривают. Получают 300 мг (26%) вещества с $T_{\text{пл}} 73...74$ °С. Спектр ПМР (CDCl_3): 1,46 (9H, с, *t*-Bu); 1,93 (3H, с, CH_3); 4,73 (1H, с, NCHCOO); 5,04 (1H, д, $J = 1$, $\text{C}_4\text{-H}$); 5,13, 5,20 (2H, 2 уш. с, $\text{C}=\text{CH}_2$); 5,26 (1H, д, $J = 1$, $\text{C}_3\text{-H}$); 7,33...8,02 (4H, м, C_6H_4). Найдено, %: С 50,29; Н 4,66; N 5,94. $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}_3$. Вычислено, %: С 49,93; Н 4,62; N 6,13.

Бензгидриловый эфир 2-[4-(1-метилимидазол-2-дитио)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (ШД). Суспензию бензгидрилового эфира сульфоксида 6,6-дигидропенициллановой кислоты 200 мг (0,50 ммоль), 2-меркапто-1-метилимидазола 60 мг (0,50 ммоль) и Al_2O_3 500 мг в 6 мл сухого толуола кипятят 1 ч, контролируя завершение реакции с помощью ТСХ в системе хлороформ—ацетон, 9 : 1. Реакционную смесь охлаждают, фильтруют через слой силикагеля и толуол упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют

ют на колонке с силикагелем (элюент хлороформ—ацетон, 9 : 1). Фракции с R_f 0,38 объединяют и упаривают. Получают 52 мг (21%) смеси, состоящей, согласно данным ВЭЖХ, из 90% бензгидрилового эфира 2-[4-(1-метилимидазол-2-дитио)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (Шд). Спектр ПМР ($CDCl_3$): 1,82 (3H, с, CH_3); 3,31...3,46 (2H, м, C_3-H_2); 3,68 (3H, с, NCH_3); 4,84 (1H, с, $NCHO$); 4,84 (1H, д, $J=1$, $=CH_2$); 5,04 (1H, д, $J=1$, $=CH_2$); 5,22...5,35 (1H, м, C_4-H); 6,93 (1H, с, $CHPh_2$); 6,95 (1H, д, $J=0,5$, имидазол); 7,06 (1H, д, $J=0,5$, имидазол); 7,33 (10H, с, $2C_6H_5$). Найдено, % : C 63,49; H 5,61; N 8,13. $C_{25}H_{25}N_3O_5S_2 \cdot 0,25C_6H_{14}$. Вычислено, % : C 63,51; H 5,49; N 8,38.

Содержание в смеси бензгидрилового эфира 2-[4-(1-метилимидазол-2-дитио)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропилиден)уксусной кислоты (IVб), согласно данным ВЭЖХ, составляет 10%. Спектр ПМР содержит характерные сигналы метильных групп: 2,04 (3H, с, CH_3); 2,24 (3H, с, CH_3); 3,66 (3H, с, $N-CH_3$).

трет-Бутиловый эфир 2-[4-(1-метилимидазол-2-дитио)-3-хлор-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (Шж). Раствор *трет*-бутилового эфира сульфоксида β -хлорпенициллановой кислоты 300 мг (0,98 ммоль) и 2-меркапто-1-метилимидазола 137 мг (1,20 ммоль) в 20 мл сухого толуола кипятят 2 ч, контролируя завершение реакции с помощью ТСХ в системе гексан—этилацетат, 1 : 1. Реакционную смесь охлаждают и толуол упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент гексан—этилацетат, 2 : 1) и затем элюентом гексан—этилацетат, 1 : 1. Фракции с R_f 0,23 объединяют и упаривают. Получают 40 мг (10%) смеси, содержащей, согласно данным ВЭЖХ, 85% *трет*-бутилового эфира 2-[4-(1-метилимидазол-2-дитио)-3-хлор-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (Шж). Спектр ПМР ($CDCl_3$): 1,46 (9H, с, *t*-Bu); 1,80 (3H, с, CH_3); 3,77 (3H, с, $N-CH_3$); 4,62 (1H, с, $CHCOO$); 5,06, 5,12 (2H, 2 с, $C=CH_2$); 5,15 (H, д, $J=1$, C_4-H); 5,71 (1H, д, $J=1$, C_3-H); 7,00, 7,08 (2H, д, $J=0,5$, имидазол).

Содержание в смеси *трет*-бутилового эфира 2-[4-(1-метилимидазол-2-дитио)-3-хлор-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропилиден)уксусной кислоты (IVг), согласно данным ВЭЖХ, составляет 15%. Спектр ПМР содержит характерные сигналы метильных групп: 2,02 (3H, с, CH_3); 2,22 (3H, с, CH_3); 3,64 (3H, с, $N-CH_3$).

Бензгидриловый эфир 2-[4-(2-бензотиазолилдитио)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропилиден)уксусной кислоты (IVа). К раствору бензгидрилового эфира 2-[4-(2-бензотиазолилдитио)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты 200 мг (0,37 ммоль) в 10 мл дихлорметана добавляют Al_2O_3 100 мг. Суспензию перемешивают при комнатной температуре 48 ч, фильтруют и фильтрат упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент дихлорметан—ацетон, 60 : 1). Получают 124 мг (62%) вещества с $T_{пл}$ 45...46 °C и содержанием основного вещества 97%, согласно данным ВЭЖХ. Спектр ПМР ($CDCl_3$): 1,97 (3H, с, CH_3); 2,12 (3H, с, CH_3); 3,20, 3,31 (2H, д, $J=2$, $J=4$, C_3-H_2); 5,22, 5,26 (1H, д, $J=2$, $J=4$, C_4-H); 6,84 (1H, с, $CHPh_2$); 7,10...7,95 (14H, м, $2C_6H_5$, C_6H_4).

Бензгидриловый эфир 2-[4-(1-метилимидазол-2-дитио)-3-хлор-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропилиден)уксусной кислоты (IVв). Раствор бензгидрилового эфира сульфоксида β -хлорпенициллановой кислоты 600 мг (1,44 ммоль) и 2-меркапто-1-метилимидазола 180 мг (1,58 ммоль) в 15 мл сухого толуола кипятят 4 ч, контролируя завершение реакции с помощью ТСХ в системе этилацетат—гептан, 3 : 2. Реакционную смесь охлаждают и толуол упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент этилацетат—гептан, 3 : 2). Фракции с R_f 0,50 объединяют и упаривают. Получают 225 мг (30%) смеси, содержащей, согласно данным ВЭЖХ, 91% бензгидрилового эфира 2-[4-(1-метилимидазол-2-дитио)-3-хлор-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропилиден)уксусной кислоты (IVв). Спектр ПМР ($CDCl_3$): 2,11 (3H, с, CH_3); 2,28 (3H, с, CH_3); 3,68 (3H, с, $N-CH_3$); 5,15 (H, д, $J=1$, C_4-H); 5,78 (1H, д, $J=1$, C_3-H); 6,88...7,11 (3H, м, $CHPh_2$, имидазол); 7,33 (10H, м, $2C_6H_5$). Найдено, % : C 58,61; H 4,82; N 8,23; S 12,37. $C_{25}H_{24}ClN_3O_3S_2$. Вычислено, % : C 58,41; H 4,70; N 8,17; S 12,49.

Содержание в смеси изомерного бензгидрилового эфира 2-[4-(1-метилимидазол-2-дитио)-3-хлор-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (IIIе), согласно данным ВЭЖХ, составляет 9%. Спектр ПМР содержит характерные сигналы метильных и метиленовой групп: 1,84 (3H, с, CH_3); 3,68 (3H, с, NCH_3); 5,89, 4,91 (2H, 2 с, $C=CH_2$).

2-[4-(2-Бензотиазолилдитио)-3-хлор-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусная кислота (VI). Раствор сульфоксида β -хлорпенициллановой кислоты 600 мг (2,38 ммоль), *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамида 0,583 мл (2,38 ммоль) и 2-меркаптобензотиазола 138 мг (2,38 ммоль) в 15 мл сухого бензола кипятят 5 ч. Смесь разбавляют дихлорметаном, промывают

водой, сушат безводным Na_2SO_4 и упаривают досуха. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент гексан—этилацетат, 1 : 1). Фракции с R_f 0,05 объединяют и упаривают. Получают 100 мг (10%) маслообразного гигроскопичного вещества с содержанием основного вещества 86%, согласно данным ВЭЖХ. Спектр ПМР (CDCl_3): 1,95 (3H, с, CH_3); 4,93 (1H, с, $\text{CH}-\text{COO}$); 5,06 (1H, д, $J = 1$, C₂-H); 5,20, 5,26 (2H, 2 уш. с, C=CH₂); 5,26 (1H, уш. с, C₃-H); 7,28...8,11 (4H, м, C₆H₄); 9,71 (1H, с, COOH).

Бензгидриловый эфир 2β -(1-метилимидазолил-2-тио)метил-2 α -метил-6,6-дигидропенам-3 α -карбоновой кислоты (Va). Суспензию бензгидрилового эфира сульфоксида 6,6-дигидропенициллановой кислоты 383 мг (1,0 ммоль) и 2-меркапто-1-метилимидазола 120 мг (1,05 ммоль) в 10 мл сухого толуола кипятят 3 ч. Реакционную смесь охлаждают и упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент этилацетат—гексан, 3 : 1). Фракции с R_f 0,57 объединяют и упаривают. Получают 200 мг (41%) вещества, которое без специальной очистки окисляют в сульфон IX. Спектр ПМР (CDCl_3): 1,26 (3H, с, CH_3); 3,06 (1H, д, д, $J = 2$, $J = 16$, C₆-H_{транс}); 3,55 (1H, д, д, $J = 4$, $J = 16$, C₆-H_{цис}); 3,62 (3H, с, NCH_3); 3,48, 3,71 (2H, AB-к, $J = 14$, SCH₂); 4,95 (1H, с, C₃-H); 5,31 (1H, д, д, $J = 2$, $J = 4$, C₅-H); 6,93 (1H, с, CHPh_2); 6,88 (1H, д, $J = 1$ C₄-H_{имидазол}); 7,04 (1H, д, $J = 1$, C₅-H_{имидазол}); 7,35 (10H, м, 2C₆H₅).

трет-Бутиловый эфир 2β -(1-метилимидазолил-2-тио)метил-2 α -метил-6 α -хлорпенам-3 α -карбоновой кислоты (Vb) получают аналогично соединению Va из *трет*-бутилового эфира сульфоксида 6 α -хлорпенициллановой кислоты и 2-меркапто-1-метилимидазола. Выход 25%. $T_{\text{пл}}$ 124...125 °C. Спектр ПМР (CDCl_3): 1,45 (9H, с, *t*-Bu); 1,51 (3H, с, CH_3); 3,24, 3,57 (2H, AB-к, $J = 14$, CH₂S); 3,57 (3H, с, NCH_3); 4,68 (1H, с, C₃-H); 4,77 (1H, д, $J = 0,5$, C₅-H); 5,22 (1H, д, $J = 0,5$, C₆-H); 6,88 и 7,00 (2H, д, д, $J = 0,5$ имидазол). Найдено, % : C 47,42; H 5,42; N 10,25. $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}_2$. Вычислено, % : C 47,58; H 5,49; N 10,40.

Бензгидриловый эфир 2-[4-(2-бензотиазолилсульфонил)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (VIII). Раствор бензгидрилового эфира 2-[4-(2-бензотиазолилтио)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (IIIa) 532 мг (1,0 ммоль) и трифенилфосфина 265 мг (1,0 ммоль) в 1,7 мл дихлорметана выдерживают 1 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляют 10 мл дихлорметана, фильтруют через слой силикагеля и растворитель упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент этилацетат—гептан, 3 : 1). Фракции с R_f 0,33 объединяют и упаривают. Получают 180 мг (36%) бензгидрилового эфира 2-[4-(2-бензотиазолилтио)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (VIIIa), который без специальной очистки используют в последующей реакции. Спектр ПМР (CDCl_3): 1,75 (3H, с, CH_3); 3,13 (1H, д, д, $J = 16$, $J = 2$, C₃-H_{транс}); 3,62 (1H, д, д, $J = 16$, $J = 5$, C₃-H_{цис}); 4,91 и 5,08 (2H, д, д, $J = 0,5$, C=CH₂); 4,97 (1H, с, NCHCOO); 5,73 (1H, д, д, $J = 2$, $J = 5$, C₄-H); 7,00 (1H, с, CHPh_2); 7,35 (10H, с, 2C₆H₅); 7,57...7,77 (4H, м, C₆H₄).

К раствору VIIa 180 мг (0,36 ммоль) в 3,0 мл уксусной кислоты и 0,5 мл воды добавляют KMnO_4 135 мг (0,84 ммоль). Полученную суспензию перемешивают при комнатной температуре 3 ч, охлаждают до 0 °C и избыток KMnO_4 восстанавливают 25% перекисью водорода. Раствор фильтруют, разбавляют 30 мл воды и экстрагируют 30 мл дихлорметана. Органическую фазу промывают 7% раствором NaHCO_3 , высушивают безводным Na_2SO_4 , дихлорметан упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент этилацетат—гептан, 1 : 3). Фракции с R_f 0,19 объединяют и упаривают. Получают 60 мг (31%) аморфного порошка с содержанием основного вещества >93%, согласно данным ВЭЖХ. Спектр ПМР (CDCl_3): 1,77 (3H, с, CH_3); 3,33 (1H, д, д, $J = 13$, $J = 5$, C₃-H_{транс}); 3,55 (1H, д, д, $J = 13$, $J = 3$, C₃-H_{цис}); 4,91 и 5,13 (2H, уш. с, уш. с, C=CH₂); 5,06 (1H, с, NCHCOO); 5,26 (1H, д, д, $J = 3$, $J = 5$, C₄-H); 6,84 (1H, с, CHPh_2); 7,31 (10H, с, 2C₆H₅); 7,51...8,22 (4H, м, C₆H₄). Найдено, % : C 62,99; H 4,63; N 5,04. $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$. Вычислено, % : C 63,14; H 4,53; N 5,26.

Бензгидриловый эфир 2-[4-(2-бензотиазолилтио)-2-оксо-3-хлоразетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (VIIIb) получают аналогично соединению VIIa из бензгидрилового эфира 2-[4-(2-бензотиазолилтио)-2-оксо-3-хлоразетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (IIIb) и трифенилфосфина. Выход 12%. $T_{\text{пл}}$ 118...119 °C. Спектр ПМР (CDCl_3): 1,82 (3H, с, CH_3); 5,00 (1H, с, NCHCOO); 5,06 (2H, д, $J = 0,5$, C=CH₂); 5,24 (1H, д, $J = 5$, C₄-H); 6,24 (1H, д, $J = 5$, C₃-H); 7,00 (1H, с, CHPh_2); 7,35 (10H, с, 2C₆H₅); 7,40...7,84 (4H, м, C₆H₄). Найдено, % : C 62,62; H 4,58; N 4,93. $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}_2$. Вычислено, % : C 62,85; H 4,33; N 5,24.

Бензгидриловый эфир сульфона 2β -(1-метилимидазолил-2-сульфонил)метил-2 α -метил-6,6-дигидропенам-3 α -карбоновой кислоты (IX) получают аналогично соединению VIII из бенз-

гидрилового эфира 2 β -(1-метилимидазолил-2-тио)метил-2 α -метил-6,6-дигидропенам-3 α -карбоновой кислоты. Получают 74 мг (33%) вещества с $T_{пл}$ 80...84 °C с содержанием основного вещества >96%, согласно данным ВЭЖХ. Спектр ПМР ($CDCl_3$): 1,46 (3H, с, CH_3); 3,48 (2H, м, C_6H_2); 3,91 (3H, с, NCH_3); 3,93, 4,08 (2H, AB-к, $J = 14$, CH_2); 4,60 (1H, м, C_5-H); 5,10 (1H, с, C_3-H); 6,93 (1H, с, $CHPh_2$); 6,95 (1H, уш. с, имидазол); 7,11 (1H, д, $J = 1$, имидазол); 7,38 (10H, м, $2C_6H_5$). Найдено, %: C 55,49; H 5,03; N 7,24. $C_{25}H_{25}N_3O_7S_2 \cdot 0,5CH_3COOC_2H_5$. Вычислено, %: C 55,18; H 4,96; N 7,15.

Бензгидриловый эфир сульфона 2 β -(бензотиазолил-2-сульфонил)метил-2 α -метил-6,6-дигидропенам-3 α -карбоновой кислоты (XIa). К раствору бензгидрилового эфира 2-[4-(2-бензотиазолилдитио)-2-оксоазетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (IIIa) 340 мг (0,51 ммоль) в 14 мл смеси дихлорметана и нитрометана (1 : 1) добавляют 0,5 мл $BF_3 \cdot Et_2O$. Реакционную смесь выдерживают 24 ч при комнатной температуре и упаривают при пониженном давлении. Остаток 170 мг (49%) бензгидрилового эфира 2 β -(бензотиазолил-2-тио)метил-2 α -метил-6,6-дигидропенам-3 α -карбоновой кислоты (XIa) без специальной очистки окисляют $KMnO_4$ аналогично соединению Va. Выход 54%. $T_{пл}$ 170...171 °C. Спектр ПМР ($CDCl_3$): 1,52 (3H, с, CH_3); 3,48 (2H, м, C_6-H_2); 3,90, 4,15 (2H, AB-к, $J = 14$, CH_2SO_2); 4,59 (1H, д, д, $J = 2$, $J = 4$, C_5-H); 5,28 (1H, с, C_3-H); 6,85 (1H, с, $CHPh_2$); 7,15...7,44 (10H, м, $2C_6H_5$); 7,48...8,28 (4H, м, C_6H_4). Найдено, %: C 56,55; H 4,14; N 4,64. $C_{28}H_{24}N_2O_7S_3$. Вычислено, %: C 56,36; H 4,05; N 4,68.

Бензгидриловый эфир сульфона 2 β -(бензотиазолил-2-сульфонил)метил-2 α -метил-6 α -хлорпенам-3 α -карбоновой кислоты (XIб) получают аналогично соединению XIa из бензгидрилового эфира 2-[4-(2-бензотиазолилдитио)-2-оксо-3-хлоразетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (IIIб). Выход 7%. $T_{пл}$ 57...59 °C. Спектр ПМР ($CDCl_3$): 1,37 (3H, с, CH_3); 3,67, 4,13 (2H, AB-к, $J = 14$, CH_2S); 5,04 (1H, с, C_3-H); 5,13 (1H, д, $J = 1$, C_5-H); 5,40 (1H, д, $J = 1$, C_6-H); 7,00 (1H, с, $CHPh_2$); 7,22...8,00 (14H, м, $2C_6H_5$, C_6H_4). Найдено, %: C 53,43; H 4,03; N 4,15. $C_{28}H_{23}ClN_2O_7S_3$. Вычислено, %: C 53,28; H 3,67; N 4,43.

Бензгидриловый эфир сульфона 2 α -метил-2 β -хлорметил-6,6-дигидропенам-3 α -карбоновой кислоты (XIIIa), бензгидриловый эфир сульфона 2 α -метил-2 β -хлорметил-6 α -хлорпенам-3 α -карбоновой кислоты (XIIIб) и бензгидриловый эфир сульфона 2 β -бромметил-2 α -метил-6 α -хлорпенам-3 α -карбоновой кислоты (XIIIв) синтезированы согласно методу, приведенному в работе [3].

2 β -(Бензотиазолил-2-тио)метил-2 α -метил-6 α -хлорпенам-3 α -карбоновая кислота (XIV). Раствор трет-бутилового эфира 2-[4-(бензотиазолил-2-дитио)-2-оксо-3-хлоразетидинил-1]-2-(изопропенил)уксусной кислоты (IIIв) 100 мг (0,21 ммоль) в 2 мл трифторуксусной кислоты выдерживают 1 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривают. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент хлороформ—этанол, 2 : 1). Фракции с R_f 0,50 объединяют и упаривают. Получают 26 мг (32%) с содержанием основного вещества >93%, согласно данным ВЭЖХ. Спектр ПМР ($CDCl_3$): 1,64 (3H, с, CH_3); 3,64, 4,00 (2H, AB-к $J = 14$, CH_2S); 4,93 (1H, с, C_3-H); 5,00 (1H, д, $J = 0,5$, C_5-H); 5,33 (1H, д, $J = 0,5$, C_6-H); 7,20...7,77 (4H, м, C_6H_4); 9,77 (1H, с, $COOH$).

Бензгидриловый эфир сульфона 3 α -метил-3 β -хлор-7 α -хлорцефам-4 α -карбоновой кислоты (XVI). Смесь, состоящую из 1 мл ацетонитрила, 1 мл воды и 170 мг (0,17 ммоль) бензгидрилового эфира 2 α -метил-2 β -хлорметил-6 α -хлорпенам-3 α -карбоновой кислоты (XIIIб) [3] нагревают при 78...80 °C 8 ч, разбавляют 30 мл воды и промывают 30 мл хлористого метилена. Органическую фазу сушат безводным Na_2SO_4 , растворитель упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент этилацетат—гептан, 1 : 2). Получают 76 мг (44%) бензгидрилового эфира 3 α -метил-3 β -хлор-7 α -хлорцефам-4 α -карбоновой кислоты (XV), который без специальной очистки окисляют $KMnO_4$ аналогично соединению Va. Выход 54%. $T_{пл}$ 159...160 °C с содержанием основного вещества >91%, согласно данным ВЭЖХ. Спектр ПМР ($CDCl_3$): 1,44 (3H, с, CH_3); 3,22, 3,69 (2H, д, д, $J = 2$, $J = 15$, C_7-H_2); 3,33, 3,77 (2H, д, д, $J = 15$, C_2-H_2); 4,80 (1H, с, C_4-H); 4,89, 4,93 (1H, д, д, $J = 2$, $J = 5$, C_6-H); 6,95 (1H, с, $CHPh_2$); 7,37 (10H, с, $2C_6H_5$).

Смесь бензгидрилового эфира 2-оксо-3-хлоразетидинил-1- α -(изопропил)уксусной кислоты (XVIII) и бензгидрилового эфира 2-оксо-3-хлоразетидинил-1- α -(1-метилэтенил)уксусной кислоты (XIX). К раствору бензгидрилового эфира 6 α -хлорпенициллановой кислоты 150 мг, (0,37 ммоль) в 5 мл этанола добавляют четверть чайной ложки свежеприготовленного никеля Ренея в этаноле. Смесь кипятят 20 мин, охлаждают, фильтруют и растворитель упаривают при пониженном давлении. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем (элюент этилаце-

тат—гексан, 1 : 4). Фракции с R_f 0,22 объединяют, упаривают. Получают 20 мг (21%) маслообразного вещества, согласно данным ВЭЖХ, содержащего 66% бензгидрилового эфира 2-оксо-3-хлоразетидинил-1- α -(изопропил)уксусной кислоты (XVIII). Спектр ПМР ($CDCl_3$): 0,84 (3H, д, $J=1,5$, CH_3); 0,95 (3H, д, $J=1,5$, CH_3); 2,0...2,46 (1H, м, $CHMe_2$); 3,15...3,64 (2H, м, C_4-H_2); 6,86 (1H, с, $CHPh_2$); 7,28 (10H, с, $2C_6H_5$). Содержание в смеси бензгидрилового эфира 2-оксо-3-хлоразетидинил-1- α -(1-метилэтил)уксусной кислоты (XIX) согласно данным ВЭЖХ составляет 33%. Спектр ПМР ($CDCl_3$): 1,75 (3H, с, CH_3); 3,15...3,64 (2H, м, C_4-H_2); 6,86 (1H, с, $CHPh_2$); 7,28 (10H, с, $2C_6H_5$). (В спектрах ПМР приведены только те значения химических сдвигов, которые позволяют однозначно охарактеризовать протоны, входящие в состав молекул XVIII и XIX):

Биологические тесты. Цитотоксические свойства соединений были изучены на культурах монослойных опухолевых клеток, культивированных в 96 луночных панелях в стандартной среде без индикатора и антибиотиков, согласно методике [9]. Количество живых клеток определялось двумя независимыми колориметрическими методами по интенсивности окрашивания клеточных мембран кристаллическим фиолетовым и митохондриальных энзимов бромидом 3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия, характеризующей интенсивность их окислительно-восстановительных свойств.

Специфическая NO генерирующая способность тестируемых веществ (TG_{100}), экстраполирующая этот показатель для 100% живых клеток, вычислялась с помощью уравнения:

$$TG_{100} = G_{EX} \cdot 100 / C \text{ (нмоль} \cdot 10^{-1} / 200 \text{ мкл)}$$

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 [10]; C — процент живых клеток после инкубации с 50 мкг/мл тестируемого вещества определенный по интенсивности окрашивания клеточных мембран кристаллическим фиолетовым [9].

Контрольные клетки (без тестируемых веществ) культивировались на отдельной панели.

Авторы выражают признательность Латвийскому совету по науке за финансирование работы (грант № 708), а также компании Taiho Pharmaceutical Co. за безвозмездное предоставление 6-аминопенициллановой кислоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Veinberg G., Shestakova I., Grigan N., Musel D., Kanep I., Domrachova I., Grigoryeva V., Zharkova O., Turowskis I., Kalvinsh I., Strakovs A., Lukevics E. // *Europ. J. Med. Chem.* (accepted for publication).
2. Micetich R. G., Maiti S. N., Spevak P., Tanaka M., Yamazaki T., Ogawa K. // *Synthesis*. — 1986. — P. 292.
3. Pat. 58. 04788 JP / Taiho Pharmaceutical Co., Ltd. // *C. A.* — 1983. — Vol. 98. — 197889.
4. Micetich R. G., Maiti S. N., Tanaka M., Yamazaki T., Ogawa K. // *Heterocycles*. — 1985. — Vol. 23. — P. 325.
5. Prasad K., Schulz G., Hamberger H., Stutz P. // *Heterocycles*. — 1982. — Vol. 19. — P. 291.
6. Danelon G. O., Mata E. G., Mascaretti O. A. // *Bioorg. Med. Chem. Let.* — 1995. — Vol. 5. — P. 2037.
7. Wei C.-C., Weigle M. // *Synthesis*. — 1983. — P. 287.
8. Kerwin J. F. Jr., Lancaster F. R. Jr., Feldman P. L. // *J. Med. Chem.* — 1995. — Vol. 38. — P. 4343.
8. Freshley P. J. // *Culture of Animal Cells (A Manual of Basic Technique)*. — New York: Wiley-Liss, 1994. — P. 296.
10. Fast D. J., Lynch R. C., El R. W. J. // *Leuckocyt. Biol.* — 1992. — Vol. 52. — P. 255.