

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

Irina POTOROČINA

Ķīmijas doktora programmas doktorante

**BIOLOĢISKI AKTĪVU
7-ALKILIDĒN-1,1-DIOKSOCEF-3-ĒM-4-KARBONSKĀBJU
ATVASINĀJUMU SINTĒZE**

Promocijas darba kopsavilkums

**THE SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE
7-ALKYLIDENE-1,1-DIOXOCEPH-3-EM-4-CARBOXYLATE
DERIVATIVES**

Summary of doctoral theses

Zinātniskais vadītājs

Dr. habil. chem.

G.VEINBERGS

Rīga 2011

UDK

Potoročina I. Bioloģiski aktīvu 7-alkilidēn-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābju atvasinājumu sintēze. Promocijas darba kopsavilkums.-R.:RTU, 2011.-32 lpp.

Iespiests saskaņā ar MLĶF 2011.gada
..... lēmumu, protokols Nr.....

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu Nacionālās programmas „Atbalsts doktorantūras pētījumiem” projekta „Atbalsts RTU doktorantūras attīstībai” ietvaros.

ISBN

PROMOCIJAS DARBS

IZVIRZĪTS RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTĒ ĶĪMIJAS DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI

Promocijas darbs ķīmijas doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2011.g. Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultatē, Āzenes ielā 14/24, 271. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Asoc. prof. Māris Turks (RTU)

Prof. Andris Zicmanis (LU)

Dr. ķīm. Aivars Krauze (LOSI)

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi doto promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē ķīmijas doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs nav iesniegts nevienā citā universitātē zinātniskā grāda iegūšanai.

Irina Potoročina (Paraksts)

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, satur ievadu, literatūras apskatu, rezultātu izvērtējumu, eksperimentālo daļu, secinājumus, literatūras sarakstu, 11 pielikumus, kopā 144 lappuses. Literatūras sarakstā ir 72 literatūras avoti.

IEVADS

Tēmas būtība un aktualitāte. Kopš 20. gs. 40. gadiem, kad tika atklātas un medicīnas praksē plaši ieviestas antibiotikas, kardināli paaugstinājās infekcijas slimību ārstēšanas efektivitāte. Pirmais un galvenais šo bioloģiski aktīvo vielu pārstāvis bija penicilīns. Vēlāk uz penicilīna bāzes tika izstrādāta antibiotiku terapijas eksperimentālā un teorētiskā koncepcija, kuras pamatā ir mikroorganismu metabolisma produktu izmantošana infekcijas slimību ārstēšanā.

Atšifrējot penicilīna struktūru, tika konstatēta unikālā β -laktāma heterocikla loma antibiotiku antibakteriālās iedarbības mehānismā molekulārā līmenī, kā arī ar rezistentu baktēriju izraisītais preparāta inaktivācijas mehānisms. Abu mehānismu apzināšana ļāva īstenot efektīvu baktēriju rezistences apkarošanas stratēģiju, medicīnas praksē izmantojot citas penicilīnam radnieciskās β -laktāmciklu saturošas antibiotikas: cefalosporīnu, karbapenēmu, penēmu u.c., kā arī modificējot minēto savienojumu struktūru. Rezultātā tika radīti preparāti ar uzlabotām farmakoloģiskām īpašībām, to skaitā ar paplašinātu antibakteriālo spektru un izturību pret rezistentām baktērijām.

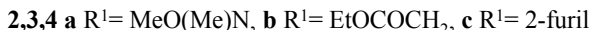
20. gs. 80. gadu beigās tika atklāti cefalosporīna atvasinājumi ar pretiekaisuma aktivitāti. Tos ieguva, esterificējot antibiotikas karboksilgrupu, oksidējot heterociklisko sēra atomu un aizvietojot acilaminogrupu pie C(7)-atoma ar hlora atomu vai metoksigrupu. Konstatēts, ka molekulārā līmenī šo savienojumu darbības mehānisma pamatā ir cilvēka leukocitārās elastāzes inhibēšana. Pētījumu rezultātā tika atklāti savienojumi ar pretvīrusu, pretvēža, antikoagulantu un citām aktivitātēm, kuru iedarbības mehānisma pamatā ir serīna vai cisteīna proteāžu inhibēšana, kas liecina par β -laktāma cikla unikālo farmakoloģisko potenciālu.

Darba mērķi. Ņemot vērā iepriekšējos OSI pētījumu rezultātus antibiotiku ķīmijā, mēs uzskatījām, ka nepieciešams sintezēt jaunus 7-alkilidēnaizvietoto cefalosporīnu un 6-alkilidēnaizvietoto penicilīnu atvasinājumus un izzināt to struktūras-bioloģiskās aktivitātes sakarības, kas tālākā nākotnē ļautu radīt perspektīvus pretvēža savienojumus un β -laktamāzes inhibitorus.

Šī mērķa sasniegšanai iepļānojām jaunu 7-(2-oksoalkilidēn)-, 7-arilmetilidēn-3-metil-1,1-diokso-cef-3-ēm-4-karbonskābes, 7-(1-formil-1-alkilidēn)-3-metil-cef-3-ēm-4-karbonskābes, 6-(2-oksoalkilidēn)- un 6-(2-arilmetoksiiminopropilidēn)-1,1-dioksopenicilānskābes *terc*-butilesteru struktūratvasinājumu sintēzi, to pretvēža skrīningu un β -laktamāzes inhibējošo īpašību testēšanu *in vitro*.

1. 7-(2-OKSOALKILIDĒN)-CEFĒMU IEGŪŠANA

Jauni 7-(*N*-metil-*N*-metoksikarbamoilmetilidēn)-, 7-(3-etoksikarbonil-2-hidroksiprop-2-enilidēn)- un 7-(2-okso-2-(2-furil)-etilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *terc*-butilesteri **4a-c** iegūti, kondensējot 7-okso-3-metil-cef-3-ēm-4-karbonskābes *terc*-butilesteri (**1**) ar *N*-metil-*N*-metoksikarbamoilmetilidēn(trifenil)fosforānu (**2a**), 3-etoksikarbonil-2-oksopropilidēn(trifenil)fosforānu (**2b**) un 2-(2-furil)-2-oksoetilidēn(trifenil)fosforānu (**2c**) un tālāk starpproduktus **3a-c** oksidējot ar 3-hlorperoksibenzoskābi (MCPBA).

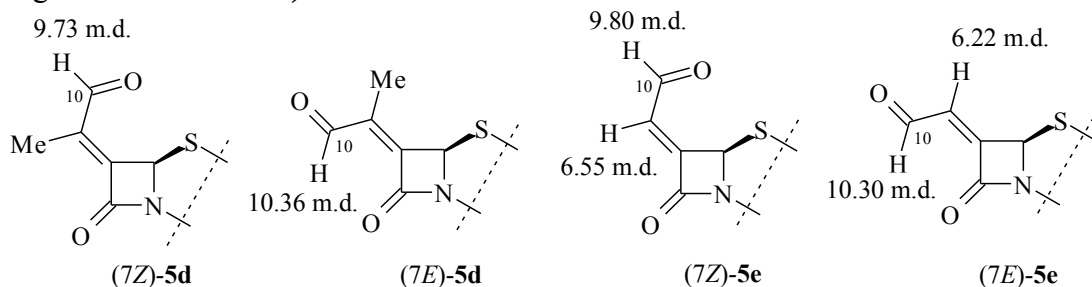


Chemical structures of keto-4b and enol-4b are shown, illustrating the tautomeric equilibrium between the two forms. The keto form (left) features a carbonyl group at C10 and an ethoxycarbonyl group at C11. The enol form (right) shows the tautomeric shift, with the carbonyl oxygen at C10 replaced by a hydroxyl group (OH) and the ethoxycarbonyl group at C11. The chemical shifts for the enol form are indicated: 5.51 ppm for H11 and 11.67 ppm for the OH group.

[illegible]

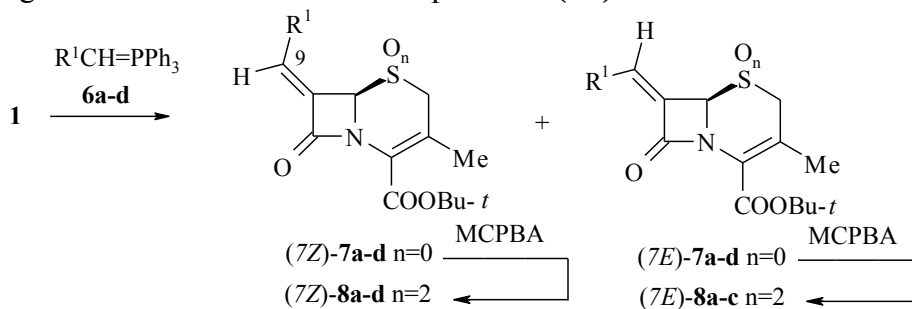
4

m.d.), salīdzinot ar attiecīgajām protonu nobīdēm (7Z)-**5d,e** izomēros (ķīmiskās nobīdes attiecīgi 9.73 un 9.80 m.d.):



3. 7-ARILMETILIDĒN- UN 7-HETERILMETILIDĒNCEFĒMU IEGŪŠANA

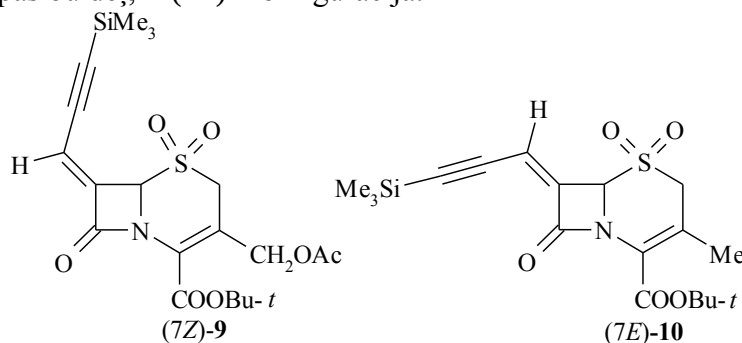
Kondensējot 7-okso-3-metilcef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteri (**1**) ar alkilidēn(trifenil)fosforāniem **6a-d** pēc Vitiga metodes, tika iegūti jauni 7-arilmetilidēn- un 7-(2-furil)metilidēnaizvietotie cefēmi **7a-d**. Tie veidoja hromatogrāfiski nesadalāmu (7Z)- un (7E)-izomēru maisījumu, kuru varēja sadalīt pēc cefēmu **7a-d** oksidēšanas līdz sulfoniem **8a-d**. Individuālo stereoizomēru struktūras pierādīšanai tika izmantoti atbilstošo cefēmu **7,8 a-d** ¹H KMR spektru dati. (7Z)-Izomēros β-laktāma karbonilgrupas dezekranējošā efekta dēļ cefēmu (7Z)-**7,8a-d** C(9) protona signāla ķīmiskā nobīde ir vājākos laukos, salīdzinot ar attiecīgo (7E)-**7a-d** un (7E)-**8a-c** izomēru signāliem. (7E)-(2-Furil)metilidēnaizvietotā cefēma (<10%) saturs (7E)- un (7Z)-izomēru maisījumā **7d** tika noteikts, salīdzinot izomēru C(9) protona integrālās intensitātes. Oksidēšanas produktu (7E)-**8d** individuāli neizdevās iegūt.



a R¹ = 4-ClC₆H₄, b R¹ = 4-NCC₆H₄, c R¹ = 2-BrC₆H₄, d R¹ = 2-furil

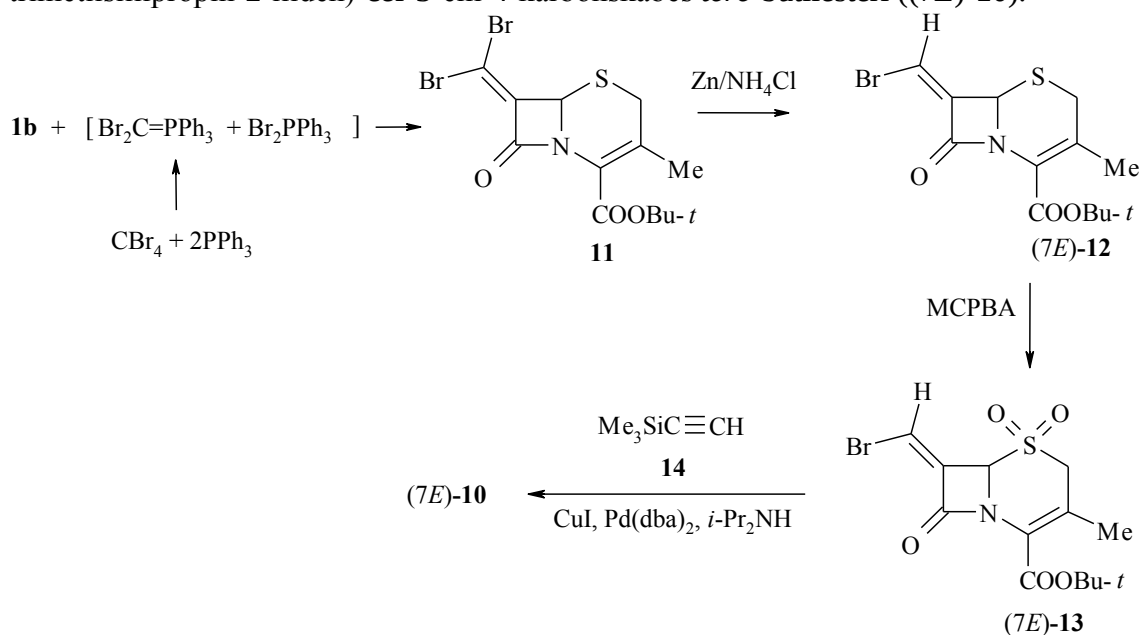
4. SELEKTĪVA (7E)-ALKILIDĒNCEFĒMU IEGŪŠANA

Agrāk veiktajos OSI pētījumos tika konstatēts, ka 3-acetoksimetil-7-(3-trimetilsililpropīn-2-ilidēn)-cef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesterim **9**, Vitiga reakcijas stereospecifisko īpašību dēļ, ir (7Z)- konfigurācija.

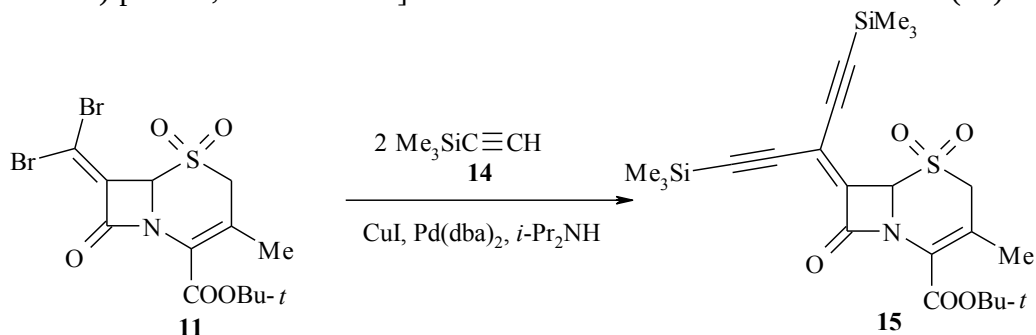


Lai iegūtu savienojuma **10** (7E)-izomēru, tika izmantota reģioselektīva 7-alkilidēncefalosporīnu (E)-izomēru iegūšanas metode, kura ietvēra sekojošas stadijas:

- 3-metil-7-oksocef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilestera (**1**) pārvēršana 7-dibrommetilidēn-3-metilcef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesterī (**11**);
- 7-dibrommetilidēncefēma **11** stereoselektīva debromēšana ar cinku NH_4Cl šķīdumā līdz (7*E*)-brommetilidēncefēmam **12**;
- (7*E*)-brommetilidēncefēma (7*E*)-**12** oksidēšana līdz sulfonam (7*E*)-**13**;
- (7*E*)-brommetilidēn-1,1-dioksocefēma (7*E*)-**13** reakcijā ar trimetilsililacetilēnu (**14**) *Sonogashiras* reakcijas apstākļos, deva iespēju iegūt 3-metil-1,1-diokso-(7*E*)-(3-trimetilsililpropīn-2-ilidēn)-cef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteri ((7*E*)-**10**).

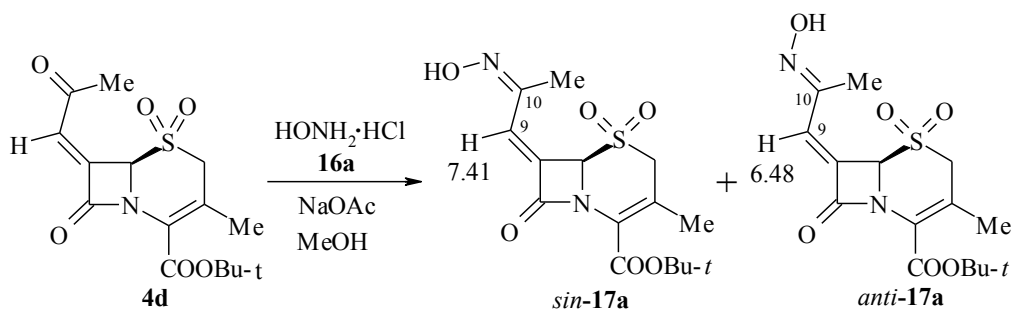


Augstāk minētā 7-dibrommetilidēncefēma **11** sametināšanas reakcija ar diviem ekvivalentiem trimetilsililacetilēna (**14**) deva iespēju sintezēt 3-metil-1,1-diokso-7-[1,5-bis(trimetilsilil)-penta-1,4-diēn-3-ilidēn]-cef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteri (**15**):



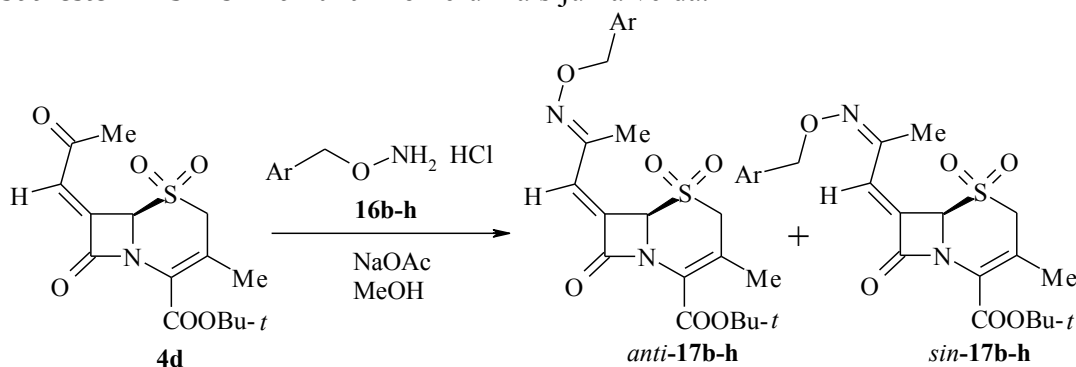
5. 7-(2-OKSIIMINOALKILIDĒN)-CEFĒMU IEGŪŠANA

(7*Z*)-(2-Hidroksiiminopropilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteris **17a** *sin*- un *anti*-izomēru maisījuma veidā tika iegūts, apstrādājot (7*Z*)-(2-oksopropilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteri (**4d**) ar hidroksilamīna hidrogēnchlorīdu (**16a**) nātrija acetāta klātbūtnē.



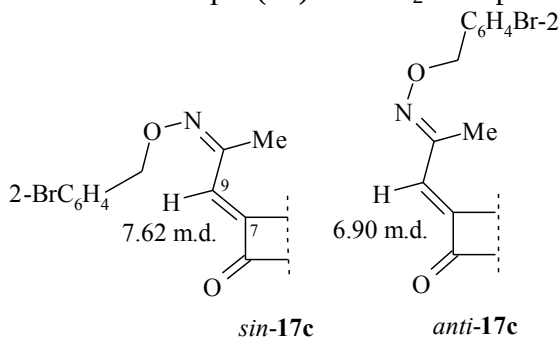
Sin-17a un *anti-17a* izomēru struktūras identificēšanai tika izmantota ^1H - ^1H NOESY metode. Savienojuma *sin-17a* spektrā ir krosipīķis starp C(9) un HO-N= protoniem un tādējādi *sin-17a* izomērā novēro C(9) protona signāla nobīdi vājākā laukā (7.41 m.d.), salīdzinot ar atbilstošo *anti-17a* izomēra signālu (6.48 m.d.). Savienojuma *17a* *anti*-izomēram Overhauzera efektu novēro starp C(10) un HO-N= protoniem.

Apstādājot **4d** ar arilmetoksiamīnu hidrogēnhlorīdiem **16b-h** nātrija acetāta klātbūtnē, tika iegūti (7*Z*)-(2-arilmetoksiiminopropilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteri **17b-h** *sin*- un *anti*-izomēru maisījuma veidā.

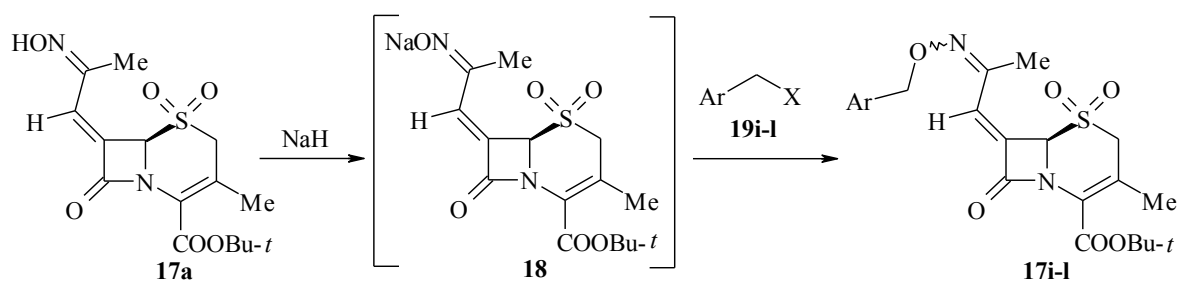


16, 17 b Ar = Ph, **c** Ar = 2-BrC₆H₄, **d** Ar = 3-BrC₆H₄, **e** Ar = 4-BrC₆H₄,
f Ar = 2-ClC₆H₄, **g** Ar = 2-FC₆H₄, **h** Ar = 2-CF₃C₆H₄;

Savienojumu **17b,c,f-h** *sin*- un *anti*-izomēri tika sekmīgi sadalīti ar kolonnas hromatogrāfijas palīdzību. Atbilstošo izomēru struktūras identificēšanai izmatota ^1H KMR spektroskopija, ņemot par paraugu cefēmu **17c**, kuru *sin*- un *anti*-izomēru raksturojumam izmantota ^1H - ^1H NOESY metode. Savienojuma *sin-17c* spektrā ir krosipīķis starp C(9) un -CH₂ON= protoniem, kā rezultātā novēro C(9) protona signāla nobīdi vājākā laukā (7.62 m.d.), salīdzinot ar attiecīgo *anti*-izomēra signālu (6.90 m.d.). Savienojuma **17c** *anti*-izomēra gadījumā Overhauzera efektu novēro starp C(10) un -CH₂ON= protoniem.



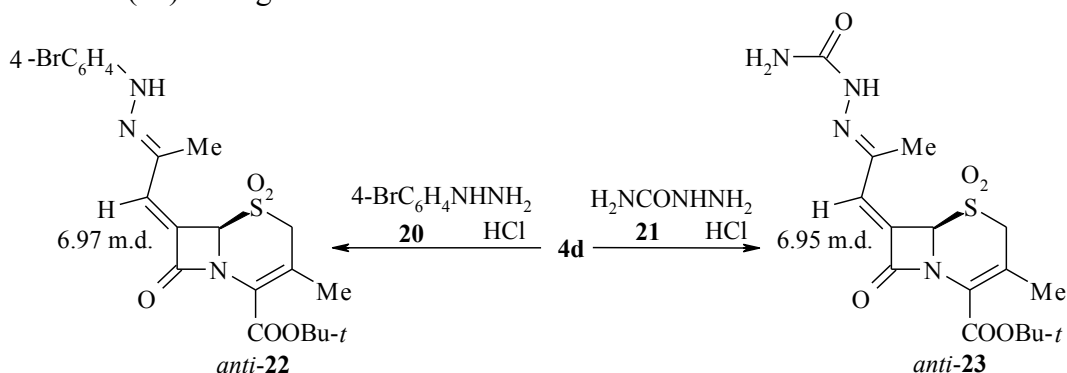
Aizvietojot (7*Z*)-(2-hidroksiiminoksopropilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilestera (**17a**) hidroksiiminogrupas protonu ar nātriju un tālāk alkilējot **18** pie skābekļa ar arilmetilbromīdiem **19i,j** un 3- un 4-piridilmetilhlorīdiem **19k,l**, iegūti jauni (7*Z*)-(2-arilmetoksiimino)- un (7*Z*)-(piridilmetiloksiiminopropilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteri **17i-l**.



17, 19 i Ar = 2,6-Cl₂C₆H₃, **j** Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃, **k** Ar = 3-Py, **l** Ar = 4-Py,

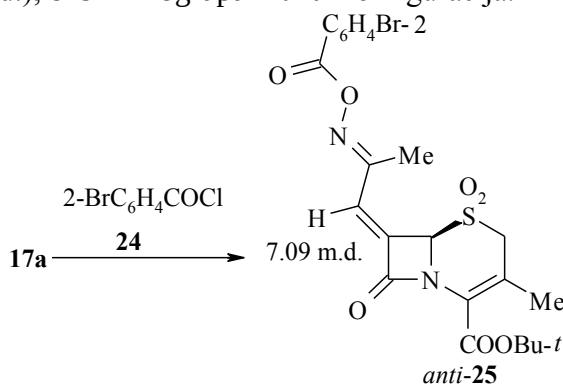
19 i,j X = Br; **19 k,l** X = Cl

Lai noskaidrotu stuktūras-aktivitātes īpatnības, kas saistītas ar cefēmu **17c** un **17e** arilmetoksiimino-fragmenta modificēšanu, 3-metil-1,1-diokso-(7*Z*)-(2-oksopropilidēn)-cef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteris (**4d**) tika kondensēts ar 4-bromfenilhidrazīna (**20**) un semikarbazīda (**21**) hidroģēnhlorīdiem.

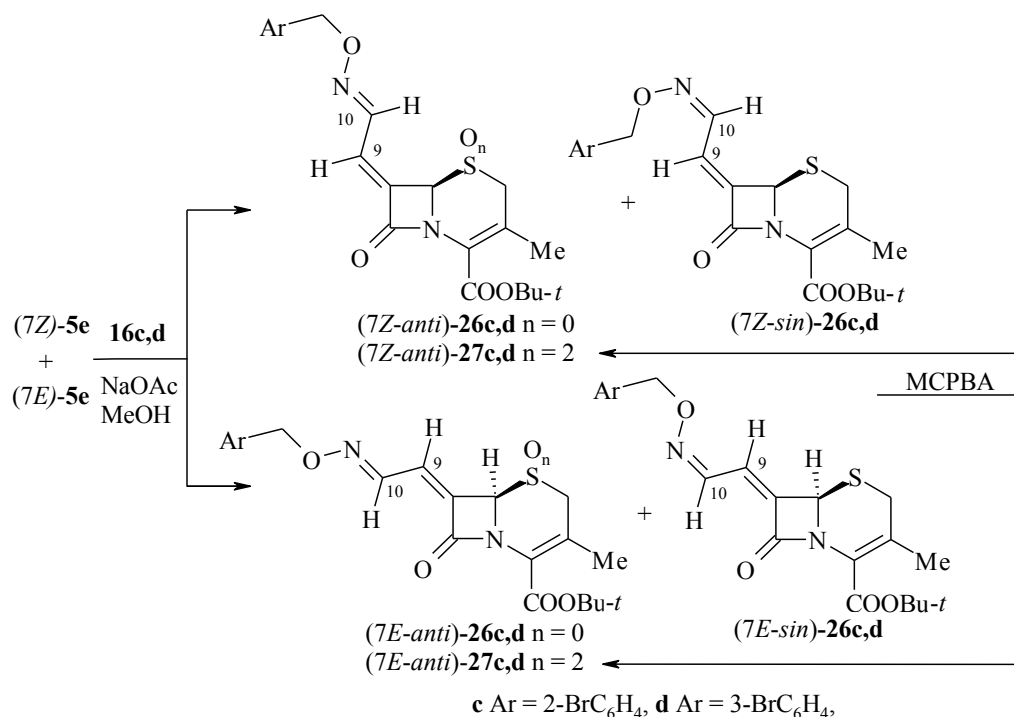


Rezultātā tika iegūti 4-bromfenilhidrazons **22** un semikarbazons **23** ar *anti*-konfigurāciju. Par šādu konfigurāciju liecina C(9) protona signāli pie 6.97 m.d un 6.95 m.d, kuru atrašanās vieta ¹H KMR spektros sakrīt ar *anti*-cefēmu **17a-k** C(9) protonu signālu nobīdēm.

Acilējot (7*Z*)-(2-hidroksiiminopropilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteri (**17a**) ar 2-brombenzoscābes hlorīdu **24**, sintezēts (7*Z*)-[2-*anti*-(2-brombenzoiloksiimino)-propilidēn]-cefēms **25**, kurā, spriežot pēc C(9) protona signāla atrašanās vietas (7.09 m.d.), oksiiimino grupa ir *anti*-konfigurācijā.



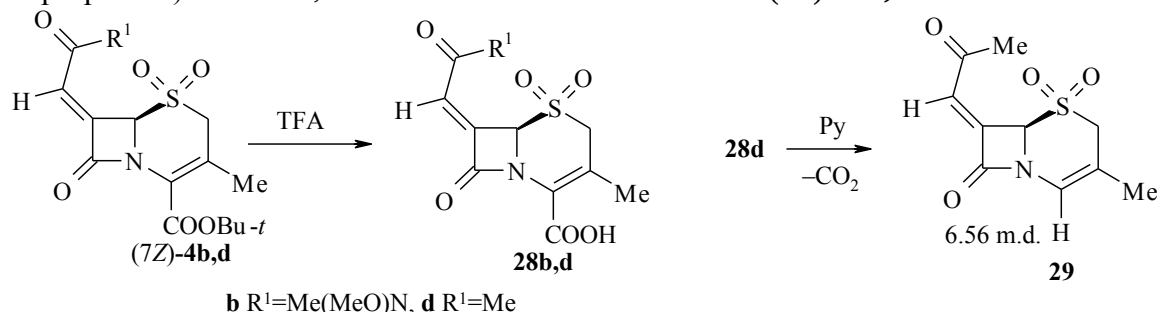
Kondensējot 7-(1-formilmetilidēn)-3-metilcef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesterus (7*Z*)-**5e** un (7*E*)-**5e** ar arilmetoksiamīnu hidroģēnhlorīdiem **16c,d** nātrija acetāta klātbūtnē, tika iegūti (7*Z*)- un (7*E*)-(2-arilmetoksiiminoetilidēn)-cefēmi kā *anti*- un *sin*-stereoizomēru maisījums: (7*Z-anti*)-**26c,d**, (7*Z-sin*)-**26c,d** un (7*E-anti*)-**26c,d**, (7*E-sin*)-**26c,d**.



Sintezēto cefēmu formilgrupas pārvēršana arilmetoksiiminogrupā radīja priekšnoteikumus sēra atoma oksidēšanai līdz sulfonam, izmantojot MCPBA. Pēc hromatogrāfiskās sadalīšanas no reakcijas maisījuma tika izdalīti tikai cefēmi ar *anti*-konfigurāciju: (7*Z-anti*)-27c,d un (7*E-anti*)-27c,d. 2-Arilmetoksiiminoetilēngrupas struktūras identificēšana cefēmos (7*Z-anti*)-27c,d un (7*E-anti*)-27c,d tika veikta, salīdzinot sintezēto cefēmu 9-H un 10-H protonu ķīmiskās nobīdes ar izejsavienojuma 5e (7*Z*)- un (7*E*)-izomēru atbilstošajiem protonu signāliem, kā arī ar C(9) protona signāla nobīdēm cefēmā 17c atkarībā no arilmetoksiiminogrupas *anti*- un *sin*-konfigurācijas.

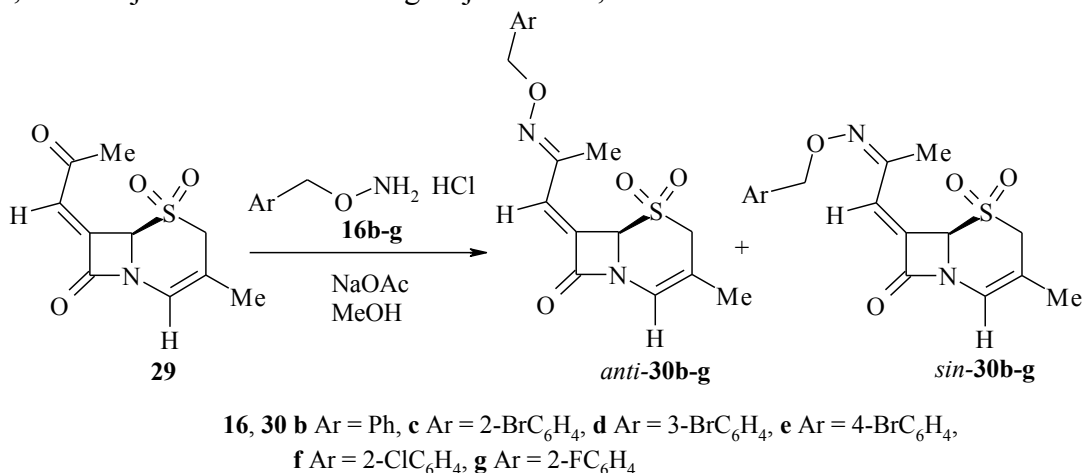
6. 7-ALKILIDĒNCEFĒM-4-KARBONSKĀBJU UN DEKARBOKSILĒTO 7-ARILMETOKSIIMINOAIZVIETOTO ATVASINĀJUMU IEGŪŠANA

Apstrādājot 7-alkilidēn-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesterus (7*Z*)-4b,d ar trifluoretiķskābi dihlormetāna šķīdumā 0°C temperatūrā, notika estera grupas atšķelšanās, veidojot (7*Z*)-(N-metil-N-metoksikarbamoilmetilidēn)- un (7*Z*)-(2-oksopropilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes (7*Z*)-28b,d.



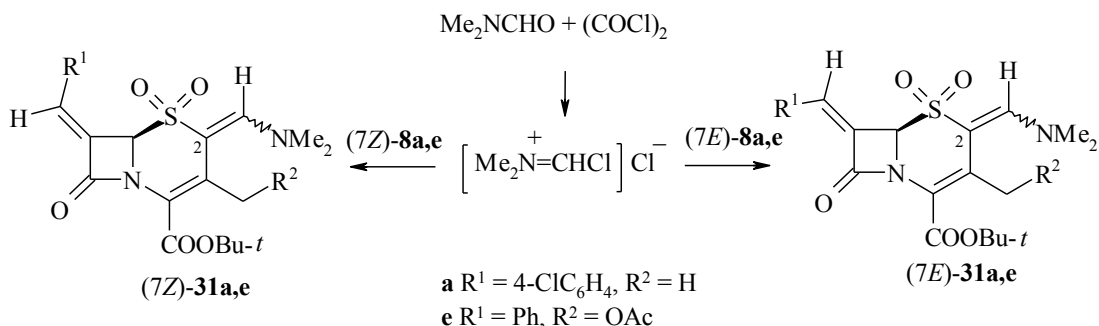
Piridīna pievienošana 3-metil-1,1-diokso-(7*Z*)-(2-oksopropilidēn)-cef-3-ēm-4-karbonskābes (28d) acetonitrila šķīdumam iniciēja dekarboksilēšanas reakciju, kā rezultātā radās 3-metil-1,1-diokso-(7*Z*)-(2-oksopropilidēn)-cef-3-ēms (29), kura ¹H KMR spektrā redzams C(4) protona signāls pie 6.56 m.d.

Kondensējot cefēmu **29** ar arilmetoksiamīnu hidrogēnhlorīdiem **16b-g** nātrija acetāta klātbūtnē, tika iegūti (7*Z*)-(2-arilmetoksiiminopropilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēmi **30b-h**, kurus, izmantojot kolonnas hromatogrāfijas metodi, izdevās sadalīt *sin*- un *anti*-izomēros.

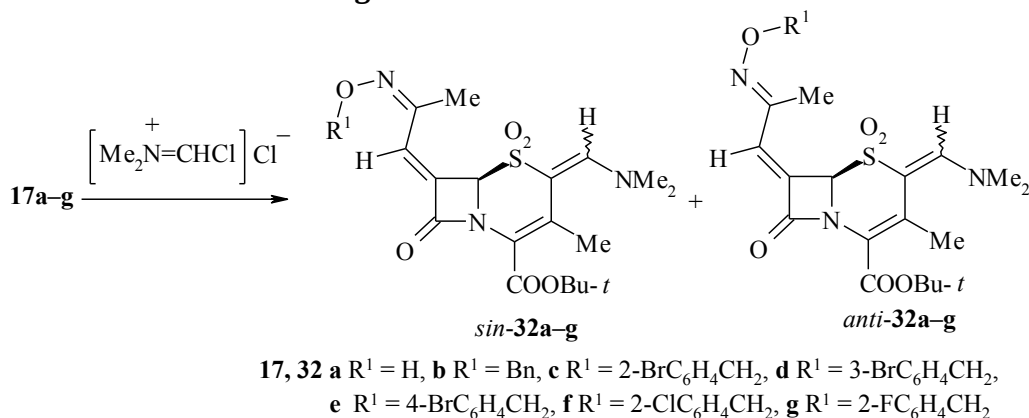


7. 7-ALKILIDĒNCEFĒMU MODIFICĒŠANA AR *N,N*-DIMETILAMINOMETILIDĒNGRUPU

N,N-Dimetilaminometilidēngrupas ievadišana 7-(4-hlorfenil)-metilidēn-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilestera (7*Z*)-**8a** un (7*E*)-**8a** izomēru C(2) stāvoklī veikta ar *N,N*-dimetilformilimīnija hlorīdu (Vilsmeijera reaģents). Rezultātā radās 2-*N,N*-dimetilaminometilidēnaizvietotie cefēmi (7*Z*)-**31a,e** un (7*E*)-**31a,e**.

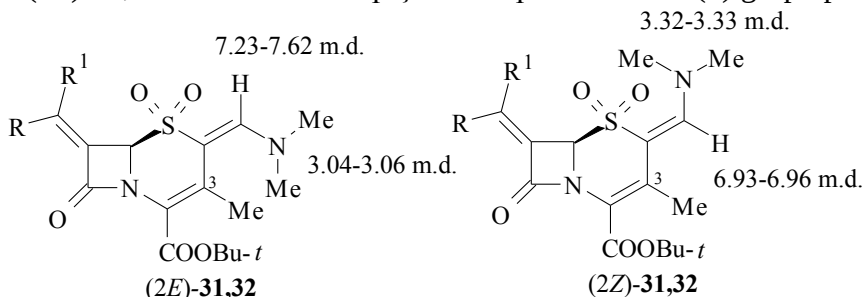


Analoģiski uz (7*Z*)-(2-oksiiminopropilidēn)-cefēmu **17a-g** bāzes, tika sintezēti 3-metil-2-*N,N*-dimetilaminometilidēn-1,1-diokso-(7*Z*)-(2-arilmetoksiiminopropilidēn)-cef-3-ēm-4-karbonskābes *tert*-butilesteri **32a-g**.



Sin- un *anti*- izomēru maisījumi **32b-g** tika sadalīti izmantojot kolonnas hromatogrāfijas metodi.

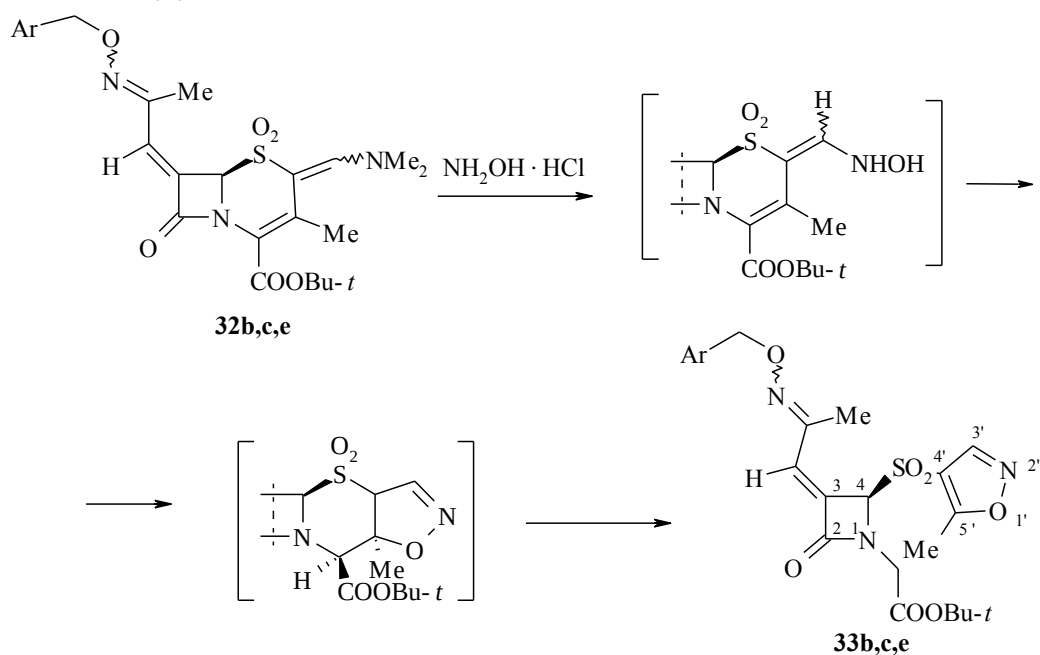
Savienojumu **31** un **32** ^1H KMR spektru analīze parādīja, ka veidojas (*2E*)- un (*2Z*)-izomēri ar (*E*)-izomēriem pārkumā. Ar ^1H - ^1H NOESY spektroskopijas palīdzību konstatēts, ka (*2E*)-**31,32** izomēru spektros tiek novērots Overhauzera efekts starp $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ un C(3) protoniem, bet (*2Z*)-**31,32** izomēriem krosipķis ir starp $=\text{CHN}$ un C(3) grupu protoniem.



Sakarā ar to cefēmu (*2E*)-**31,32** ^1H KMR spektros sulfona skābekļa dezekranējošā efekta dēļ, novēro $=\text{CHNMe}_2$ protona signāla nobīdi vājākā laukā (7.23-7.62 m.d.), (*2Z*)-izomēros šī protona signāla nobīde ir pie 6.93-6.96 m.d. Līdzīgi, sulfona skābekļa dezekranējošā efekta dēļ, (*2Z*)-izomēros tiek novērota NMe_2 grupas protonu signāla nobīde vājākā laukā pie 3.32- 3.33 m.d., attiecīgs signāls (*2E*)-izomēros ir pie 3.04-3.05 m.d.

8. 2-*N,N*-DIMETILAMINOMETILIDĒN-7-ALKILIDĒNCEFĒMU REAKCIJA AR HIDROKSILAMĪNU

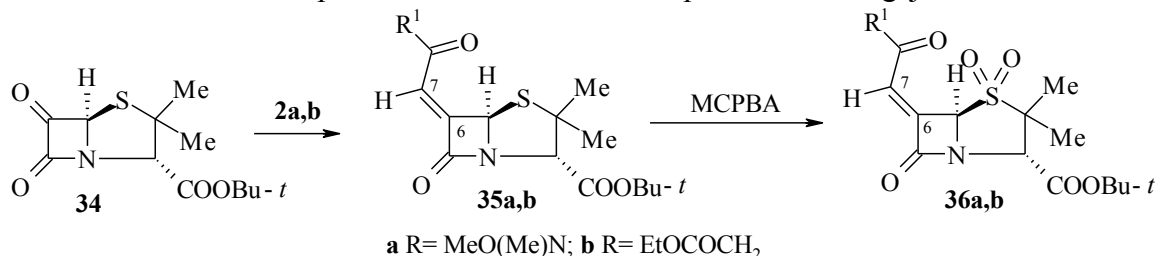
Apstrādājot 2-*N,N*-dimetilaminometilidēnaizvietotus 7-(2-arilmetoksiimino-propilidēn)-cefēmus **32b,c,e** ar hidroksilamīna hidrogēnhlorīdu acetonitrilā 40-50°C temperatūrā, tika panākta dimetilaminogrupas aizvietošanās ar hidroksilaminogrupu, kura tālāk pievienojās cefēma dubultsaitei, to šķēlot, un, galarezultātā radās 1-*tert*-butoksikarbonilmetil-4-(5'-metilizoksazol-4'-sulfonil)-3-(2-arilmetoksiiminopropilidēn)-azetidīn-2-oni **33b,c,e**.



b Ar = C_6H_5 , **c** Ar = 2- BrC_6H_4 , **e** Ar = 4- BrC_6H_4

9. 6-(2-OKSOALKILIDĒN)-PENICILĀNSKĀBES ATVASINĀJUMU IEGŪŠANA

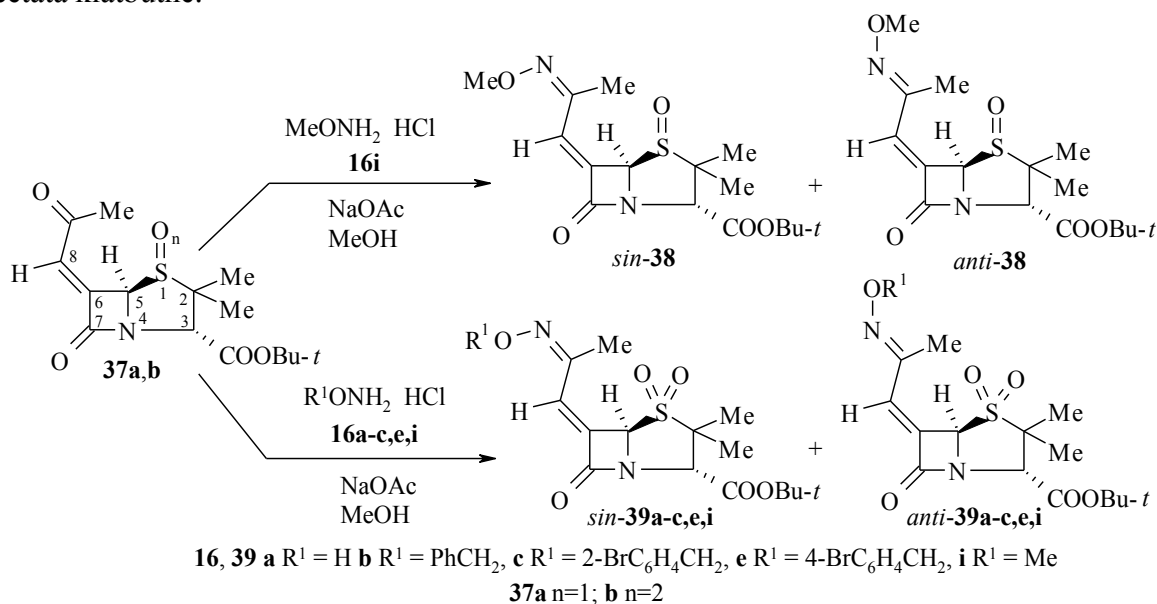
Izmantojot 6-oksopenicilānskābes *tert*-butilesteri (**34**) kā Vitiga reakcijas karbonilsaturošo komponentu un to kondensējot ar *N*-metil-*N*-metoksikarbamoilmetilidēn- un 3-etoksikarbonil-2-oksopropilidēn(trifenil)fosforāniem **2a,b**, iegūti 6-(*N*-metil-*N*-metoksikarbamoilmetilidēn)- un 6-(3-etoksikarbonil-2-oksopropilidēn)-penicilānskābes *tert*-butilesteri **35a,b** kas tālāk pēc oksidēšanas ar MCPBA pārvērsti attiecīgajos sulfonos **36a,b**.



Savienojumu **36a,b** ¹H KMR spektru analīze parādīja, ka sintezētie savienojumi ir līdzīgi atbilstošajiem cefēmiem **4a,b** un tiem ir (6*Z*)- konfigurācija.

10. 6-(2-OKSIIMINOPROPILIDĒN)-PENICILĀNSKĀBES ATVASINĀJUMU IEGŪŠANA

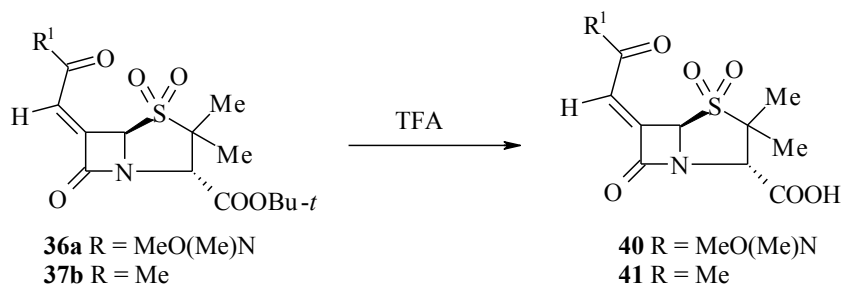
6-(2-Oksopropilidēn)-penicilānskābes *tert*-butilestera sulfoksīds **37a** un sulfons **37b** tika kondensēti ar hidroksi-, metoksi- un arilmetoksiamīnu hidroģēnhlorīdiem **16a-c,e,i** nātrija acetāta klātbūtnē.



Kondensācijas produkti **38** un **39a-c,e,i** tika izdalīti kā *sin*- un *anti*- izomēru maisījumi, no kuriem dažus ar kolonnas hromatogrāfijas metodi izdevās sadalīt.

11. 6-ALKILIDĒNPENICILĀNSKĀBES IEGŪŠANA

Apstrādājot 6-(*N*-metil-*N*-metoksikarbamoilmetilidēn)- un 2-oksopropilidēn-1,1-dioksopenicilānskābes *tert*-butilesterus **36a** un **37b** ar trifluoretiķskābi dihlormetāna šķīdumā pazeminātā temperatūrā, atšķēlās *tert*-butilestera grupa un rezultātā radās attiecīgie penicilānskābes atvasinājumi **40** un **41** ar brīvo karboksilgrupu.



12. SINTEZĒTO SAVIENOJUMU STRUKTŪRAS-AKTIVITĀTES SAKARĪBU ANALĪZE

Sintezēto cefalosporīna un penicilīna struktūranalogu bioloģiskie pētījumi tika veikti OSI Eksperimentālās ķīmijterapijas grupā Dr. biol. Irinas Šestakovas vadībā.

Savienojumu citotoksiskais efekts *in vitro* tika pētīts uz monoslāņa vēža šūnu HT-1080 (cilvēka fibrosarkoma), MG-22A (peļu hepatoma) un normālām šūnu NIH3T3 (Swiss Albino peles embrija fibroblasti) kultūrām. Testēto savienojumu inhibējošais efekts tika noteikts spektrofotometriski, krāsojot šūnas ar kristālvioleto (CV), kas krāso tikai dzīvo šūnu membrānas un ar 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolija bromīdu (MTT) - reaģentu, kas raksturo mitohondriālo oksidoreduktāžu aktivitāti. Krāsošana ar neitrālsarkano (NS) pamatojas uz krāsvielas spēju difūzijas ceļā šķērsot šūnu membrānas un akumulēties šūnu lizosomās. NIH3T3 šūnu krāsošana ar NS deva iespēju, izmantojot Nacionālās veselības institūta (ASV) izstrādāto metodi, neizmantojot *in vivo* eksperimentus, noteikt testējamo savienojumu sagaidāmas LD₅₀ vērtības pēc vienādojuma:

$$\log(\text{LD}_{50} [\text{mmol/kg}]) = 0,435 \times \log(\text{IC}_{50} [\text{mmol/l}]) + 0,625$$

kur: IC₅₀ µg/ml - vielas koncentrācija, pie kuras izdzīvo 50% no šūnu daudzuma (salīdzinot ar kontroli).

Zināms, ka slāpekļa oksīda radikāļi reaģē ar olbaltumvielām un nukleīnskābēm, pārtraucot vēža šūnu kancerogēneses procesu, un tādēļ tika pētīta sintezēto savienojumu spēja generēt slāpekļa oksīda radikāļus šūnu vidē. Šim nolūkam tika izmantota kolorimetriska Greisa metode, mērot metabolisma gala produkta - nitrīta anjona (NO₂⁻) koncentrāciju.

12.1. Cefēmu un penāmu struktūras-aktivitātes sakarību analīze atkarībā no aizvietotāju struktūras

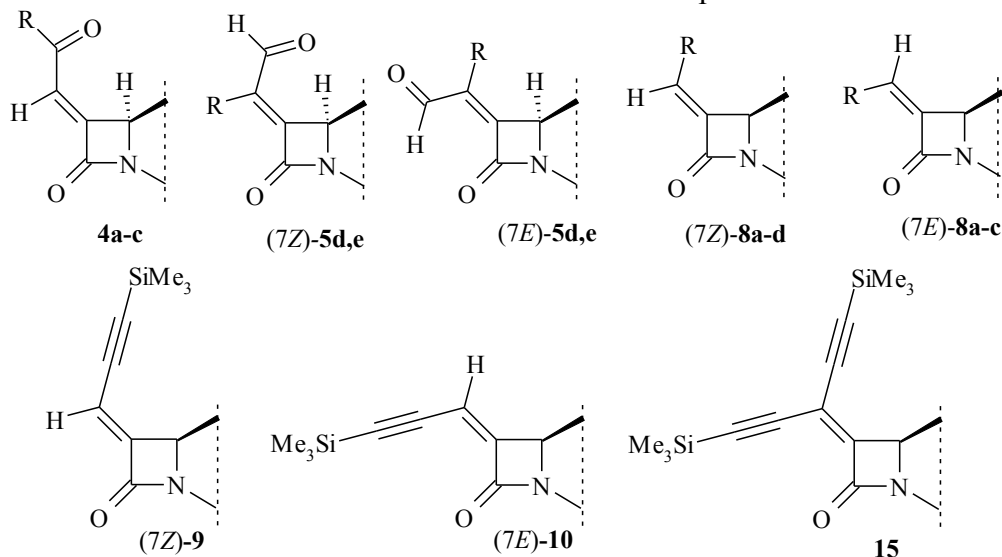
Pretvēža aktivitātes, sagaidāmā toksiskuma un NO radikāļu ģenerējošo īpašību izmaiņu analīze atkarībā no sintezēto cefēmu aizvietotāju uzbūves un konfigurācijas 7-stāvoklī (sk. 1. attēlu) ļāva konstatēt, ka:

- 2-oksoalkilidēngrupā esošie aizvietotāji cefēmiem **4a-c** uzrāda samērā augstu citotoksicitāti attiecībā pret vēža šūnām kombinācijā ar zemām LD₅₀ vērtībām un samērā vājām NO radikāļu ģenerējošām īpašībām;
- cefēmu **5d,e** formilalkilidēngrupai neatkarīgi no tās konfigurācijas, ir izteikts citotoksisks efekts kā pret vēža, tā pret normālām šūnām, un ir negatīva ietekme uz NO radikāļu ģenerēšanu;
- cefēmu **8a-d** arilmetilidēn- un furilmetilidēngrupa, atkarībā no konfigurācijas, benzola gredzena aizvietotāju dabas un izvietojuma, nodrošina vēža un normālo šūnu citotoksiskuma spektru plašā diapazonā kombinācijā ar mērenām NO radikāļu ģenerējošām īpašībām;

- d) cefēmiem (7Z)-**9**, (7E)-**10**, **15** ar konjugētu trīskāršo un dubultsaiti molekulā piemīt šūnu toksiskums, kas līdzīgs savienojumiem ar formilalkilidēngrupu, taču tiem ir augstāka NO radikāļu ģenerēšana.

1. attēls

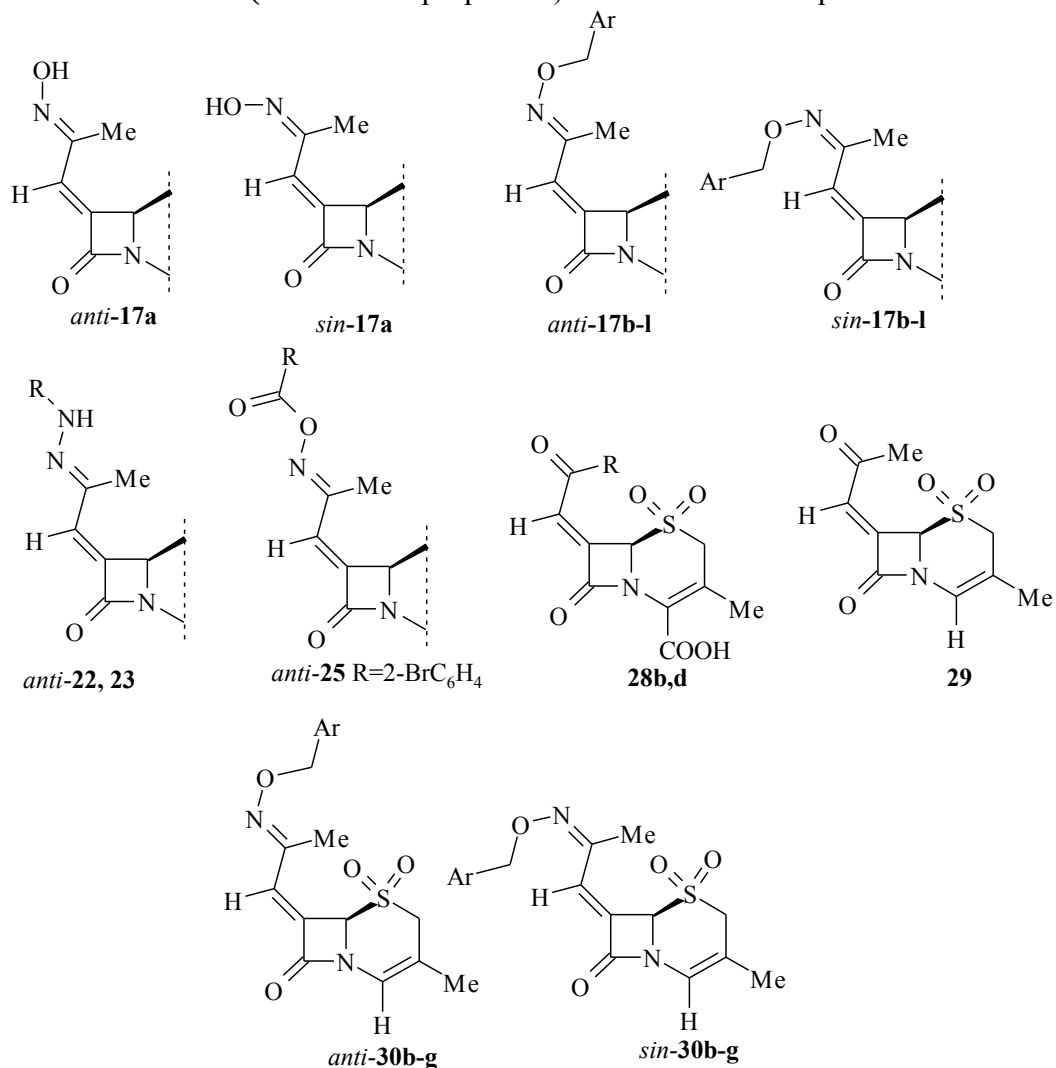
7-Alkilidēncefēmu struktūras tipi



(7Z)-(2-Oksopropilidēn)-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes *terc*-butilestera (**4d**) atvasinājumu struktūras-aktivitātes sakarību analīze atkarībā no C(4) un C(7) stāvoklī esošo aizvietotāju uzbūves un konfigurācijas (sk. 2. attēlu) ļāva konstatēt sekojošo:

- cefēmu **17a,b,k,l** oksiiminopropilidēngrupas struktūras un *sin*- vai *anti*-konfigurācijas variēšana veicina augstu citotoksicitāti pret vēža un zemu - pret normālām šūnām, kā arī mērenas NO radikāļu ģenerējošas īpašības;
- cefēmu **22** un **23** oksimiinogrupas aizvietošana ar hidrazonogrupu negatīvi ietekmē citotoksicitāti attiecībā pret vēža šūnām un NO radikāļu ģenerēšanu;
- cefēma **25** oksiiminogrupas pārvēršana benzoiloksiiminogrupā nodrošināja paaugstinātu citotoksicitāti pret vēža šūnām un zemu toksicitāti pret normālām šūnām, kā arī mērenas NO radikāļu ģenerējošas īpašības;
- karboksilgrupas atbrīvošana no *terc*-butilaizsarggrupas praktiski neietekmē cefēmu **28b,d** bioloģiskās īpašības salīdzinot ar izejsavienojumu **4d**;
- karboksilgrupas eliminēšana būtiski palielina toksicitāti attiecībā pret normālām šūnām neatkarīgi no aizvietotāja struktūras C(7) stāvoklī, pazeminot cefēmu **30b-g** LD₅₀ vērtības salīdzinot ar nedekarboksilētiem cefēmiem **17b-g**.

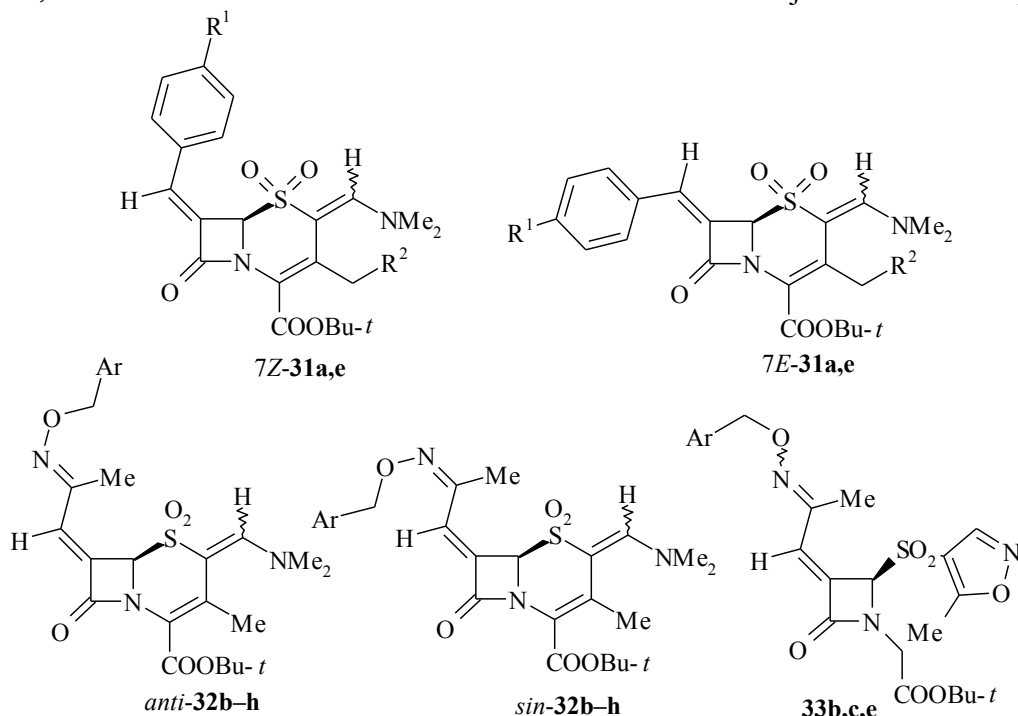
7-(2-Oksiiminopropilidēn)cefēmu struktūras tipi



Bioloģiskās aktivitātes izmaiņas, kas saistītas ar *N,N*-dimetilaminometilidēngrupas ievadišanu 7-alkilidēncefēmu C(2) stāvoklī un tās transformācija (sk. 3. attēlu) parāda ka:

- cefēmu **31**, **32** citotoksicitāte pazeminās attiecībā pret normālām šūnām un attiecīgi palielinās LD_{50} vērtības, un, līdzīgi izejsavienojumiem **8**, **17**, saglabājas augsta aktivitāte attiecībā pret vēža šūnām *in vitro*;
- cefēmu **32b,c,e** dihidrotiazīna cikla šķelšana un to pārveršana azetidīnonos **33b,c,e** izraisa citotoksicitātes pavājināšanos pret vēža un normālām šūnām, salīdzinot ar *N,N*-dimetilaminometilidēnaizvietotajiem izejsavienojumiem **32b,c,e**.

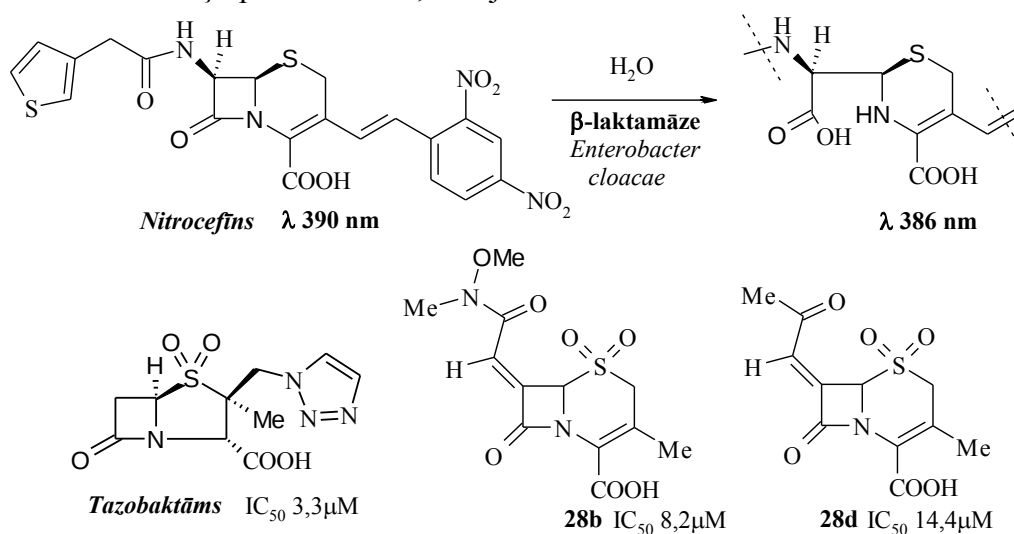
2-*N,N*-Dimetilaminometilidēnaizvietoto cefēmu un to atvasinājumu struktūras tipi



Struktūras-aktivitātes sakarības C(6) stāvoklī modificēto penāmu gadījumā būtiski neatšķiras no sakarībām, kuras piemīt cefēmiem, kas līdzīgi aizvietoti C(7) stāvoklī.

12.2. β -Laktamāzes inhibējošo īpašību noteikšana *in vitro*

Savienojumu β -laktamāzes inhibējošas īpašības tika testētas, kā substrātu izmantojot *Nitrocefīnu*. Enzīma iedarbības rezultātā notiek β -laktāma cikla hidrolītiska šķelšana un šķīduma krāsa mainās no dzeltenas uz sarkanu. Šo pāreju novēro spektrofotometriski, nosakot optiskā blīvuma izmaiņu pie $\lambda=386$ nm, testējamo vielu klātbūtnē.



β -Laktamāzes inhibējošo īpašību testēšana veikta 2-oksopropilidēn- un *N*-metil-*N*-metoksikarbamoilmetilidēnaizvietotiem cefēmiem un penāmiem ar *tert*-butilesterificēto un brīvo karboksilgrupu. Skrīninga rezultāti attiecībā pret penicilināzi *Enterobacter cloacae* liecina par to, ka (7Z)-(*N*-metil-*N*-metoksikarbamoilmetilidēn)- un (7Z)-(2-oksopropilidēn)-3-

metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābes **28b,d** atšķirībā no minēto skābju *terc*-butilesteriem (**7Z**)-**4b,d** divkārt pazemina enzīma katalītisko aktivitāti (IC_{50} 8.2 μ M un 14.4 μ M koncentrācijās, kuras ir tuvas attiecīgajam *Tazabaktāma* rādītājam - IC_{50} 3.3 μ M). No līdzīgi modificētiem C(6) stāvoklī penāmiem vājš inhibējošais efekts (IC_{50} 200 μ M koncentrācijā) tika konstatēts tikai (6Z)-(N-metil-N-metoksikarbamoilmetilidēn)-1,1-dioksopenicilānskābei **40** un tās *terc*-butilesterim **36a**.

Pētījumu rezultāti liecina, ka pretvēža 7-alkilidēn-3-metil-1,1-dioksocef-3-ēm-4-karbonskābju *terc*-butilesterus pēc karboksilgrupas atbrīvošanas var pārvērst par β -laktamāzes inhibitoriem.

SECINĀJUMI

1. Izmantojot Vitiga reakciju, izejot no 7-oksocefēmkarbonskābes *terc*-butilestera un 6-oksoopenicilānskābes *terc*-butilestera, veikta 7-alkilidēnaizvietotu cefalosporīnu un 6-alkilidēnaizvietotu penicilīnu (*Z*)- un (*E*)-stereoizomēru sintēze.
2. Sintezēto cefēmu un penāmu (*7Z*)- un (*7E*)-izomēru savstarpējā attiecībā ir atkarīga no alkilidēngrupas struktūras. Stereoizomēri sadalīti ar kolonas hromatogrāfijas palīdzību; to identificēšana veikta pēc ^1H KMR spektriem.
3. Sonogaširas sametināšanas reakcijas apstākļos veikta (*7E*)-alkilidēncefēma stereoselektīva sintēze. Mērķprodukts iegūts, apstrādājot (*7E*)-brommetilidēncefēmkarbonskābes *terc*-butilesteri ar trimetilsililacetilēnu.
4. Ievadot 2-arilmetoksiiminopropilidēngrupas cefalosporīnu un penicilīnu β -laktāma ciklos, radās reakcijas produktu *sin*- un *anti*-izomēru maisījumi, kurus atsevišķos gadījumos izdevās sadalīt, un, izmantojot ^1H KMR spektrus, pierādīt to struktūru.
5. Izmantojot Vilsmeijera reaģentu, cefalosporīna C(2) stāvoklī ievadīta *N,N*-dimetilaminometilidēngrupa, kura reaģējot ar hidroksilamīnu iniciē reakciju virkni. Tās rezultātā šķēļas dihidrotiazīna cikls un veidojas azetidīn-2-ons.
6. Izmantojot trifluoretiķskābi, panākta dažu alkilidēnaizvietoto cefalosporīnu un penicilīnu *terc*-butilesteru šķelšanās. Cefalosporīnu karboksilgrupa ir stabila skābā vidē; bāziskā vidē tā dekarboksilējas.
7. 7-Alkilidēnaizvietoto cefalosporīnu struktūras aktivitātes sakarību noteikšana parādīja, ka atsevišķos gadījumos šo savienojumu pretvēža efektivitāte ir atkarīga no (*7Z*)- un (*7E*)-vai *sin*- un *anti*-izomērijas. Pretvēža aktivitāti paaugstina *N,N*-dimetilaminometilidēngrupas ievadīšana un sēra atoma oksidēšana līdz sulfonam, bet pazemina - karboksilgrupas eliminēšana.
8. Daži 7-alkilidēncefēmkarbonskābju *terc*-butilesteri ar pretvēža aktivitāti pēc *terc*-butilgrupas eliminēšanas (kā brīvas karbonskābes) pārvēršas par β -laktamāzes inhibitoriem.

Introduction

Actuality of investigation. It is well known that the effectiveness of the treatment of infection diseases since the 40-ties of the XX century have been dramatically improved due to the discovery of antibiotics and their implementation in medical practice. Penicillin was the first and the most important representative of this type of biologically active substances. It helped to develop the theory and practice of antibiotic therapy based on the employment of microbial methabolic products for medical purposes.

The deciphering of penicillin structure helped the discovery of the unique role of β -lactam heterocycle in the mechanism of its antibacterial action on the molecular level and of its inactivation by resitant strains of bacteria. It helped to develop an effective strategy for the solution of the resistance problem based on the development of β -lactam containing antibiotics such as cephalosporin, carbapenem, penem etc., and their analogues with modified structure. As a result there were developed drugs with improved pharmacological properties such as broad antibacterial spectrum and activity against β -lactamase producing resistant bacteria.

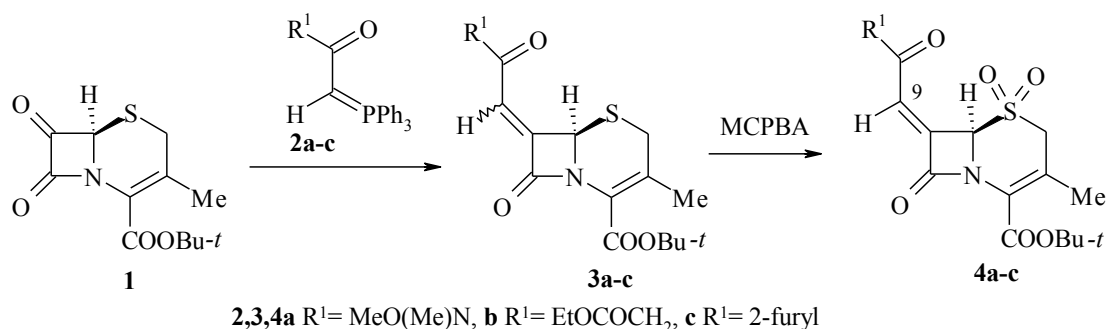
At the end of the 80-ties there were discovered cephalosporin derivatives with antiinflammatory activity. Synthetically this goal was achieved by antibiotic carboxyl esterification, sulphur oxidation and acylamino group substitution in position 7 with chlorine or methoxy group. It was found that on the molecular level these compounds are acting as inhibitors of human leukocyte elastase. As a result there were discovered β -lactam derivatives with antiviral, antitumor, anticoagulant and with other properties acting as inhibitors of specific serine and cysteine proteases.

The goal of investigation. On the basis of recent literature data and investigations carried out at the Latvian institute of organic synthesis (LIOS) in the mentioned field of medicinal chemistry, we considered as perspective to realize an investigation aimed at the synthesis of new 7-alkylidene substituted cephalosporin and 6-alkylidene substituted penicillin derivatives and their structure activity relationship analysis, which is necessary for the creation of perspective compounds with antitumor and β -lactamase inhibiting properties.

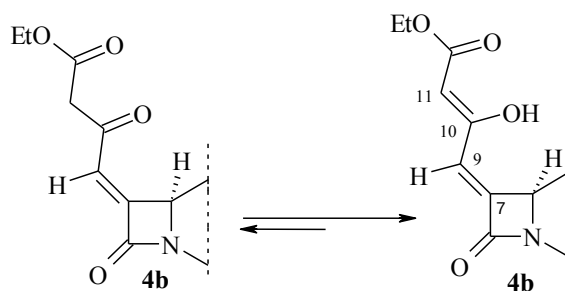
Experimental realization of this program included the synthesis of new *tert*-butyl 7-(2-oxoalkylidene)-, 7-arylmethylidene-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylates, 7-(1-alkylidene-1-formyl)-3-methylceph-3-em-4-carboxylates, 6-(2-oxoalkylidene)- and 6-(2-arylmethoxyiminopropylidene)-1,1-dioxopenicillanates structural derivatives and the screening of their antitumor and β -lactamase inhibiting properties *in vitro*.

1. PREPARATION OF 7-(2-OXOALKYLIDENE)CEPHEMS

New *tert*-butyl 7-(*N*-methoxy-*N*-methylcarbamoylmethylidene)-, 7-(3-ethoxycarbonyl-2-hydroxyprop-2-enylidene)- and 7-(2-(2-furyl)-2-oxoethylidene)-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylates **4a-c** were obtained by *tert*-butyl 3-methyl-7-oxoceph-3-em-4-carboxylate (**1**) condensation with *N*-methoxy-*N*-methylcarbamoylmethylidene(triphenyl)phosphorane (**2a**), 3-ethoxycarbonyl-2-oxopropylidene(triphenyl)phosphorane (**2b**) and 2-(2-furyl)-2-oxoethylidene(triphenyl)phosphorane (**2c**) and by oxidation of intermediates **3a-c** with 3-chloroperbenzoic acid (MCPBA).

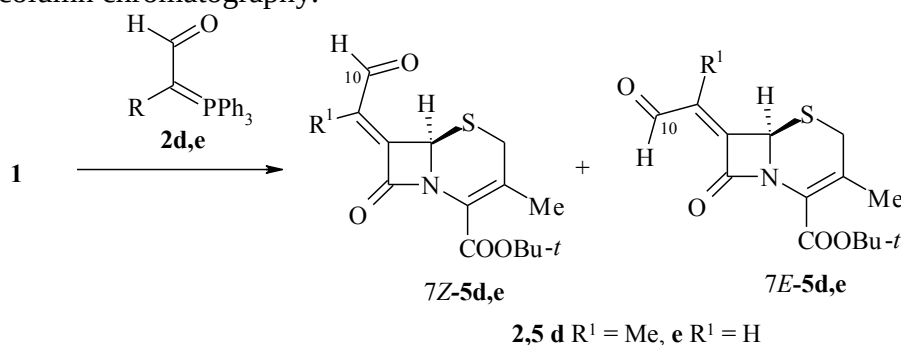


The analysis of ^1H NMR spectra for non-oxidized isomeric mixtures **3a-c** revealed considerable excess of (7*Z*)-isomers. The amount of minor (7*E*)-isomers usually did not exceed 5% and after oxidation and following chromatographic purification their quantitative isolation failed. (7*Z*)-Configuration of end products **4a-c** was confirmed by ^1H NMR spectra. Due to anisotropic influence of β -lactam carbonyl CS of C(9) protons were in the interval of 6.62 - 7.19 ppm. In ^1H NMR spectra of compound **4b** C(11) and OH resonance signals were observed at 5.51 and 11.67 ppm proving the predominance of enol structure (>90%) of the compound.

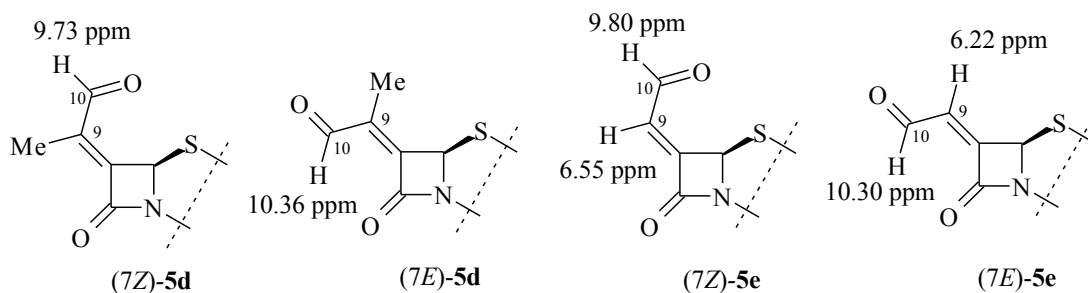


2. PREPARATION OF 7-(FORMYLALKYLIDENE)CEPHEMS

The condensation of *tert*-butyl 3-methyl-7-oxoceph-3-em-4-carboxylate (**1**) with α -formylethylidene(triphenyl)phosphorane (**2d**) and formylmethylidene(triphenyl)-phosphorane (**2e**) led to the formation of 7*Z*- and 7*E*-isomeric mixture of *tert*-butyl 7-(1-formylalkylidene)-3-methylceph-3-em-4-carboxylates **5d,e** in 3:2 ratio. Both stereo isomers were separated by the help of column chromatography.

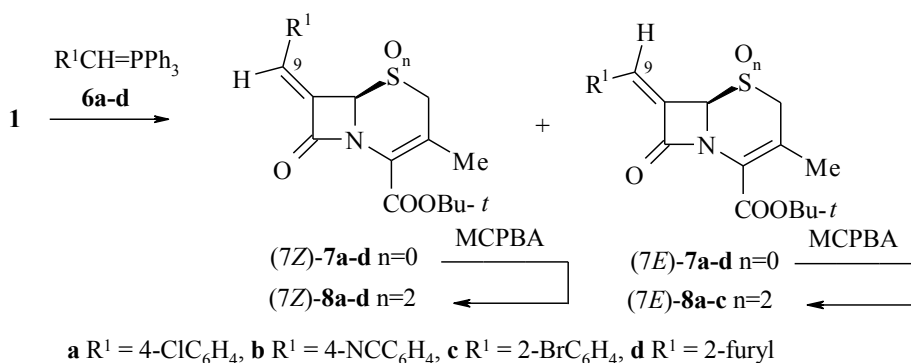


Structural identification of the isomers was performed by the usage of an aldehyde proton chemical shift in their ^1H NMR spectra. (7*E*)-Configuration of C(7) substituent provides the formation of hydrogen bond between C(10) proton and β -lactam carbonyl. In (7*Z*)-isomer such interaction is impossible. Indeed in ^1H NMR spectra of *tert*-butyl (7*E*)-(1-formyl-1-methylidene- or ethylidene)-3-methylceph-3-em-4-carboxylates (7*E*)-**5d,e** the signal of C(10) proton shifted more downfield (10.36 and 10.30 ppm) than the same signal of the (7*Z*)-**5d,e** isomers (9.73 and 9.80 ppm).



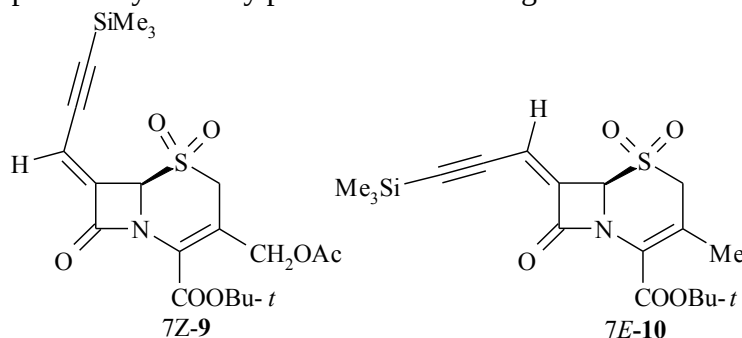
3. PREPARATION OF 7-ARYL- AND 7-HETEROARYLMETHYLIDENE CEPHEMS

New 7-arylmethylidene and 7-(2-furyl)methylidene substituted cephems **7a-d** were synthesized by the help of a Wittig reaction between *tert*-butyl 3-methyl-7-oxoceph-3-em-4-carboxylate (**1**) and alkylidene(triphenyl)phosphoranes **6a-d** with the formation of unseparable mixture of **7a-d** (7Z)- and (7E)-isomers. Structural identification of stereoisomers was performed by the help of ^1H NMR spectroscopy. Due to the deshielding effect of β -lactam carbonyl the signal of C(9) proton in (7Z)-isomers (7Z)-**7,8a-d** was shifted downfield comparing to the same signal in (7E)-**7,8a-d** isomers. Less than 10% of (7E)-(2-furyl)methylidene substituted cephem (7E)-**7d** in the reaction mixture by comparing integral intensities of C(9) protons in both **7d** (7E)- and (7E)-isomers. The attempt to isolate the minor oxidized product (7E)-**8d** from reaction mixture failed.



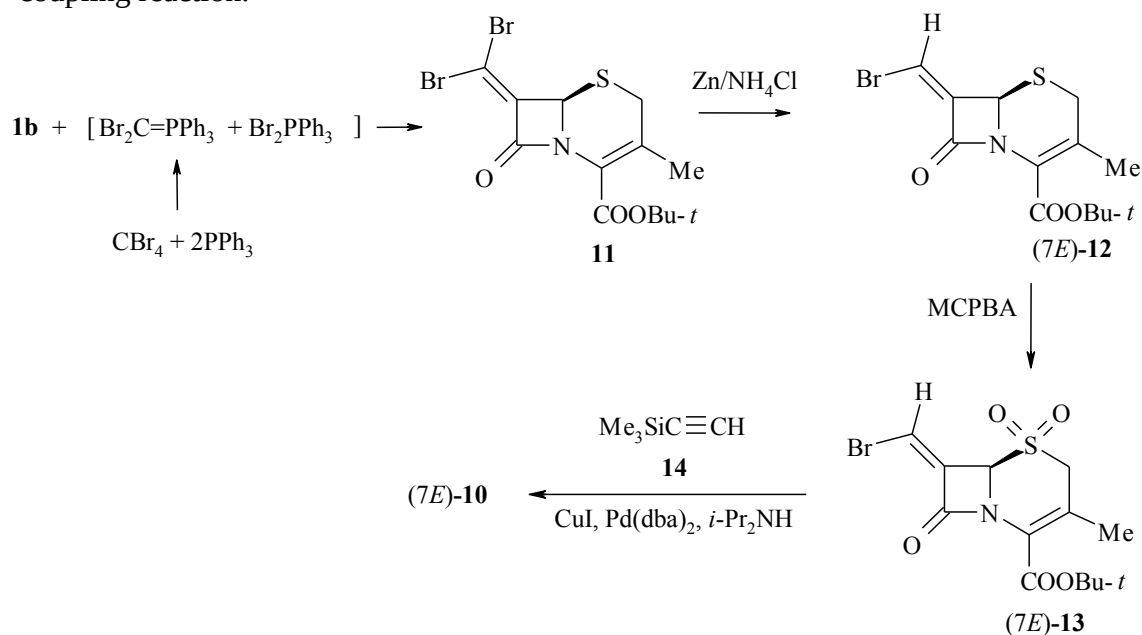
4. SELECTIVE SYNTHESIS OF 7E-ALKYLIDENE CEPHEMS

In the previous investigation carried out in LIOS it was found that *tert*-butyl 3-acetoximethyl-7-(3-trimethylsilylpropyn-2-ylidene)ceph-3-em-4-carboxylate (**9**) with (7Z)-configuration was practically the only product of the Wittig reaction.

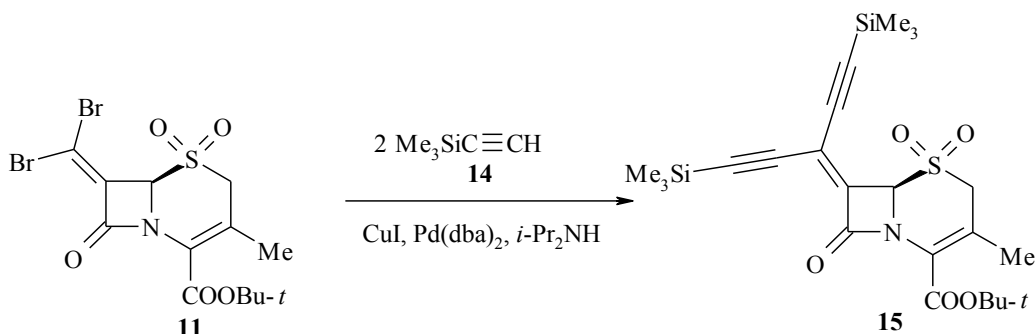


That is why for the targeted preparation of (7*E*)-**10** (7*E*)-isomer there was employed a regioselective method of (7*E*)-alkylidene substituted cephem preparation. Its experimental implementation included:

- e) *tert*-butyl 3-methyl-7-oxoceph-3-em-4-carboxylate (**1**) conversion into *tert*-butyl 7-dibromomethylidene-3-methylceph-3-em-4-carboxylate (**11**) by the help of dibromomethylidene(triphenyl)phosphorane;
- f) 7-dibromomethylidene cephem **11** stereoselective debromination into (7*E*)-bromomethylidene cephem (7*E*)-**12** by Zn/NH₄Cl;
- g) (7*E*)-bromomethylidene cephem (7*E*)-**12** oxidation into sulfone (7*E*)-**13**;
- h) (7*E*)-bromomethylidene 1,1-dioxocephem (7*E*)-**13** conversion into *tert*-butyl 3-methyl-1,1-dioxo-(7*E*)-(3-trimethylsilylpropyn-2-ylidene)-ceph-3-em-4-carboxylate ((7*E*)-**10**) by the treatment with trimethylsilylacetylene (**14**) using conditions of the catalytic Sonogashira coupling reaction.

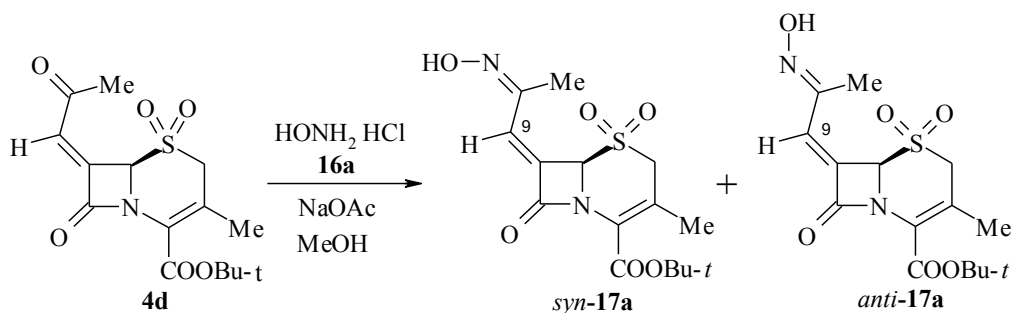


For the case of 7-dibromomethylidene cephem **11**, the same coupling reaction with two equivalents of trimethylsilylacetylene (**14**) resulted in the formation of *tert*-butyl 3-methyl-1,1-dioxo-7-[1,5-bis(trimethylsilyl)-1,4-pentadiyn-3-ylidene]-ceph-3-em-4-carboxylate (**15**).



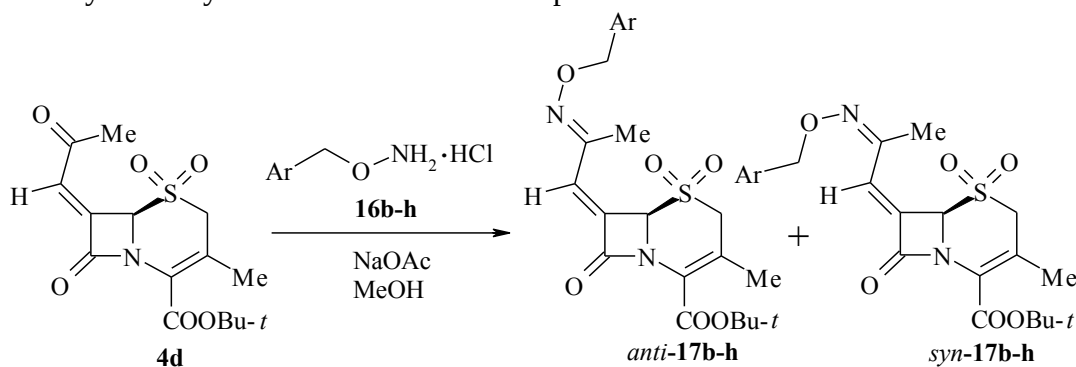
5. PREPARATION OF 7-(2-OXYIMINOALKYLIDENE)-CEPHEMS

tert-Butyl [(7*Z*)-(2-hydroxyiminopropylidene)-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylate as a mixture of *syn*-**17a** and *anti*-**17a** isomers was obtained by the treatment of *tert*-butyl 3-methyl-1,1-dioxo-(7*Z*)-(2-oxopropylidene)-ceph-3-em-4-carboxylate (**4d**) with hydroxylamine hydrochloride (**16a**) in the presence of sodium acetate.



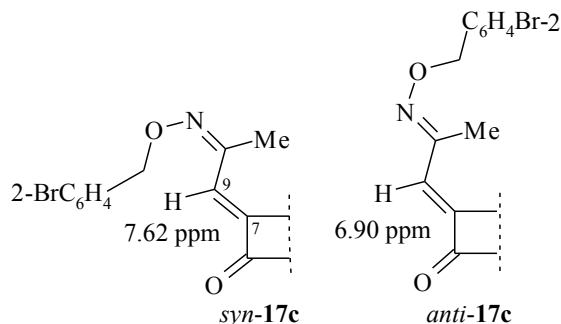
The structure of obtained *syn-17a* and *anti-17a* isomers was confirmed by ^1H - ^1H NOESY spectra. There were registered cross peaks between C(9) and HON protons in compound *syn-17a* and between NOH and Me group in compound *anti-17a*. As a result the signal of C(9) proton (δ 7.41 ppm) was shifted downfield as compared with the same signal in *anti-17a* isomer (δ 6.48 ppm).

tert-Butyl (7*Z*)-(2-arylmethoxyiminopropylidene)-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylate *syn*- and *anti*-isomer mixtures were obtained by the treatment of **4d** with arylmethoxyamine hydrochlorides **16b-h** in the presence of sodium acetate.

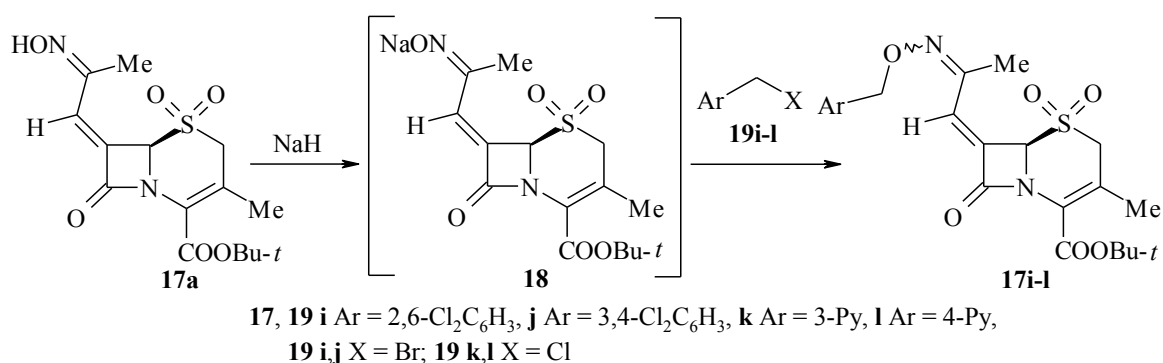


16, 17 b Ar = Ph, **c** Ar = 2-BrC₆H₄, **d** Ar = 3-BrC₆H₄, **e** Ar = 4-BrC₆H₄,
f Ar = 2-ClC₆H₄, **g** Ar = 2-FC₆H₄, **h** Ar = 2-CF₃C₆H₄;

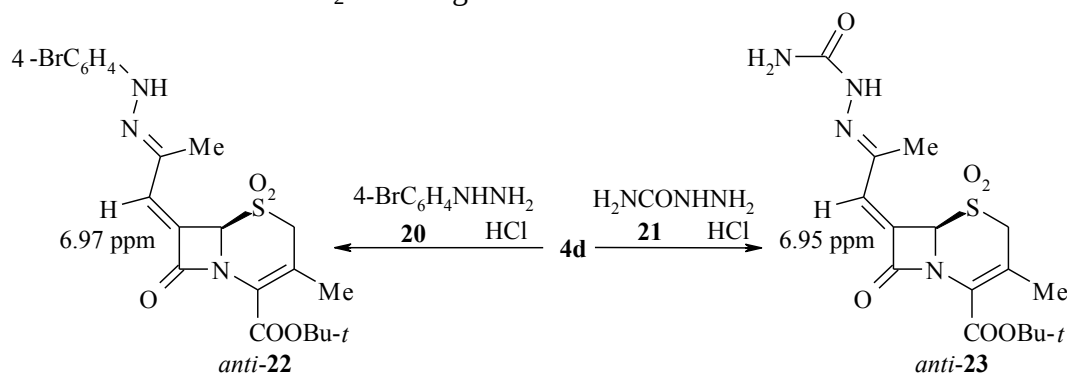
The resolution of *syn*- and *anti*-isomers in the case of **17b,c,f-h** was successfully realized by the help of column chromatography. The structures of appropriate isomers were estimated on the base of ^1H NMR spectral data using as a model cephem **17c**, which *syn*- and *anti*-isomers were characterized by ^1H - ^1H NOESY spectroscopy. In compound *syn-17c* there was observed a cross peak between C(9) and CH₂ON protons. As a result the signal of C(9) proton was shifted downfield and registered at 7.62 ppm as compared with to the same signal in *anti-17c* (δ 6.90 ppm).



New *tert*-butyl 7-(2-arylmethoxyimino)- and 7-(pyridylmethoxyiminopropylidene)-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylates **17i-l** were prepared by the substitution of hydrogen in hydroxyimino group of **17a** with sodium and following *O*-alkylation of intermediate **18** with arylmethylbromides **19i,j** or with 3- and 4-pyridylmethylchlorides **19k,l**.

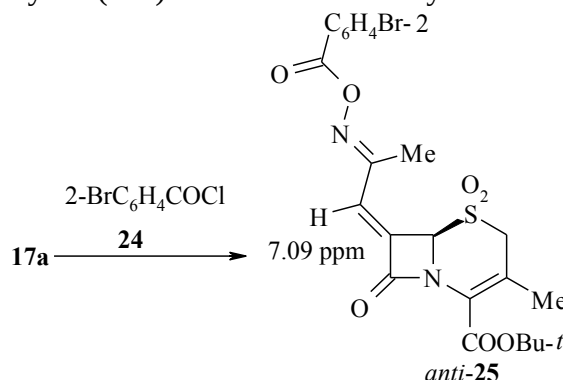


Modification of arylmethoxyimino fragment in cepheps **17** by the treatment of *tert*-butyl 3-methyl-1,1-dioxo-(7*Z*)-(2-oxopropylidene)-ceph-3-em-4-carboxylate (**4d**) with 4-bromophenylhydrazine (**20**) and semicarbazide (**21**) hydrochlorides was realized for the purpose of obtaining information about changes in structure activity relationship connected with the modification of -CH₂ON= fragment.

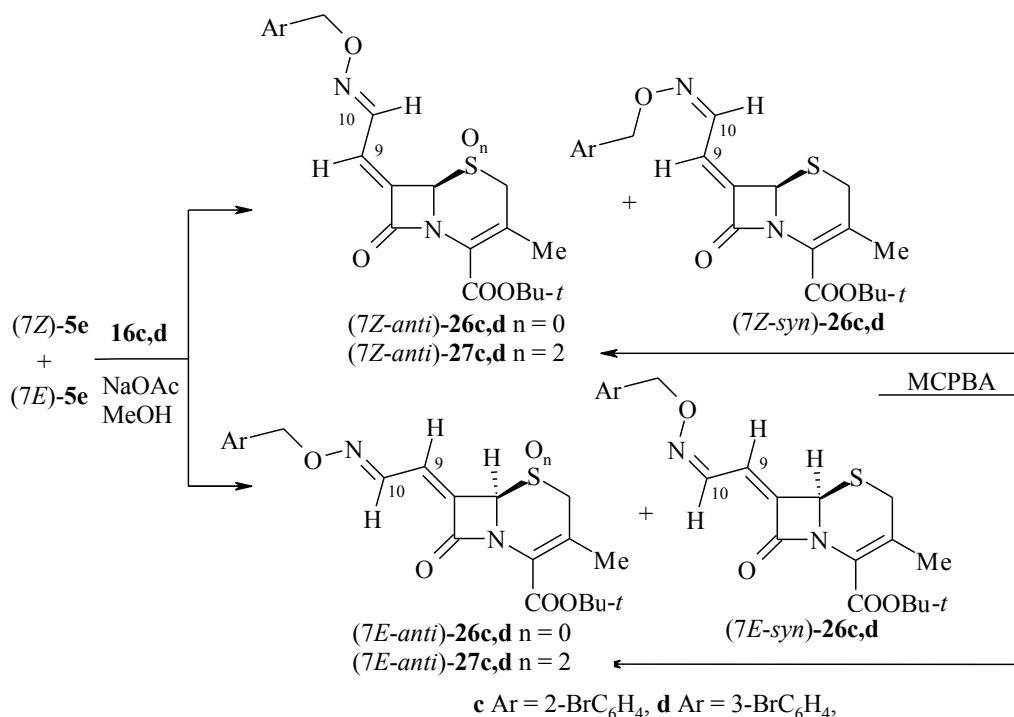


As a result there were obtained 4-bromophenylhydrazone and semicarbazone derivatives **22** and **23** with *anti*-configuration of hydrazone group. The structures of the compound obtained were confirmed by their ¹H NMR spectra, where the C(9) proton signal was observed at 6.97 ppm and 6.95 ppm, and their CS values were close to the appropriate chemical shifts of C(9) protons in *anti*-cephems **17a-k**.

(7*Z*)-[2-*anti*-(2-bromobenzoyloxyimino)propylidene]-cephem **25** with *anti*-configuration of oxyimino group, confirmed by the CS of C(9) proton (δ 7.09 ppm), was synthesized by the acylation of *tert*-butyl (7*Z*)-(2-hydroxyiminopropylidene)-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylate (**17a**) with 2-bromobenzoyl chloride.



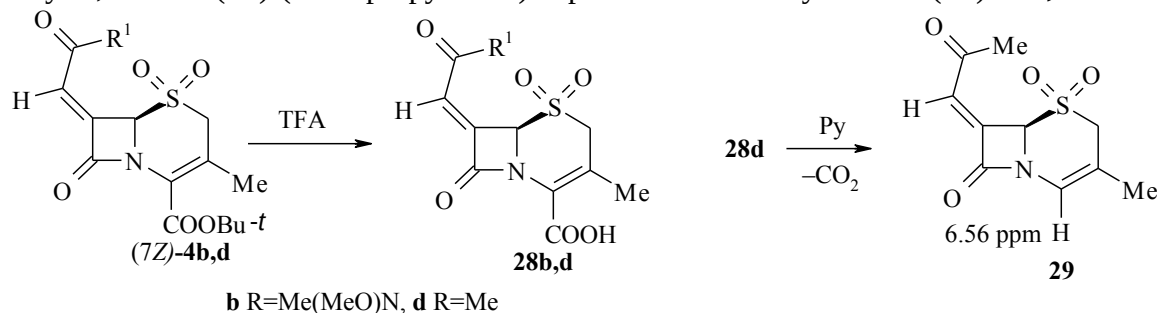
(7*Z*)- and (7*E*)-(2-arylmethoxyiminoethylidene)-cephems (7*Z-anti*)-**26c,d**, (7*Z-syn*)-**26c,d** and (7*E-anti*)-**26c,d**, (7*E-syn*)-**26c,d** as a mixture of *anti*- and *syn*-stereoisomers were obtained by the condensation of *tert*-butyl 7-(1-formylmethylidene)-3-methylceph-3-em-4-carboxylates (7*Z*)-**5e** and (7*E*)-**5e** with arylmethoxyamine hydrochlorides **16c,d** in the presence of sodium acetate.



The conversion of formyl- into arylmethoxyiminogroup created prerequisites for the oxydation of cephem sulphur into sulfone with the help of MCPBA. Chromatographic resolution of the reaction mixture resulted in the isolation of only cephem **(7Z-anti)-27c,d** and **(7E-anti)-27c,d** with *anti*-configuration. The identification of 2-arylmethoxyiminoethylidene group in cephem **(7Z-anti)-28c,d** and **(7E-anti)-28c,d** was realized by comparing their chemical shifts belonging to C(9) and C(10) protons with chemical shifts of C(9) and C(10) protons in **(7Z)**- and **(7E)**-isomers of starting cephem **5e** and with chemical shift of C(9) proton in cephem **17c** both *anti*- and *syn*-isomers.

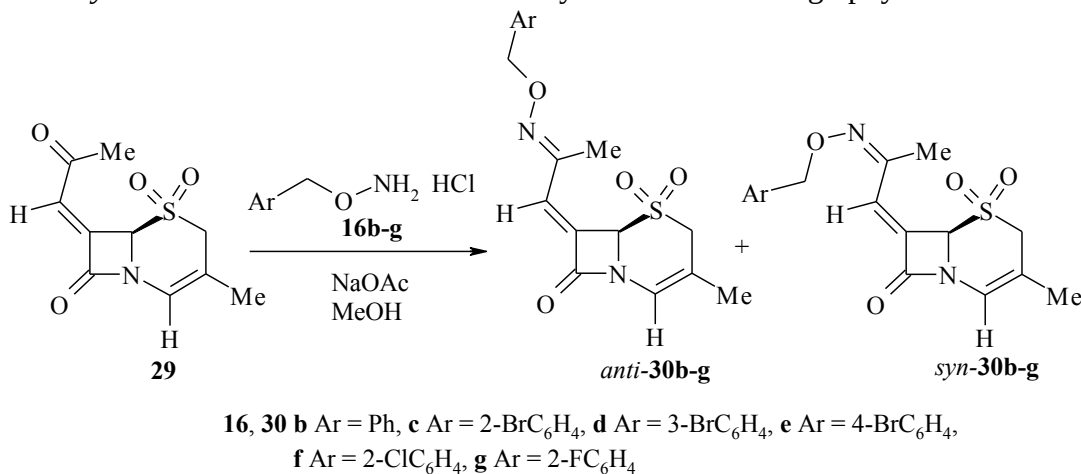
6. PREPARATION OF 7-ALKYLIDENECEPHEM-4-CARBOXYLIC ACIDS, AND DECARBOXYLATED 7-ARYLMETHOXYIMINO SUBSTITUTED DERIVATIVES

The treatment of *tert*-butyl 7-alkylidene-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylate **(7Z)-4b,d** with trifluoroacetic acid in dichloromethane at 0°C promoted the splitting of the ester group and formation of **(7Z)**-(*N*-methyl-*N*-methoxycarbonylmethylidene)- and 3-methyl-1,1-dioxo-(**7Z**)-(2-oxopropylidene)-ceph-3-em-4-carboxylic acids **(7Z)-28b,d**.



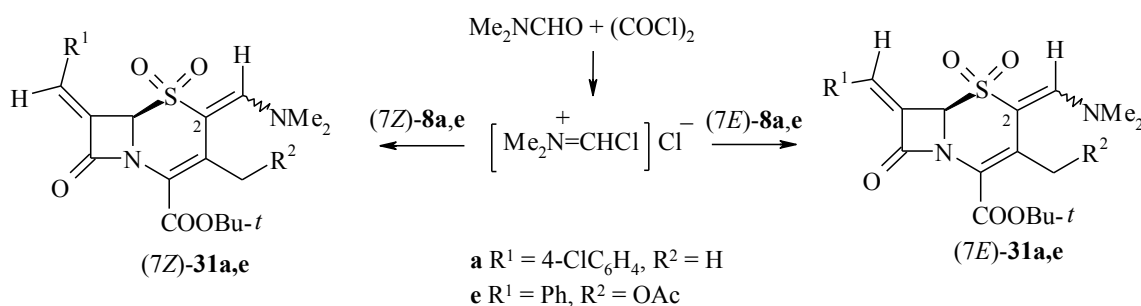
Addition of pyridine to 3-methyl-1,1-dioxo-(**7Z**)-(2-oxopropylidene)-ceph-3-em-4-carboxylic acid (**28d**) solution in acetonitrile initiated the decarboxylation reaction. ¹H NMR spectrum of the obtained 3-methyl-1,1-dioxo-(**7Z**)-(2-oxopropylidene)-ceph-3-em (**29**) contained characteristic C(4) proton signal at 6.56 ppm.

Condensation of the decarboxylated cephem **29** with arylmethoxyamine hydrochlorides **16b-g** in the presence of sodium acetate resulted in the preparation of (7*Z*)-(2-arylmethoxyiminopropylidene)-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-ems **30b-h**, whose resolution into individual *syn*- and *anti*-isomers was achieved by column chromatography.

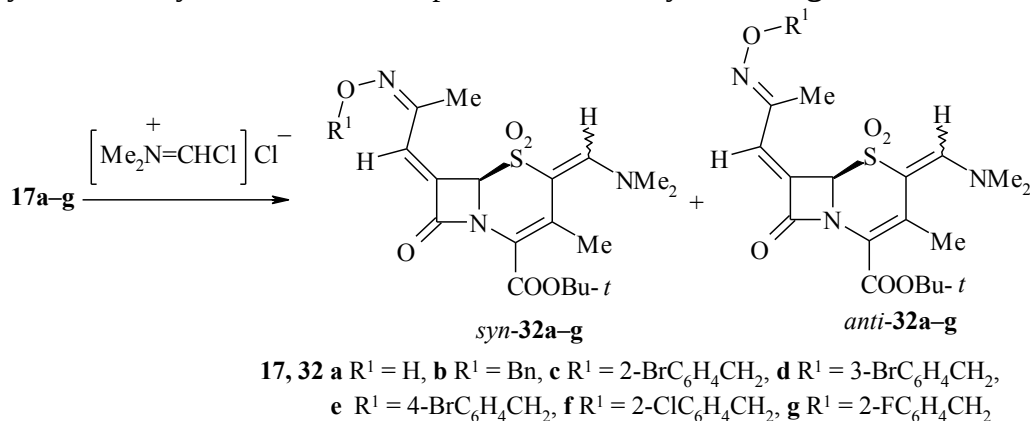


7. MODIFICATION OF 7-ALKYLIDENECEPHEMS WITH *N,N*-DIMETHYLAMINOMETHYLIDENE GROUP

The insertion of *N,N*-dimethylaminomethylidene group in position C(2) of (7*Z*)- and (7*E*)-isomers of *tert*-butyl 7-arylmethylidene-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylate **8a,e** was performed with Vilsmeier reagent. It allowed to prepare 2-*N,N*-dimethylaminomethylidene substituted cephems (7*Z*)-**31a,e** and (7*E*)-**31a,e**.

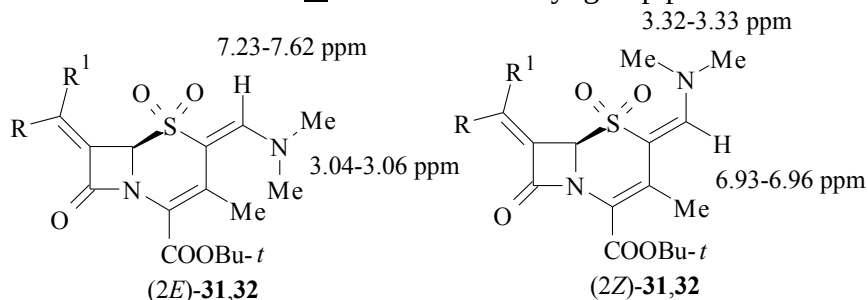


In the same manner on the base of (7*Z*)-(2-oxyiminopropylidene)cephems **17a-g** there were synthesized *tert*-butyl (7*Z*)-(2-arylmethoxyiminopropylidene)-3-methyl-2-*N,N*-dimethylaminomethylidene-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylates **32a-g**.



Resolution of the obtained isomeric mixtures of **32b-g** into individual *syn*- and *anti*-isomers was achieved by column chromatography.

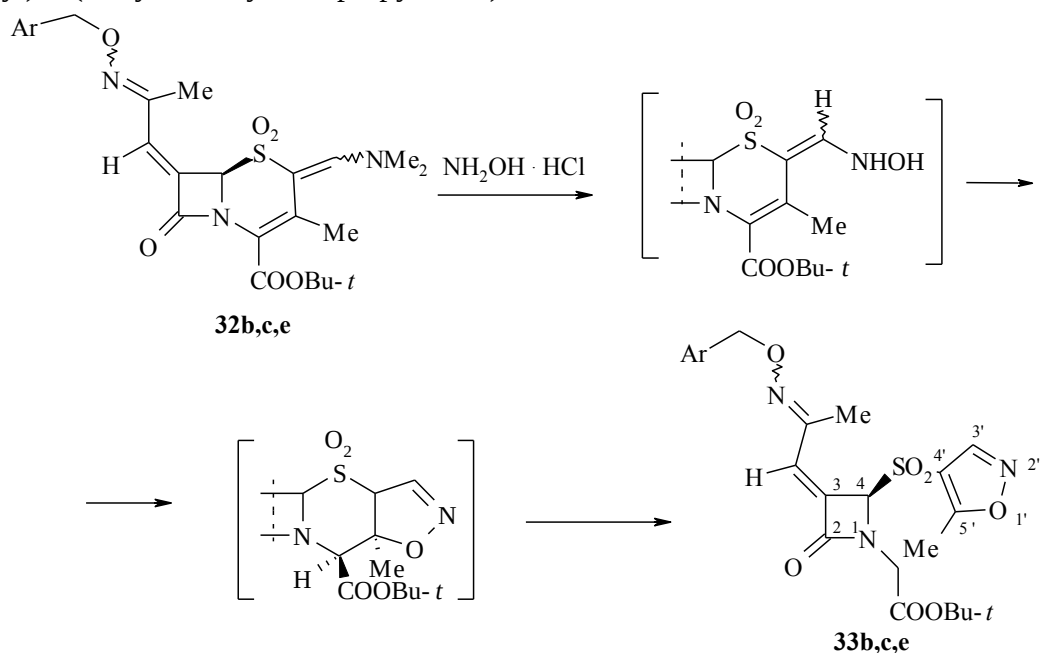
The analysis of ^1H NMR spectra of compounds **31** and **32** showed, that due to the double bond, *N,N*-dimethylaminomethylidene was represented with (2*E*)- and (2*Z*)-isomers in excess of (*E*)-isomer. There were cross-peaks observed in the ^1H - ^1H -NOESY spectra between dimethylamino and methyl groups in the 2*E*-**31**, **32** isomers. In the 2*Z*-**31**, **32** isomers this effect was observed between = CHN and the 3-methyl group protons.



That is why in the ^1H NMR spectra of cephems (2*E*)-**31**, **32**, due to sulfone oxygen deshielding effect, the signal of = CHNMe_2 proton in the (2*E*)-isomers **31**, **32** is shifted downfield (δ 7.23-7.62 ppm) as compared with the same signal of (2*Z*)-isomers registered at 6.93-6.96 ppm. In compounds (2*Z*)-**31**, **32** due to sulfone oxygen deshielding effect, the signal of NMe₂ groups in (2*Z*)-isomers was shifted downfield at 3.32-3.33 ppm compared to the same signal in (2*E*)-isomers (δ 3.04-3.06 ppm).

8. REACTION OF 2-*N,N*-DIMETHYLAMINOMETHYLIDENE-7-ALKYLIDENE-CEPHEMS WITH HYDROXYLAMINE

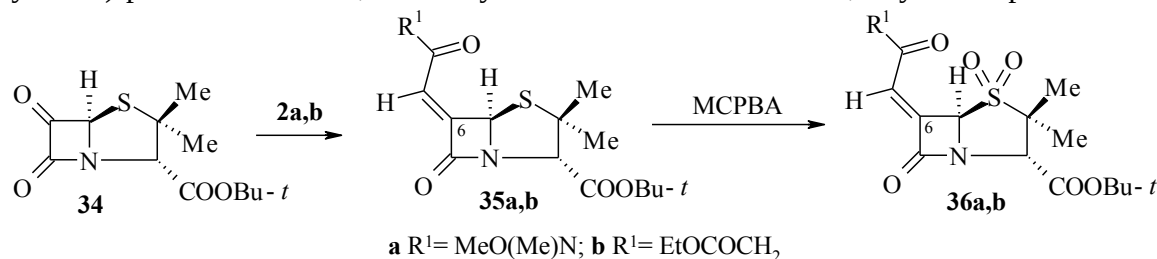
The treatment of 2-*N,N*-dimethylaminomethylidene substituted 7-(2-arylmethoxyiminopropylidene)cephems **32b,c,e** with hydroxylamine hydrochloride in acetonitrile at 40-50°C, allowed the substitution of the dimethylamino group with hydroxylamino group whose addition to cephem C(3) atom resulted in the splitting of the double bond and in the formation of 1-*tert*-butoxycarbonylmethyl-4-(5'-methylisoxazole-4'-sulfonyl)-3-(2-arylmethoxyiminopropylidene)-azetidin-2-ones **33b,c,e**.



b Ar = C₆H₅, **c** Ar = 2-BrC₆H₄, **e** Ar = 4-BrC₆H₄

9. PREPARATION OF 6-(2-OXOALKYLIDENE)-PENICILLANATE DERIVATIVES

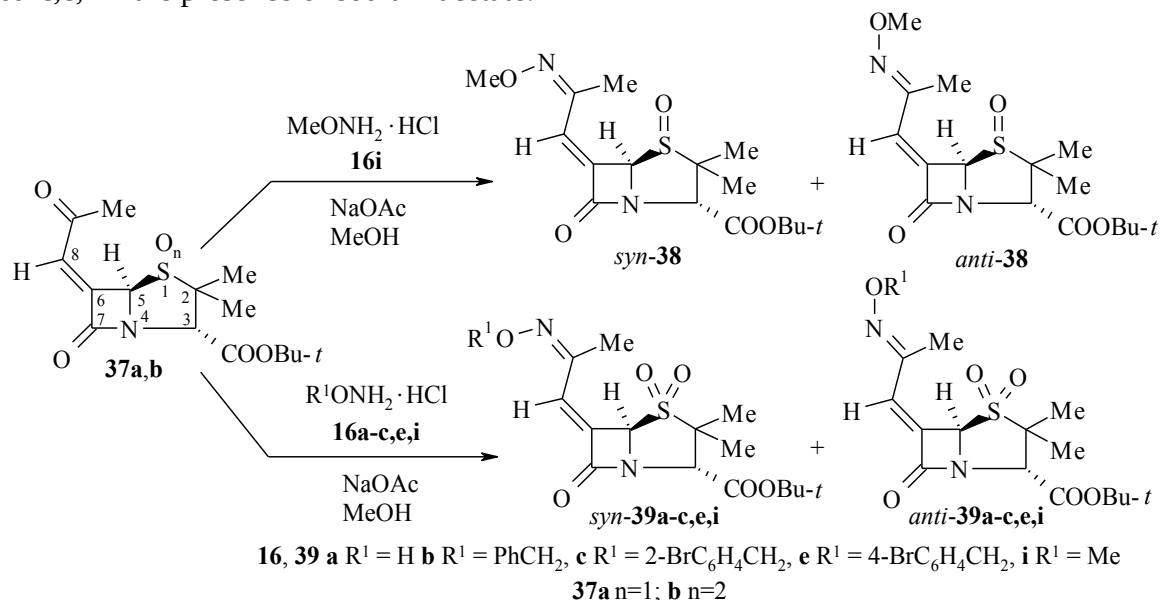
The condensation of *tert*-butyl 6-oxopenicillanate (**34**) in the Wittig reaction with *N*-methoxy-*N*-methylcarbamoylmethylidene(triphenyl)phosphorane (**2a**) and 3-ethoxycarbonyl-2-oxopropylidene(triphenyl)phosphorane (**2b**) allowed the preparation of *tert*-butyl 6-(*N*-methoxy-*N*-methylcarbamoylmethylidene)- and 6-(3-ethoxycarbonyl-2-hydroxyprop-2-enylidene)-penicillanates **35a,b** and oxydize them into sulfones **36a,b** by the help of MCPBA.



The analysis of the ¹H NMR spectra of penams **36a,b**, the same as in case of analogous substituted cepems **4a,b**, confirmed a (6*Z*)-configuration of the substituent in position C(6).

10. PREPARATION OF 6-(2-OXYIMINOPROPYLIDENE)-PENICILLANATES

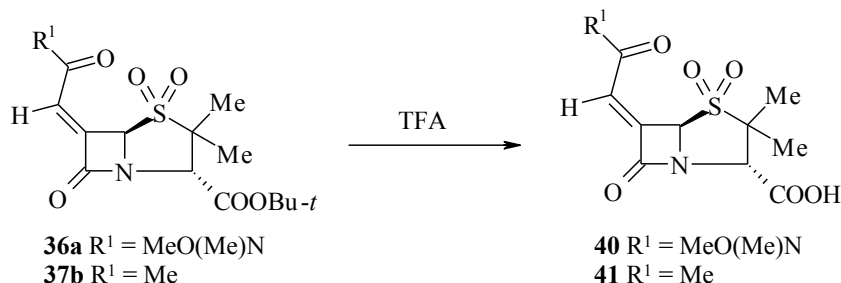
tert-Butyl 6-(2-methoxyiminopropylidene)-1-oxopenicillanates (**38**), 6-(2-hydroxyiminopropylidene)- and 6-(2-arylmethoxyiminopropylidene)-1,1-dioxopenicillanates **39a-c,e,i** were obtained by the condensation of *tert*-butyl 6-(2-oxopropylidene)penicillanate sulfoxide and sulfone **37a,b** with hydroxy-, methoxy- and arylmethoxyamine hydrochlorides **16a-c,e,i** in the presence of sodium acetate.



Reaction products **38** and **39a-c,e,i** were obtained as *syn*- and *anti*-isomer mixtures, some of which were separated by column chromatography.

11. PREPARATION OF 6-ALKYLIDENE-1,1-DIOXOPENICILLANATES

The treatment of *tert*-butyl 6-(*N*-methoxy-*N*-methylcarbamoylmethylidene)- and 6-(2-oxopropylidene)-1,1-dioxopenicillanates **36a** and **37b** with trifluoroacetic acid in dichloromethane solution at 0°C led to the splitting of the ester group and to the formation of acid penam derivatives **40** and **41**.



12. INVESTIGATION OF THE STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIPS OF SYNTHESIZED COMPOUNDS

Biologic investigation of the synthesized cephalosporin and penicillin structural derivatives was realized in the LIOS Experimental chemotherapy group under the supervision of Dr. biol. Irina Shestakova.

Cytotoxicity of the tested compounds *in vitro* was determined using HT-1080 (human fibrosarcoma), MG-22A (mouse hepatoma) and normal NIH3T3 (Swiss Albino mouse embryo fibroblasts) monolayer cells. Cell inhibiting effect for the tested compounds was assayed by a multiscan spectrophotometer using crystal violet (CV), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and neutral red (NR) coloration. Staining of the NIH3T3 fibroblasts with neutral red (NR) enabled the calculation of the expected toxicity LD₅₀ for the tested compounds avoiding experiments *in vivo*, with the aid of the equation developed by the US National Institute of Health:

$$\log(\text{LD}_{50} [\text{mmol/kg}]) = 0,435 \times \log(\text{IC}_{50} [\text{mmol/l}]) + 0,625$$

where IC₅₀ μg/ml – concentration of tested compound providing 50% survival of NIH3T3 cells (comparing with control).

It is known that NO radicals can react with peptides and DNA interrupting tumor cell proliferation. That is why the synthesized compounds ability to generate NO radicals in cells media was tested using colorimetric Griess method, by measuring NO₂⁻ anion – metabolic end product concentration.

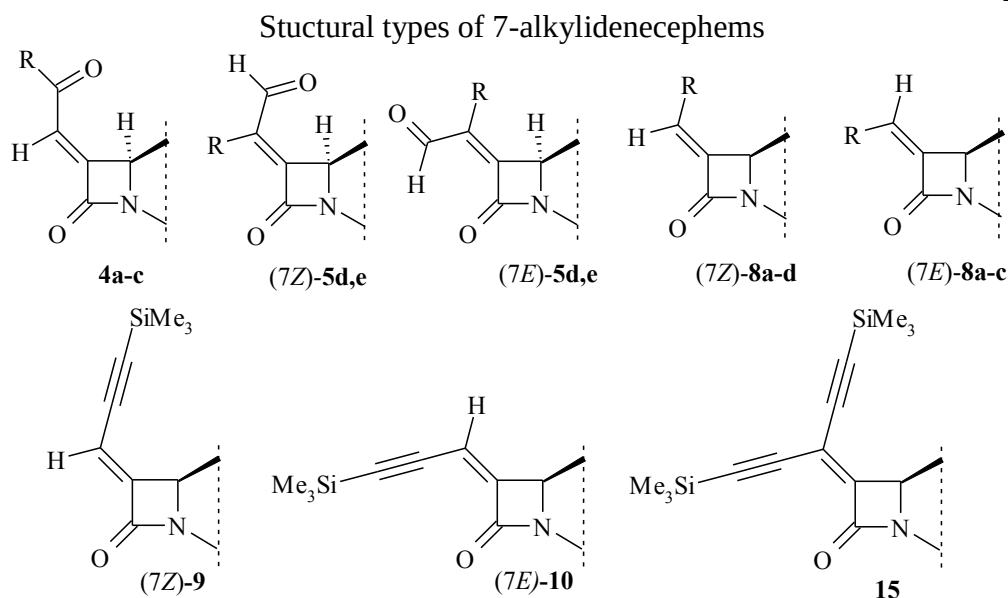
12.1. The analysis of structure activity relationships for differently substituted cepems and penams

The analysis of correlations between the structure and configuration of substituent in position C(7) of cepems (see picture 1) and antitumor activity, expected toxicity and NO radicals generating properties for the synthesized compounds allowed to make following conclusions:

- e) the attachment of various substituents to the 2-oxoalkylidene group of cepems **4a-c** provided relatively high cytotoxicity against tumor cells in combination with low LD₅₀ values and relatively weak NO radical generating properties;
- f) formylalkylidene group in (*E*)- and (*Z*)-isomers of cepems **5d,e** increased the cytotoxic effect against tumor and normal cells but reduced NO radical generation;

- g) cepheids **8a-d** containing aryl- and 2-furylmethylidene group in position C(7) were characterized with a wide range of antitumor cytotoxicity in combination with moderate NO radical generating properties, which in each case was specific for the substituent structure and configuration;
- h) cepheids (7Z)-**9**, (7E)-**10** and **15** with conjugated triple and double bonds were characterized with equally high cytotoxic effect against tumor and normal cells and with pronounced NO radical generating properties.

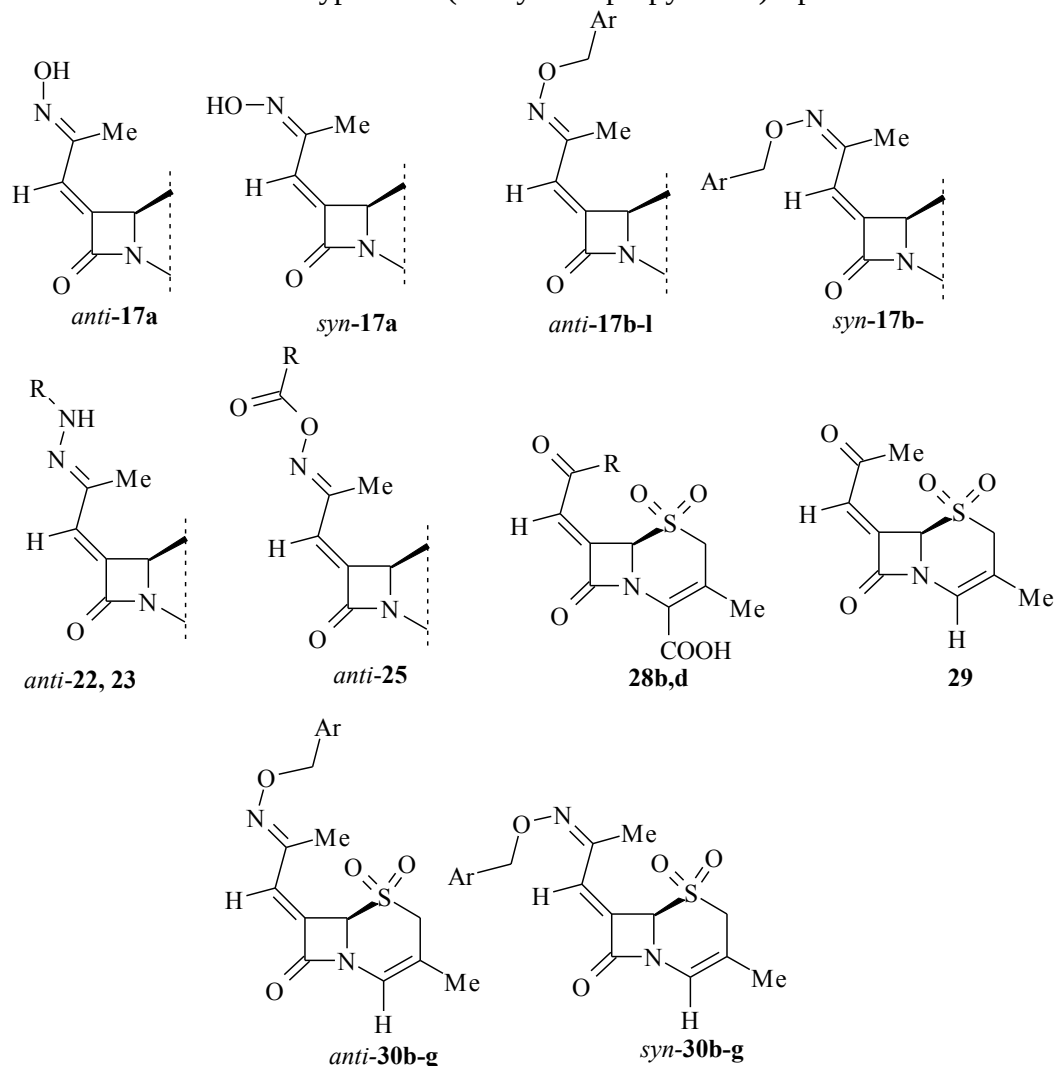
Picture 1



The analysis of correlations between the structure and configuration of substituents in *tert*-butyl (7Z)-(2-oxopropylidene)-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-en-4-carboxylates (**4d**) derivatives modified in positions C(4) and C(7) (see picture 2) and their antitumor activity, expected toxicity and NO radical generating properties allowed to make a following conclusions:

- structural variation of the oxyminoethylidene group with no difference in the *syn*- or *anti*-configuration in the case of cepheids **17a,b,k,l** provided high cytotoxicity against tumor and low against normal cells in combination with moderate NO radical generating properties;
- the oxymino group substitution with a hydrazino group in cepheids **22** and **23** resulted in considerable reduction both an antitumor and NO radical generating properties;
- conversion of oxymino group into benzoyloxyimino group improved cytotoxicity of cepheid **25** against tumor, lowered this effect against normal cells and provided only moderate generation of NO radical;
- biological properties of starting cepheid **4b,d** *tert*-butyl esters and their derivatives **28b,d** with free carboxyl were practically equal;
- elimination of the carboxyl group in cepheids **30b-g** dramatically increased their cytotoxicity against normal cells and accordingly decreasing their LD₅₀ values comparing to compounds **17b-g** containing esterified carboxyl in position C(4).

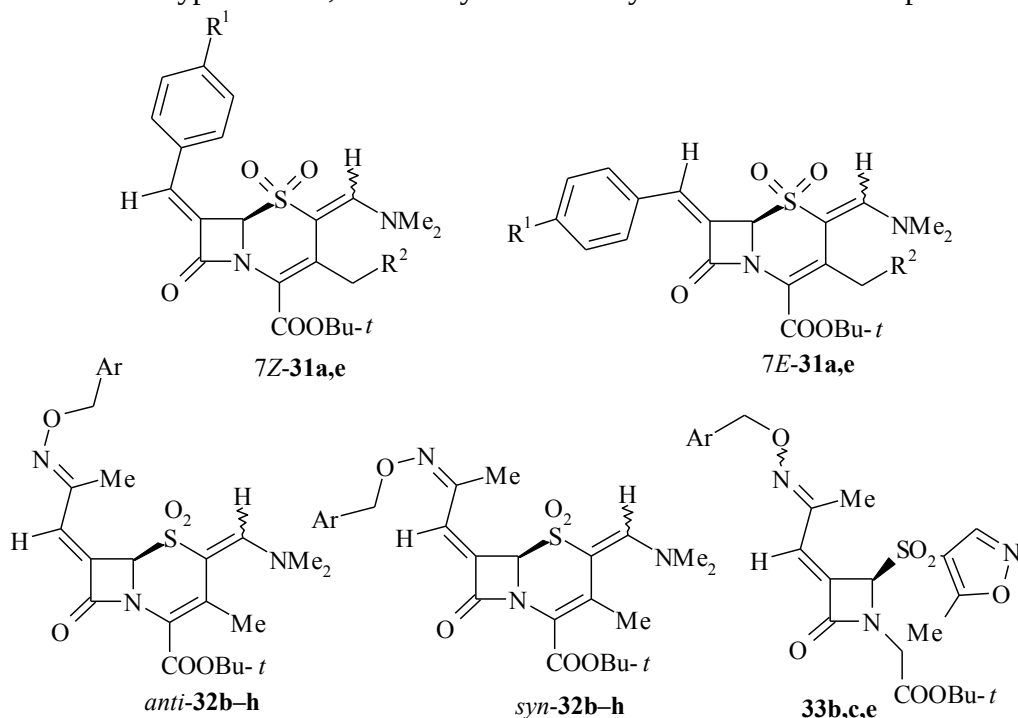
Structural types of 7-(2-oxyiminopropylidene)cephems



The changes in biological activity influenced by the insertion of *N,N*-dimethylaminomethylidene group in position 2 of 7-alkylidenecephems (see picture 3) are characterized by the following tendencies:

- contrary to the starting compounds, cephems **31**, **32** demonstrated substantial decrease in cytotoxicity against normal cells with appropriate increase of their LD₅₀ values preserving high cytotoxicity against tumor cells;
- transformation of cephems into azetidinones **33b,c,e** decreased the cytotoxic properties of the tested compounds both against tumor and normal cells comparing with *N,N*-dimethylaminomethylidene substituted cephems **32b,c,e**.

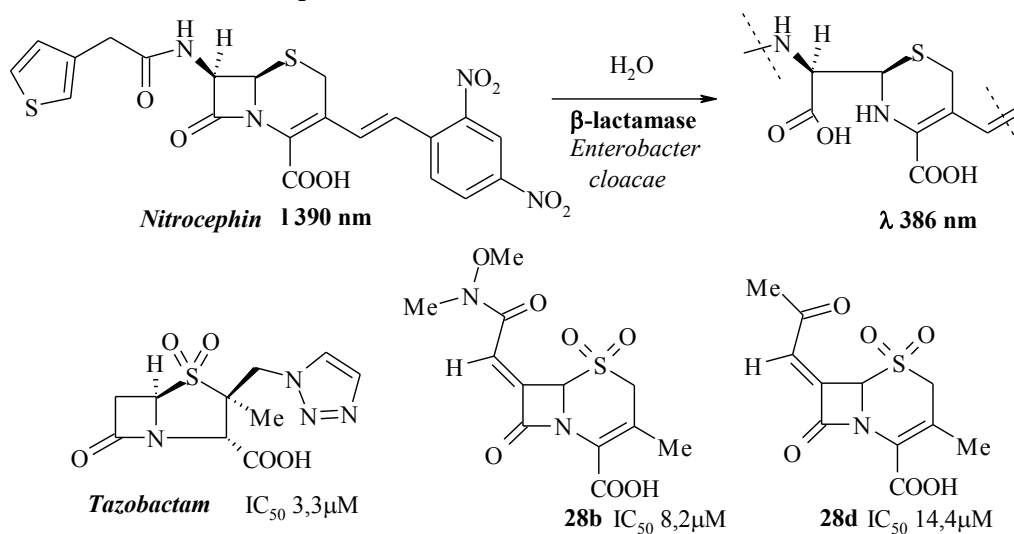
Structural types of 2-N,N-dimethylaminomethylidene substituted cepems



Structure activity correlations determined for penams similarly modified in position 6 as cepems in position C(7) were in general similar.

12.2. Investigation of β -lactamase inhibiting properties *in vitro*

The β -lactamase inhibiting properties for the synthesized compounds were tested using *nitrocephin* as substrate. Hydrolytic splitting of *nitrocephin* β -lactam ring catalyzed by the enzyme was followed by the shift of absorption band. It was determined by observing spectrophotometrically the speed of change of the optical density at 386 nm in the presence and absence of the tested compounds and standard inhibitor - *tazobactam*.



β -Lactamase inhibiting properties were detected for 2-oxopropylidene- and *N*-methyl-*N*-methoxycarbamoylmethylidene substituted cepems and penams with free and *tert*-butyl esterified carboxyl. Obtained results provided evidence that (7Z)-(*N*-methyl-*N*-

methoxycarbamoylmethylidene)- and (7Z)-(2-oxopropylidene)-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylates (**28b,d**) in contrast to their *tert*-butyl esters (7Z)-**4b,d** reduced in half the catalytic activity of enzyme *Enterobacter cloacae* at IC₅₀ 8.2 μ M un 14.4 μ M concentrations, which were close to the similar concentration of *Tazobactam* (IC₅₀ 3.3 μ M). In the case of similarly modified penams weak inhibiting effect at 200 μ M concentration was detected only for (6Z)-(N-methyl-N-methoxycarbamoylmethylidene)-1,1-dioxopenicillanic acid **40** and its *tert*-butyl 7-alkylidene-3-methyl-1,1-dioxoceph-3-em-4-carboxylates into β -lactamase inhibitors by the removal of a protective group from carboxyl.

CONCLUSIONS

1. (Z)- and (E)-stereoisomers of 7-alkylidene substituted cephalosporins and 6-alkylidene substituted penicillins were obtained by Wittig condensation of various phosphoranes with *tert*-butyl 7-oxocephem-4-carboxylate or 6-oxopenicillanate.
2. Each structural type of alkylidene group was characterized by specific ratio of (7Z)- and (7E)-isomers. The resolution of isomers was performed by column chromatography. Their structures were confirmed by ¹H NMR spectroscopy.
3. The stereoselective preparation of (7E)-alkylidenecephem was realized by employing the *Sonogashira* coupling reaction between (7E)-bromomethylidene substituted cephalosporin and trimethylsilylacetylene.
4. The insertion of 2-arylmethoxyiminopropylidene group in the β -lactam ring of cephalosporin and penicillin resulted in the formation of *syn*- and *anti*-isomer mixtures whose structures after resolution were confirmed by ¹H NMR spectroscopy.
5. The insertion of an *N,N*-dimethylaminomethylidene group in position C(2) of cephalosporin was realized by employing the Vilsmeier reagent. The reaction of this group with hydroxylamine initiated a chemical transformation leading to the splitting of the dihydrothiazine cycle and to formation of an azetidin-2-one.
6. The treatment of alkylidene substituted cephalosporin and penicillin *tert*-butyl esters with trifluoroacetic acid resulted in the liberation of the carboxyl. In the cephalosporin molecule this group was stable in acidic media but easily decarboxylated in base.
7. The analysis of structure activity correlations for 7-alkylidene substituted cephalosporins in some cases revealed significant differences in antitumor activity for separate (7Z)-, (7E)-, *syn*- and *anti*-isomers. The insertion of *N,N*-dimethylaminomethylidene group in position C(2) and the oxidation of sulphur into sulphone improved the antitumor effect of the tested cephalosporins. An opposite effect was observed after elimination of carboxyl from position C(4).
8. It was found that some antitumor 7-alkylidenecephem esters due to the elimination of *tert*-butyl protection from the carboxyl group demonstrate β -lactamase inhibiting properties.