

УДК 577.151.42

Ингибирование ДНК-гиразы левофлоксацином и другими производными фторгетероциклов

В. Л. Туницкая^{1*}, А. Р. Хомутов¹, С. Н. Кочетков¹, С. К. Котовская^{2,3}, В. Н. Чарушин^{2,3}¹Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32²Учреждение Российской академии наук Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620041, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской/Академическая, 22/20³Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

*E-mail: ve_tun@mail.ru

Поступила в редакцию 28.09.2011 г.

РЕФЕРАТ Соединения фторхинолонового ряда составляют основу важнейшего класса современных антибактериальных препаратов, обладающих высокой активностью и широким спектром действия. Наиболее перспективным фторхинолоновым препаратом является левофлоксацин – оптически активная форма офлоксацина, антибактериальная активность которого существенно превышает активность других представителей этого семейства. Ранее нами был разработан оригинальный метод получения левофлоксацина, в настоящее время осуществляется выпуск опытных партий препарата. Мишенью действия фторхинолонов является бактериальная ДНК-гираза, и исследование их взаимодействия с последней весьма важно как с теоретической, так и с практической точки зрения. В частности, параметры ингибирования ДНК-гиразы могут служить критерием качества препарата. В статье приводятся результаты исследований взаимодействия ДНК-гиразы с рядом производных фторхинолонов и их аналогов, образцов интермедиатов и полупродуктов синтеза левофлоксацина, а также образцов опытных партий препарата, полученных в ИОС УрО РАН. Выявлена важность двух структурных элементов в молекуле для проявления ингибирующей активности. Полученные данные следует принимать во внимание при дизайне новых лекарственных препаратов на основе фторсодержащих гетероциклов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА фторхинолоны, левофлоксацин, производные, бактериальная ДНК-гираза, ферментативная активность, ингибирование.

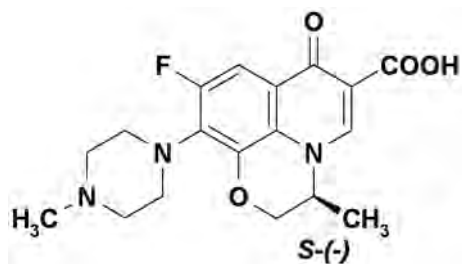
ВВЕДЕНИЕ

Соединения фторхинолонового ряда составляют основу важнейшего класса современных антибактериальных препаратов, обладающих высокой активностью, широким спектром действия. Они представляют основную конкуренцию цефалоспорином и другим антибиотикам, широко используемым в клинической практике при инфекционных заболеваниях [1–11]. Первые представители фторхинолонов (пемфлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин) появились на мировом фармацевтическом рынке в начале 90-х годов прошлого века [1–6]. Сегодня, когда объем продаж ципрофлоксацина достигает 10 млрд долларов США и разработаны новые перспективные препараты этой группы, такие, как левофлоксацин [12] (один из энантиомеров офлоксацина) и моксифлоксацин, без фторхинолонов

просто немыслимо представить современный арсенал антибактериальных средств.

Фторхинолоны эффективны при широком круге заболеваний: при тяжелых гнойно-септических процессах, инфекциях дыхательных путей, мочевыводящей системы, кожи и мягких тканей, костей и суставов, печени и желчевыводящих путей, желудочно-кишечного тракта, глаз, центральной нервной системы, а также при инфекциях, передающихся половым путем [1–4]. Фторхинолоны обладают высокой антибактериальной активностью и широким спектром действия благодаря их способности влиять на процессы размножения бактерий путем ингибирования бактериальной топоизомеразы II (ДНК-гиразы) – фермента, отвечающего за разрыв и восстановление двойной спирали ДНК. Крайне важно, что механизм действия фторхинолонов отличен

от механизмов действия других групп антибактериальных препаратов – антибиотиков пенициллинового ряда, а также цефалоспоринов и аминогликозидов, что позволяет эффективно использовать их при инфекционных заболеваниях, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами [1–4].



Левофлоксацин

Один из самых эффективных препаратов в ряду трициклических фторхинолонов – левофлоксацин – оптически активная форма (*S*-изомер) офлоксацина. Антибактериальная активность левофлоксацина в 2 раза выше, чем рацемического офлоксацина, и в 128 раз превышает активность (*R*)-антипода [13]. Левифлоксацин по праву считают препаратом 21 века, поскольку, будучи энантимерно чистым аналогом офлоксацина, он в низких концентрациях воздействует на клинически значимые грамположительные и атипичные микроорганизмы при сохранении высокой активности в отношении многих грамотрицательных бактерий [12].

В Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН и в Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина разработаны оригинальные методы получения целого семейства фторхинолонов и предшественников их синтеза, в том числе энантимерно чистых полупродуктов синтеза левофлоксацина, путем кинетического разделения оптических антиподов в реакциях с хиральными реагентами [5, 7, 11]. Научный приоритет исследований, направленных на синтез оптически активного левофлоксацина и его аналогов подтверждается серией публикаций [14–20]. Так, в частности, разработан оригинальный и эффективный метод синтеза (*S*)-7,8-дифтор-2,3-дигидро-3-метил-4Н-[1,4]бензоксазина, ключевого полупродукта в синтезе левофлоксацина [14, 15].

В настоящее время в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН продолжается синтез новых производных фторхинолонов и их аналогов с целью выявления новых препаратов, перспективных для антибактериальной терапии. Важный элемент этой работы представляет оценка способности новых препаратов ингибировать ДНК-гиразу, поскольку контроль качества при серийном производстве левофлоксацина предполагает определение

параметров ингибирования ДНК-гиразы, что может служить одним из критериев чистоты препарата. Настоящее сообщение посвящено изучению взаимодействия ДНК-гиразы с новыми производными фторхинолонов и других фторсодержащих гетероциклов, а также с серийными образцами левофлоксацина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В качестве источника ДНК-гиразы использовали плазмиды GyrA-pET19 и GyrB-pET19m, содержащие гены субъединиц А и В ДНК-гиразы соответственно, любезно предоставленные К.В. Севериновым и И.С. Шкундиной (Институт молекулярной генетики РАН). Субстраты для гиразной реакции – релаксированные формы плазмид pBR322 или pНОТ – получены от фирмы «Topogen» (США).

Выделение и очистка ДНК-гиразы

В качестве штамма-хозяина использовали клетки *Escherichia coli* Rosetta(DE3) {*F- ompT hsdSB (rmtB-) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE6 (CmR)*} («Novagen», США). Субъединицы ДНК-гиразы, кодируемые плазмидами, содержали шесть остатков гистидина на N-конце, что позволило выделять их с помощью аффинной хроматографии на колонке с Ni-НТА-агарозой.

Клетки, трансформированные плазмидами, выращивали как ночную культуру в 5 мл среды LB, содержащей 150 мг/л ампициллина (A150) и 15 мг/л хлорамфеникола (C15) при 37°C. Ночную культуру центрифугировали, осадок ресуспендировали в 250 мл свежей среды, содержащей A150 и C15. Клетки выращивали при 37°C до оптической плотности (OD_{550}), равной 0,5, затем добавляли изопропилтио-β-D-галактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Далее клетки растили в течение 18 ч при 17°C, затем собирали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин, промывали буфером ГТЕ (25 мМ Трис-НСl, pH 7,6, 50 мМ глюкоза, 10 мМ ЭДТА) и замораживали на ночь при -85°C. Клетки суспендировали в 15 мл буфера А (20 мМ Трис-НСl, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 10% (v/v) глицерин, 1% (v/v) Тритон X-100, 1 мМ 2-меркаптоэтанол) с добавлением ингибиторов протеаз – 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF) и 10 мкг/мл апротинина. Суспензию клеток лизировали ультразвуком на льду и центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g. Надосадочную жидкость наносили на колонку с Ni-НТА-агарозой (2 мл), уравновешенную буфером А. Колонку последовательно промывали буфером А, содержащим 10, 30 и 50 мМ имидазола (по 5 мл каждого), целевые белки элюировали тем же буфером,

содержащим 200 мМ имидазола. Фракции, содержащие гиразу А и гиразу В, диализовали против буфера А без Тритона, затем против того же буфера, содержащего 50% глицерина. Выход и чистоту ферментов анализировали в 12% полиакриламидном геле по Лэммли. Выход гиразы А составил 40 мг/л клеточной культуры, гиразы В – около 60 мг/л. Смешивали эквивалентные количества полученных препаратов ДНК-гираз А и В, фасовали порциями по 30–50 мкл, и аликвоты хранили при -80°C в течение нескольких недель без видимой потери активности. (При -18°C активность фермента сохранялась в течение 2–3 сут).

Определение активности ДНК-гиразы

Реакцию проводили в течение 60 мин при 25°C. Реакционная смесь (30 мкл) содержала следующие компоненты: 35 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 24 мМ КСl, 4 мМ MgCl₂, 1.4 мМ АТФ, 5 мМ ДТТ, 1.8 мМ спермидина, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. К смеси добавляли по 0.4 мкг смеси субъединиц А и В гиразы и 0.25–0.5 мкг субстрата (релаксированной плазмиды рBR322). Реакцию проводили в термостате при 25°C в течение 60 мин (для множественных образцов использовали 96-луночные планшеты). После окончания реакции экстрагировали пробы равным объемом хлороформа (30 мкл), к водной фазе добавляли 7 мкл смеси 50% додецилсульфата натрия, 25% глицерина и 0.25% бромфенолового синего. Смесь наносили на 1.2% агарозный гель в буфере ТАЕ (40 мМ Трис-ацетат, рН 8.0, 2 мМ ЭДТА) и проводили электрофорез (50 В, 2 ч). Продукты визуализировали в УФ-свете. Активность фермента (%) определяли по интенсивности полосы, соответствующей суперспирализованной форме плазмиды рBR322, и рассчитывали в программе TotalLab v2.01.

Ингибирование ДНК-гиразы фторхинолонами и другими фторсодержащими гетероциклами

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Реакцию проводили в течение 60 мин при 25°C в объеме 30 мкл. Реакционная смесь (30 мкл) содержала следующие компоненты: 35 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 24 мМ КСl, 4 мМ MgCl₂, 1.4 мМ АТФ, 5 мМ дитиотреитол (ДТТ), 1.8 мМ спермидина, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и несколько концентраций левофлоксацина или производных фторсодержащих гетероциклов (см. ниже). В контрольные пробы добавляли соответствующий объем ДМСО, но не более 10% объема пробы. К пробам добавляли по 0.4 мкг смеси субъединиц ДНК-гиразы А и В и 0.25–0.5 мкг субстрата (релаксированной плазмиды рBR322). Далее реакцию проводили как описано выше, расчеты проводили в программе TotalLab v2.01.

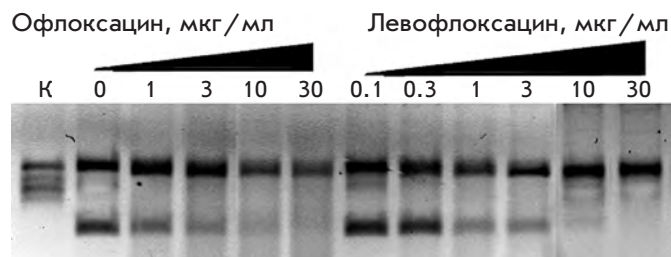


Рис. 1. Ингибирование ДНК-гиразы левофлоксацином и офлоксацином. Цифрами указаны концентрации ингибиторов в пробах. К – контроль (плазида без фермента).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная мишень фторхинолонов – бактериальная ДНК-гираза – состоит из двух субъединиц с M_r 105 и 95 кДа, кодируемых соответственно генами *gyrA* и *gyrB*, и имеет тетрамерную структуру типа A_2B_2 [1–5]. Хотя функция этого фермента в клетке не ограничивается актом единственного типа (она способна как создавать, так и «зашивать» разрывы в ДНК-цепи), при определении активности *in vitro* обычно оценивают только одну изолированную функцию этого фермента, а именно способность к образованию отрицательных сверхвитков в релаксированных кольцевых ДНК с образованием суперскрученной формы плазмиды. Оценка этого процесса довольно удобна в эксперименте, поскольку субстрат и продукт реакции могут быть разделены и количественно определены с помощью электрофореза в агарозном геле.

Использованный в работе препарат ДНК-гиразы *E. coli* отличался высокой удельной активностью, что позволило использовать его для тестирования фторхинолонов. На первом этапе тестированию подвергался образец левофлоксацина чистотой около 99%. В качестве контроля использовали офлоксацин (рацемическая смесь, левофлоксацин – левовращающий изомер офлоксацина). Офлоксацин, хорошо известный клиницистам, является фторхинолоном первого поколения и применяется более 15 лет [1–4].

На рис. 1 показаны результаты определения ингибирующей активности. Величины I_{50} , рассчитанные по результатам трех независимых опытов, составили 2.50 ± 0.14 мкг/мл и 6.20 ± 0.17 мкг/мл для левофлоксацина и офлоксацина соответственно. Полученные величины соответствуют опубликованным данным [7–10]; более того, соотношения I_{50} для этих соединений указывают на стереоспецифичность ДНК-гиразы. Величина I_{50} для рацемата (офлоксацин) примерно вдвое больше, чем у индивидуального стереоизомера (левофлоксацин), что грубо соответствует его содержанию в рацемической смеси.

Таблица 1. Структурные формулы субстанции левофлоксацина, интермедиатов и полупродуктов синтеза

Структурная формула	Название	Тип соединения	Шифр
	Левофлоксацин (3 <i>S</i>)-9-Фтор-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3- <i>d,e</i>][1,4]-бензоксазин-6-карбоновая кислота, гемигидрат	Субстанция	IOS-001 – IOS-019
	(<i>R,S</i>)-7,8-Дифтор-3-метил-2,3-дигидро-4Н-бензо[<i>b</i>][1,4]-оксазин	Интермедиат	IOS-RS-01, IOS-RS-02
	(3 <i>S</i>)-2,3-Дигидро-3-метил-7,8-дифтор-1,4-бензоксазин	Интермедиат	IOS-S-01, IOS-S-02
	Этиловый эфир (3 <i>S</i>)-(-)-9,10-дифтор-3-метил-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3- <i>d,e</i>][1,4]-бензоксазин-6-карбоновой кислоты	Полупродукт	IOS-Э-01, IOS-Э-02
	(3 <i>S</i>)-(-)-9,10-Дифтор-3-метил-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3- <i>d,e</i>][1,4]-бензоксазин-6-карбоновая кислота	Полупродукт	IOS-K-001, IOS-K-002

Поскольку величина I_{50} для ферментативной реакции является константой, этот показатель может использоваться для контроля качества левофлоксацина. Учитывая, что только один, а именно левовращающий изомер офлоксацина является ингибитором фермента, величина I_{50} может служить критерием чистоты препарата. Наряду с химической и оптической чистотой препарата его биологическая эффективность считается важной характеристикой качества препаратов левофлоксацина.

В табл. 1 приведены структурные формулы левофлоксацина (использовано 19 образцов из опытных партий субстанции), а также ключевых интермедиатов (четыре образца) и полупродуктов (четыре образца) его полупромышленного синтеза, осуществленного в ИОС УрО РАН.

Все 19 образцов субстанции левофлоксацина, соответствующие опытным партиям препарата, имели близкие значения I_{50} (2.4–2.8 мкг/мл), которые при точности используемого метода определения активности (погрешность определения до 20%) можно считать совпадающими. Эти значения соответствуют опубликованным данным для препарата левофлоксацина чистотой 99%, что подтверждают также результаты физико-химического анализа. Из ключевых интермедиатов и полупродуктов синтеза левофлоксацина три образца (рацемический бензоксазин **IOS-RS**, энантимерно чистый бензоксазин **IOS-S** и эфир

IOS-Э) не обладали сколько-нибудь значимой активностью, а активность полупродукта **IOS-K** оказалась примерно на порядок ниже, чем у левофлоксацина (рис. 2).

В то же время при сравнении структурных формул полупродуктов **IOS-Э** и **IOS-K** можно видеть, что они различаются лишь наличием этилированной карбоксильной группы у **IOS-Э**. Важно отметить

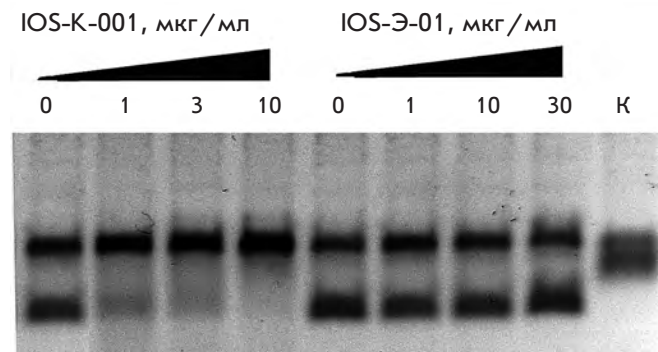


Рис. 2. Ингибирование ДНК-гиразы соединениями **IOS-K-001** и **IOS-Э-01**. Цифрами указаны концентрации ингибиторов в пробах. К – контроль (плазмида без фермента). Условия реакции см. в «Экспериментальной части».

Таблица 2. Ингибирующая активность ряда новых фторхинолонов и фторгетероциклов в отношении ДНК-гиразы

ШИФР/ I ₅₀ , мкг/мл	Структурная формула	ШИФР/ I ₅₀ , мкг/мл	Структурная формула
EV-465 >30		EV-X149 неактивен	
EV-591 неактивен		EV-T150-C неактивен	
EV-452-D неактивен		EV-T156 неактивен	
EV-313-D неактивен		EV-T143-B неактивен	
EV-572 неактивен		EV-N51-B неактивен	
EV-X58-A неактивен		EV-N119-2 неактивен	
IOS-NORFL_01 >11		IOS-PEFL_02 2.8	

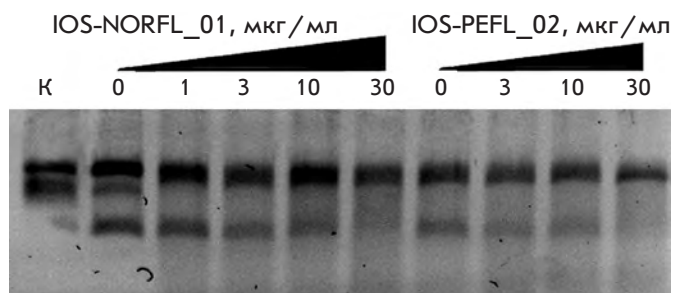


Рис. 3. Ингибирование ДНК-гиразы норфлоксацином **IOS-NORFL_01** и пefлоксацином **IOS-PEFL_02**. Цифрами указаны концентрации ингибиторов в пробах. К – контроль (плазмида без фермента). Условия реакции см. в «Экспериментальной части».

тить, что это единственное различие в структурах обуславливает достаточно заметную ингибирующую активность при наличии свободной карбоксильной группы, и практически полное исчезновение активности при ее этилировании. Этот результат позволяет предполагать функциональную важность заряженной карбоксильной группы в указанном положении для проявления ингибирующей активности и соответствует представлениям о механизме взаимодействия фторхинолонов с ДНК-гиразой, что, безусловно, должно учитываться при дизайне новых, более эффективных ингибиторов фермента.

В работе проведено также тестирование ингибирующей активности в отношении ДНК-гиразы ряда новых производных фторхинолонов и фторсодержащих гетероциклов, синтезированных в ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН. Результаты экспериментов приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, подавляющая часть соединений оказалась неактивной. Исключение составляли фторхинолон **EV-465**, активность которого была примерно на два порядка ниже, чем у левофлоксацина, а также известные соединения фторхинолонового ряда – **IOS-NORFL_01** (норфлоксацин) и **IOS-PEFL_02** (пefлоксацин) (рис. 3, 4).

Соединение **IOS-NORFL_01** показало незначительное ингибирующее действие, в то время как **IOS-PEFL_02** обладало умеренной активностью, значительно, впрочем, уступавшей активности левофлоксацина. Интересно, что эти соединения отличаются лишь дополнительной метильной группой у **IOS-PEFL_02**, введение которой приводит к увеличению ингибирующей активности примерно на порядок. Это важное обстоятельство, которое должно учитываться в дальнейшей работе по созданию новых производных фторхинолонов.

Таким образом, проведенные эксперименты показали важность оценки ингибирующей активности

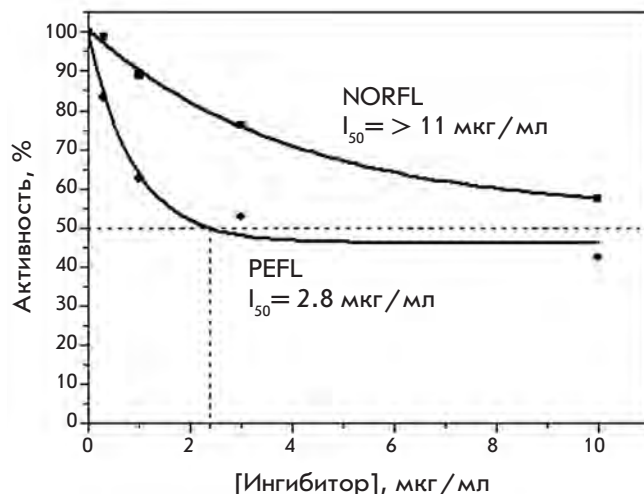


Рис. 4. Определение I_{50} для соединений **IOS-NORFL_01** и **IOS-PEFL_02** по данным рис. 3. Величине I_{50} соответствует пересечение пунктирных линий с осью абсцисс.

левофлоксацина в отношении бактериальной ДНК-гиразы как одного из методов контроля качества препарата, наряду с использованием обычных физико-химических методов. С помощью разработанного метода оценено качество 19 образцов опытных партий левофлоксацина, восьми образцов интермедиатов и полупродуктов синтеза, а также 14 новых производных фторхинолонов и их аналогов.

В результате корреляционного анализа «структура–ингибирующее действие» отмечена важность двух структурных элементов молекул для проявления ингибирующей активности: это карбоксильная группа в соединении IOS-K, этерификация которой приводит к потере ингибирующих свойств, и N-метильная группа в соединении IOS-PEFL, элиминация которой также приводит к потере активности соединения. Полученные данные следует принять во внимание при дизайне новых лекарственных препаратов на основе фторсодержащих гетероциклов. ●

Авторы выражают благодарность К.В. Северинову и И.С. Шкундиной (Институт молекулярной генетики РАН) за предоставленные плазмиды *GyrA-pET19* и *GyrB-pET19m*.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта № 02.522.12.2011 ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The New Generation of Quinolones / Eds Siporin C., Heifetz C.L., Domagala J.M. New York, London, 1990. 422 p.
2. Shen L.L. Quinolone Antibacterial Agents. Washington: American Soc. Microbiol., 1993. 344 p.
3. Quinolone Antimicrobial Agents, 2nd ed. / Eds Hooper D.S., Wolfson J.S. Washington, 1993.
4. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Фторхинолоны. М.: Биоинформ, 1995. 208 с.
5. Мокрушина Г.А., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. // Химико-фармацевтический журн. 1995. № 1. С. 5–19.
6. Ball P. The Quinolones / Ed. Andriole T.V. San Francisco: Acad. Press, 1998. P. 1–28.
7. Мокрушина Г.А., Носова Э.В., Липунова Г.Н., Чарушин В.Н. // Журн. орг. химии. 1999. Т. 35. № 10. С. 1447.
8. Граник В.Г. Основы медицинской химии. М.: Вузовская книга, 2001.
9. Фурин Г.Г. Фторсодержащие гетероциклические соединения: синтез и применение. Новосибирск: Наука, 2001.
10. Мокрушин В.С., Вавилов Г.А. Основы химии и технологии биоорганических и синтетических медицинских препаратов. Екатеринбург: УГТУ-УПИ, 2004.
11. Nosova E.V., Mochulskaaya N.N., Kotovskaya S.K., Lipunova G.N., Charushin V.N. // Heteroatom Chemistry. 2006. V. 17. № 6. P. 579.
12. Яковлев В.П., Яковлев С.В. // Инфекции и антимикробная терапия. 2004. Т. 6. № 4. (http://old.consilium-medicum.com/media/infektion/04_04/108.shtml)
13. Hayakawa I., Atarashi S., Yokohama S., Imamura M., Sakano K., Furukawa M. // Antimicrob. Agents Chemother. 1986. V. 29. № 1. P. 163–164.
14. Charushin V.N., Krasnov V.P., Levit G.L., Korolyova M.A., Kodess M.I., Chupakhin O.N., Kim M.H., Lee H.S., Park Y.J., Kim K.-C. // Tetrahedron: Asymmetry. 1999. V. 10. P. 2691.
15. Production of (*S*)-benzoxazine derivative and racemization of (*R*)-benzoxazine derivative // Chupakhin O.N., Krasnov V.P., Levit G.L., Charushin V.N., Korolyova M.A., Tzoi E.V., Lee H.S., Park Y.J., Kim M.H., Kim K.Ch. / Патент Японии JP 2000178265. publication date 27.06.2000 (Chem. Abstr., 2000. V. 133. P. 43530).
16. Krasnov V.P., Levit G.L., Bukrina I.M., Andreeva I.N., Sadretdinova L.Sh., Korolyova M.A., Kodess M.I., Charushin V.N., Chupakhin O.N. // Tetrahedron: Asymmetry. 2003. V. 14. P. 1985.
17. Potemkin V.A., Krasnov V.P., Levit G.L., Bartashevich E.V., Andreeva I.N., Kuzminsky M.B., Anikin N.A., Charushin V.N., Chupakhin O.N. // Mendeleev Comm. 2004. P. 69.
18. Krasnov V.P., Levit G.L., Kodess M.I., Charushin V.N., Chupakhin O.N. // Tetrahedron: Asymmetry. 2004. V. 15. № 5. P. 859.
19. Gruzdev D.A., Levit G.L., Krasnov V.P., Chulakov E.N., Sadretdinova L.Sh., Grishakov A.N., Ezhikova M.A., Kodess M.I., Charushin V.N. // Tetrahedron: Asymmetry. 2010. V. 21. P. 936.
20. Levit G.L., Gruzdev D.A., Krasnov V.P., Chulakov E.N., Sadretdinova L.Sh., Ezhikova M.A., Kodess M.I., Charushin V.N. // Tetrahedron: Asymmetry. 2011. V. 22. P. 185.