

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)

Институт нефтехимии и катализа - обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра Российской академии наук
(ИНК УФИЦ РАН)

На правах рукописи

Андреев Евгений Назарович

Кросс-цикломагнирование функционально замещенных 1,2-диенов,
катализируемое комплексами Ti в синтезе лембехинов.

04.06.01 «Химические науки»

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа 2019

Работа выполнена в Институте нефтехимии и катализа – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Научные руководители: –

Джемилев Усеин Меметович д.х.н.,
профессор чл. корр. РАН

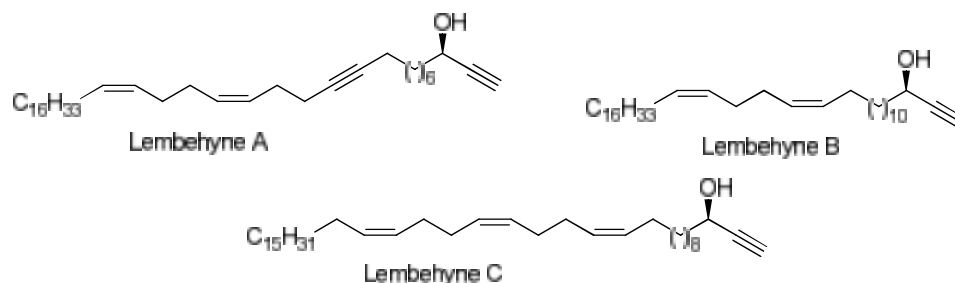
Рецензенты: –

Кунакова Райхана Валиулловна, д.х.н.,
профессор, зав. кафедрой специальной
технической технологии УГНТУ.

Халилов Леонард Мухибович, д.х.н., профессор,
заведующий лабораторией структурной химии ИНК
УФИЦ РАН.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Биомасса Мирового океана является практически неисчерпаемым источником органических соединений, проявляющих широкий спектр биологических активностей. Одним из наиболее представительных классов указанных соединений являются природные алкины, выделяемые из различных видов водорослей, пресноводных и морских цианобактерий, обладающие противоопухолевыми, антимикробными, антибактериальными, противогрибковыми и многими другими видами фармакологического действия. Недавно было обнаружено, что в индонезийских морских губках *Haliclona sp.* содержатся в микроколичествах непредельные природные ацетиленовые спирты - лембехины А-С, которые проявляют значительную нейритогенную активность по отношению к клеткам феохромацитомы PC12 и нейробластомы Neuro2A. Эти данные позволяют рассматривать природные ацетиленовые спирты в качестве основы при разработке современных препаратов для лечения таких нейродегенеративных заболеваний как болезни Альцгеймера, Паркинсона и хорей Гентингтона.



Между тем, труднодоступность и отсутствие эффективных методов синтеза природных лембехинов являются существенным сдерживающим фактором для подробного изучения их свойств и полноты раскрытия их биомедицинского потенциала.

Анализ структуры лембехинов и известных подходов к их полному синтезу показал, что наиболее сложной и многостадийной является стадия стереоселективного формирования в молекулах лембехинов 1*Z*,5*Z*-диенового фрагмента. Так, в ходе реализации полного 11 стадийного синтеза лембехина А на получение ключевого синтона - 4*Z*,8*Z*-пентакоза-4,8-диен-1-ола было затрачено 6 стадий.

Исходя из литературных данных наиболее распространенными и популярными подходами к формированию 1*Z*,5*Z*-диенового фрагмента являются методы, основанные на применении реакции Виттига, метатезис алкенов, алкилирование алкинов, а также стереоселективное восстановление 1,5-диенов.

Ранее, нами была разработана новая Ti-катализируемая реакция гомо- и кросс-цикломагнирования 1,2-диенов с помощью реактивов Гриньяра реакция Джемилева (Схема 1), которая с успехом была использована в строго стереоселективном синтезе 1*Z*,5*Z*-диенов заданной структуры, гигантских макрокарбоциклов, а также природных 5*Z*,9*Z*-диеновых кислот, проявляющих противоопухолевую активность по следующей схеме.

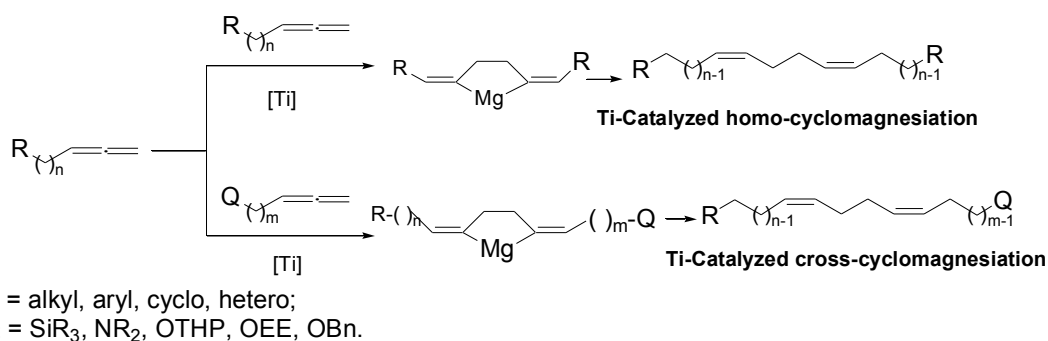


Схема 1. Ti-Катализируемое гомо- и кросс-цикломагнирование 1,2-диенов.

Опираясь на ранее полученные результаты нами выдвинута идея о возможности применения упомянутой выше реакции кросс-цикломагнирования O-содержащих и алифатических алленов в синтезе нейритогенных ацетиленовых спиртов –лембехинов А,В и С.

Цель исследования. Разработка общих регио и стереоселективных методов получения природных и синтетических лембехинов, изучение их нейритогенных и цитотоксических свойств на клеточных линиях, а также изучение закономерностей структура активность.

В рамках диссертационной работы определены следующие задачи:

- Разработать общие стереоселективные методы синтеза лембехинов А,В,С с применением на ключевой стадии разработанной в лаборатории каталитического синтеза, новой реакции каталитического кросс-цикломагнирования 1,2-диенов с помощью доступных алкилмагниийгалогенидов в присутствии катализаторага основе комплексов Ti.

-. С применением разработанных методов формирования 1Z,5Z-диеновой системы синтезировать производные лембехинов А, В и С, с различной длиной углеводородной цепи, расположенной между 1Z,5Z-диеновой группировкой и тройной связью, а также изучить влияние стереоконфигурации гидроксильной группы.

-. Для синтезированных соединений изучить нейритогенную и цитотоксическую активность *in vitro* на клеточных линиях нейробластомы Neuro 2A и феохромоцитомы PC12 с целью выбора наиболее перспективных соединений-кандидатов для предклинических исследований.

-.Изучить закономерности влияния химической структуры исследуемых соединений на проявляемую ими нейритогенную активность,с целью использования этих результатов для направленной химической модификации полученных лембехинов более активные и малотоксичные соединения - кандидаты, представляющие интерес для продвижения этих препаратов в медицинскую практику.

Научная новизна. Разработаны оригинальные и эффективные методы синтеза природных и синтетических аналогов лембехинов А-С с применением на ключевой стадии синтеза разработанной нами новой реакции Ti-катализируемого кросс-цикломагнирования O-содержащих и алифатических 1,2-диенов с помощью реактивов Гриньяра. В основе разработанных методов заложен большой синтетический потенциал для получения стереоизомерно чистых лембехинов и их аналогов. Синтезирована линейка природных

лембехинов А-С, а также с применением разработанного короткого метода получения рацемического лембехина В, основанного на кросс-цикломагнитировании алифатических и О-содержащих 1,2-диенов с диоксолановой защитой, синтезированы его длинно- (С36-С40) и короткоцепочечные (С25-С34) аналоги. Получены новые результаты по стереоселективному синтезу ацетиленовых производных лембехина В - близких структурных аналогов природных стронгилодиолов, пеллинолов и халицинонов, бис-1,3-дииндиолов, содержащих 1Z,5Z-диеновую группировку, представляющих собой аналоги выделенных ранее из морских микроорганизмов природных диацетиленов - дидеоксипетросинолов А-Д, дурина, фульвинола. Для синтезированных природных и синтетических лембехинов изучена проявляемая ими нейритогенная активность *in vitro* на клеточных линиях нейробластомы Neuro 2А и феохромацитомы РС12. Проведены исследования по изучению взаимосвязи структура-активность. Обнаружено, что с увеличением длины углеводородного радикала лембехина наблюдается достоверное уменьшение дифференцирующихся клеток и длины нейритов, а уменьшение длины цепи стимулирует дифференциацию клеток и рост нейритов. С привлечением проточной цитометрии впервые показано, что лембехин В является селективным индуктором раннего апоптоза клеточных культур Jurkat, HL-60 и K562.

Практическая ценность работы. Разработаны общие регио и стереоселективные методы синтеза лембехинов А, В, С и их производных с применением на ключевой стадии разработанной в лаборатории каталитического синтеза, новой реакции каталитического кросс-цикломагнитирования 1,2-диенов с помощью доступных алкилмагнийгалогенидов в присутствии комплексов на основе Ti. С применением разработанных методов синтезированы производные лембехинов А, В и С, в том числе с различной длиной углеводородной цепи, расположенной между 1Z,5Z-диеновой группировкой и тройной связью, а также изучено влияние стереоконфигурации гидроксильной группы. Для синтезированных соединений изучили нейритогенную и цитотоксическую активность *in vitro* на клеточных линиях нейробластомы Neuro 2А и феохромацитомы РС12 с целью выбора наиболее перспективных соединений-кандидатов для предклинических исследований. Изучили закономерности влияния химической структуры исследуемых соединений на проявляемую ими нейритогенную активность, позволяющих путем дальнейшей химической модификации получать более активные и малотоксичные соединения - кандидаты, представляющие интерес для продвижения этих препаратов в медицинскую практику.

Апробация работы и публикации Основные положения научно-квалификационной работы были представлены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях: Научная конференция грантодержателей РФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века» 2016 года, г. Москва Сборник тезисов Всероссийская научная конференция с международным участием "СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ", Новосибирск (2017 г.) Abstract book of 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry, Kazan (2017 г.) Сборник тезисов Всероссийская научная конференция с международным участием "СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ", Новосибирск (2017 г.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Оригинальные методы синтеза природных и синтетических аналогов лембехинов А, В, С.

1. Синтез рацемического лембехина В.

С целью выбора оптимального пути синтеза природных и синтетических аналогов лембехинов А, В, С первоначально был проведен ретросинтетический анализ структуры лембехина А. Так, схема получения (4*Z*,8*Z*)-пентакоза-4,8-диен-1-ола - ключевого мономера в синтезе лембехина А, основана на применении реакции кросс-цикломагнирования 1,2-нонадекадиена и тетрагидропиранового эфира 4,5-гексадиенола (Схема 2).

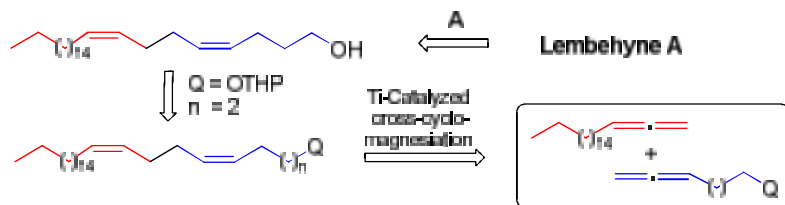


Схема 2. Ретросинтетический анализ структуры лембехина А.

На первом этапе реализации разработанной нами схемы синтеза (путь А) провели реакцию кросс-цикломагнирования 1,2-нонадекадиена (1) с тетрагидропирановым эфиром 4,5-гексадиенола (2) с помощью EtMgBr в присутствии металлического Mg (акцептора ионов галогена) и катализатора Cp_2TiCl_2 (10 мол %), с получением интермедиатного магнезациклопентана 3, последующий гидролиз которого дает тетрагидропирановый эфир (4*Z*,8*Z*)-пентакоза-4,8-диен-1-ола (4) с выходом 89% (Схема 3). Кипячение тетрагидропиранового эфира 4 в смеси MeOH-CHCl₃ (1:1) в присутствии *p*-TsOH приводит к целевому (4*Z*,8*Z*)-пентакоза-4,8-диен-1-олу (5) с общим выходом ~70%. В результате, непредельный спирт 5 в дальнейшем может быть использован в полном синтезе лембехина А.

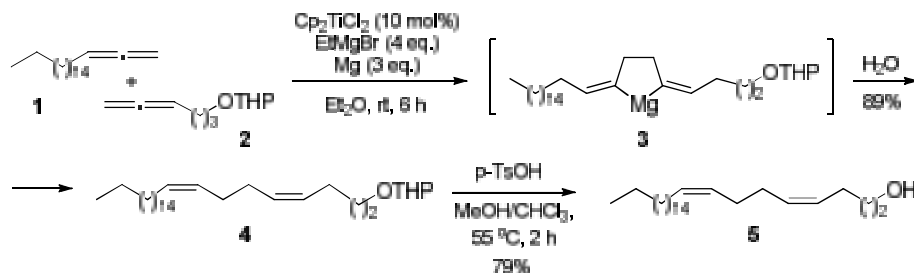


Схема 3. Короткий синтез(4*Z*,8*Z*)-пентакоза-4,8-диен-1-ола (5) - ключевого синтона при получении лембехина А.

Ретросинтетический анализ структуры лембехина В позволил нам выявить ключевой мономер - (13*Z*,17*Z*)-тетраконта-13,17-диеналь, который может быть получен через кросс-цикломагнирование 1,2-нонадекадиена с тетрагидропирановым эфиром 13,14-

магнезациклопентану **7b**, кислотный гидролиз которого дает в одну препаративную стадию (13*Z*,17*Z*)-тетраконта-13,17-диеналь (**10**) с выходом ~77% (Схема5).

Таким образом, выход (13*Z*,17*Z*)-тетраконта-13,17-диеняля по первому пути составил 64%, а по второму 77%.

На завершающем этапе в полном синтезе лембехина В провели реакцию альдегида **10** с триметилсилилацетиленидом лития, предварительно приготовленным реакцией эквимольных количеств триметилсилилацетилена с *n*-BuLi в ТГФ. После выдержки реакционной массы в течение 3 суток при комнатной температуре получили силан **11** с выходом 90%. Снятие триметилсилильной защиты с помощью тетрабутиламмоний фторида (ТБАФ) в ТГФ за 4 часа позволяет получить рацемический лембехинВ (**14**) практически с количественным выходом (Схемаб).

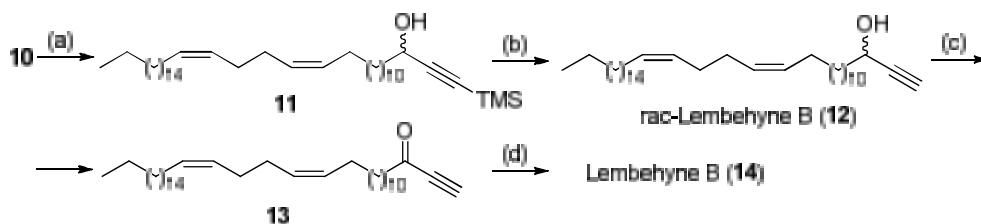


Схема 6. Синтез природного лембехина В. (а) триметилсилилацетиленид лития, ТГФ, 90%; (b) ТБАФ, ТГФ, rt, 99%; (c) периодинан Десс-Мартина, ТГФ, 86%; (d) *B*-3-пинанил-9-борабицикло[3.3.1]нонана, ТГФ, 84%.

В дальнейшем, исходя из рацемического лембехина В осуществили синтез его природного стереоизомера с 3*R*-конфигурацией гидроксильной группы при С-3 атоме углерода. Так, окислением алкинола **12** периодинаном Десс-Мартина в CH₂Cl₂ при комнатной температуре за 1 час получен (15*Z*,19*Z*)-гексаконта-15,19-диен-1-ил-3-он (**13**) с выходом 86% (Схема 6). Стереоселективное восстановление кетона **13** провели с использованием реагента *B*-3-пинанил-9-борабицикло[3.3.1]нонана (Alpine-borane), предварительно приготовленного из (+)- α -пинена (98%*ee*) и 9-борабицикло[3.3.1]нонана. В результате получили лембехин В (**14**) с выходом 84% и энантиомерной чистотой (95%*ee*).

С применением на ключевой стадии кросс-цикломагнирования 1,2-нонадиена, 1,2-декадиена, 1,2-додекадиена, 1,2-пентадекадиена, 1,2-гептадекадиена, 1,2-эйкозадиена, 1,2-докозадиена и 1,2-трикозадиена с 2-тетрадека-12,13-диен-1-ил-1,3-диоксоланом (**6b**) получена линейка длинно- (C₃₆-C₄₀) и короткоцепочечных (C₂₅-C₃₄) аналогов лембехина В **23a-h** (Схема 8).

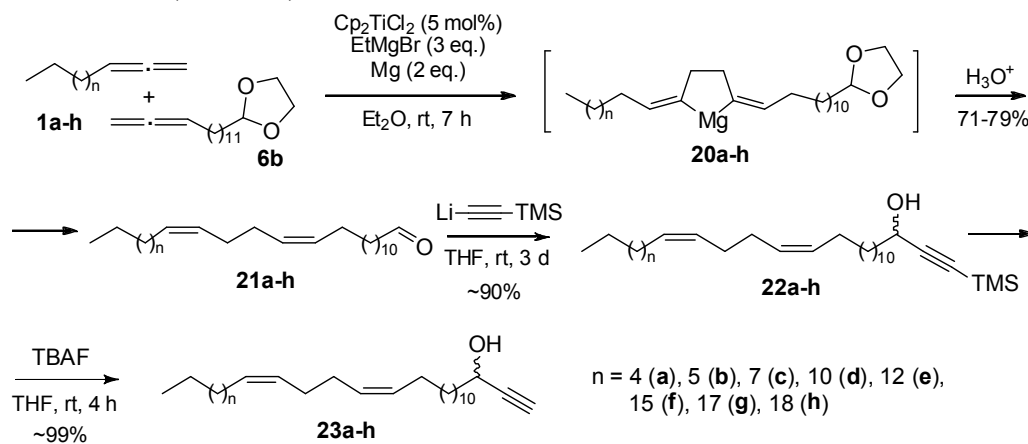


Схема 8. Синтез аналогов лембехина В.

2. Изучение биологической активности лембехинов.

Для синтезированных рацемических и природных лембехинов, а также длинно- и короткоцепочечных аналогов лембехина В была изучена проявляемая ими нейритогенная активность *in vitro* на клеточных линиях нейробластомы Neuro 2А и феохромацитомы РС12 и проведены исследования по изучению взаимосвязи структура-активность. Так, для синтезированных природных лембехинов данные по нейритогенной активности полностью воспроизводят известные в литературе данные, при этом рацемические аналоги указанных соединений проявляют несколько меньшую активность, но с сохранением обнаруженных закономерностей. Поэтому было принято решение, для первоначального скрининга в качестве объектов исследования использовать рацемические длинно- и короткоцепочечные аналоги лембехина В. Проведенные предварительные испытания *in vitro* аналогов лембехина В на клеточных линиях нейробластомы Neuro 2А и феохромацитомы РС12 показали, что все синтезированные образцы способствуют нейрональной дифференциации клеток. Кроме того обнаружено, что с увеличением длины углеводородного радикала лембехина наблюдается достоверное уменьшение дифференцирующихся клеток и длины нейритов. При этом обнаружили, что с уменьшением длины цепи наблюдается повышенная дифференциация клеток и рост нейритов. Так, наибольшую нейритогенную активность проявил аналог лембехина В с длиной цепи 25-углеродных атомов.

На основании полученных результатов нами было выдвинуто предположение о механизме нейритогенного действия лембехинов – вероятнее всего, лембехины либо напрямую или через активацию каких-либо сигнальных путей взаимодействуют с белками-циклинами, которые, в свою очередь, контролируют клеточный цикл. Данное предположение кажется наиболее вероятным, поскольку проведенные предварительные испытания лембехина В на противоопухолевую активность показали, что данное вещество также, как и стауроспорин, индуцирует ранний апоптоз в опухолевых клетках без участия каспаз.

За последние 10-15 лет из макро- и микроводорослей, пресноводных и морских цианобактерий, а также многих других морских организмов было выделено несколько сотен природных алкинов, проявляющих высокую противоопухолевую активность. Между тем, в литературе отсутствуют какие-либо сведения о противоопухолевой активности природных лембехинов. Поэтому для синтезированного лембехина В нами впервые были проведены испытания на противоопухолевую активность *in vitro* на клеточных линиях лейкемии (Jurkat, HL-60 и K562), включающие определение IC50, а также изучение жизнеспособности клеток и влияния на клеточный цикл с применением проточной цитофлуориметрии.

Количественный и качественный анализ жизнеспособности клеток, клеточного цикла и апоптоз индуцирующей активности лембехина В проводили с помощью наборов реагентов GuavaNexinReagent, GuavaCellCycle и GuavaViaCount (Millipore).

Цитотоксическая активность лембехина В *in vitro* по отношению к клеткам лейкемии человека Jurkat, HL-60 и K562 была исследована с помощью набора GuavaViaCount (Millipore). Лембехин В в концентрациях от 0.5 до 4 μM проявил выраженный цитотоксический эффект по отношению ко всем исследуемым типам раковых клеток. Однако наибольший IC_{50} был получен для клеточной линии K562 (3 μM), тогда как для Jurkat и HL-60 IC_{50} составил 2 μM и 2,2 μM , соответственно.

Для выявления апоптоза в культурах клеток Jurkat, HL-60 и K562 под действием лембехина В был использован метод детекции экстернализации фосфатидилсерина на плазматической мембране после обработки культуры клеток данным веществом. Следует отметить, что эффект лембехина на индукцию апоптоза в клетках Jurkat более выражен по сравнению с другими типами клеток, что согласуется с более высокой цитотоксичностью соединения по отношению к клеткам данной клеточной линии. Как видно из рисунка 1, воздействие лембехина В на культуру опухолевых клеток Jurkat приводит к значительному дозозависимому повышению количества апоптотических клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза. Наиболее высокий процент раннего апоптоза (72,6%) наблюдается при концентрации вещества 2 μM . В частности, как показано на рисунке 1, для клеток линии Jurkat наблюдается увеличение как ранних, так и поздних стадий апоптоза, по сравнению с HL60 ($p \leq 0,0001$) и K562 ($p \leq 0,0001$).

В результате, лембехин В по данным нашего исследования клеточного цикла с помощью GuavaCellCycleReagent оказался мощным индуктором гиподиплоидной популяции клеток (суб-G1 фаза) во всех трех клеточных линиях после соответствующей обработки исследуемым веществом. Не было выявлено никаких существенных различий по распределению субпопуляций клеток клеточного цикла, обработанных Лембехином В Jurkat, HL-60 и K562 клеточных линий.

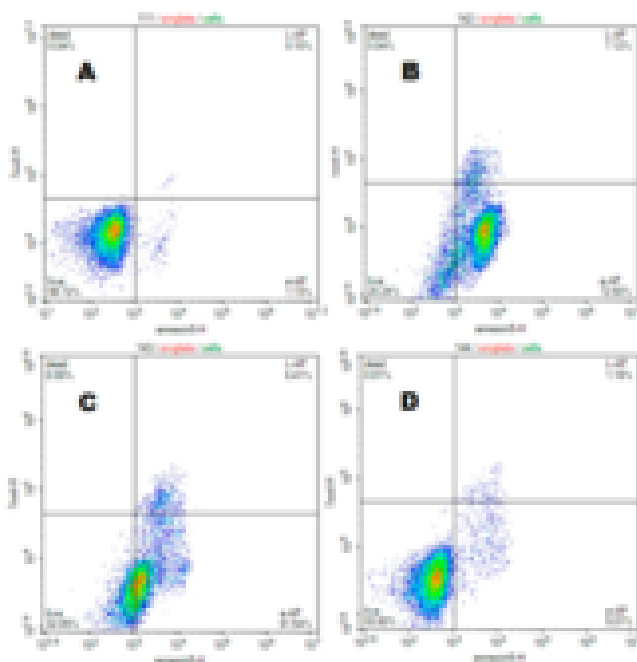


Рисунок 1. Опухолевая клеточная линия Jurkat обработанная различными концентрациями лембехина В (**14**), окрашенная с помощью annexine V/PI и проанализированная с применением проточной цитофлуориметрии. (A) Контроль; (B) **14** (2 μM); (C) **14** (1 μM); (D) **14** (0.5 μM).

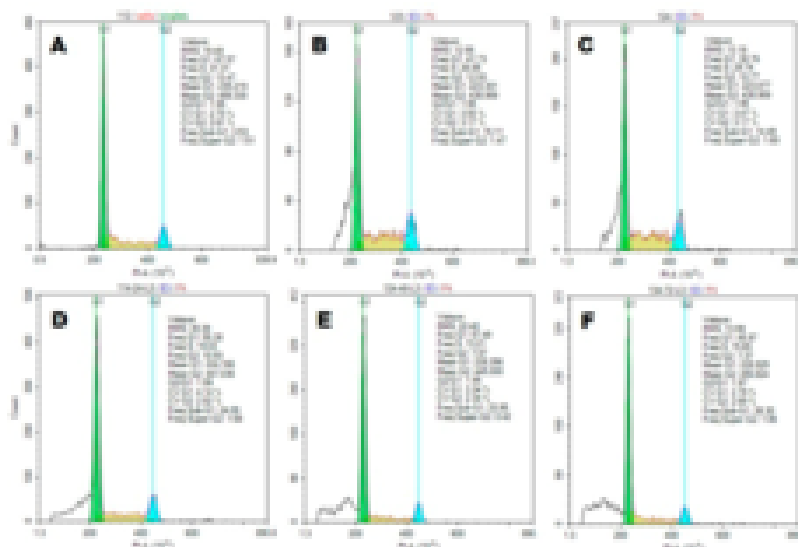


Рисунок 2. Фазы клеточного цикла на клетках Jurkat обработанных лембехином В. Верхний ряд: 1 - контроль, 2 - 2 μL , 3 - 1 μL . Нижний ряд: (2 μL) 1 - 24 ч., 2- 48 ч., 3 - 72 ч.

Таким образом, нами разработан новый, эффективный короткий путь синтеза лембехина А и оригинальный стереоселективный метод синтеза лембехин В с применением на ключевой стадии синтеза разработанной нами новой реакции Ti-катализируемого кросс-цикломагнирования О-содержащих и алифатических 1,2-диенов с помощью реактивов Гриньяра. В основе разработанных методов заложен большой синтетический потенциал для получения стереоизомерно чистых лембехинов и их аналогов варьированием структуры исходных 1,2-диенов.

Разработанные нами реакции и эффективные методы позволили синтезировать широкую линейку рацемических и природных лембехинов. Кроме того, с применением разработанной схемы синтеза рацемического лембехина В синтезированы его длинно- (С36-С40) и короткоцепочечные (С25-С34) аналоги.

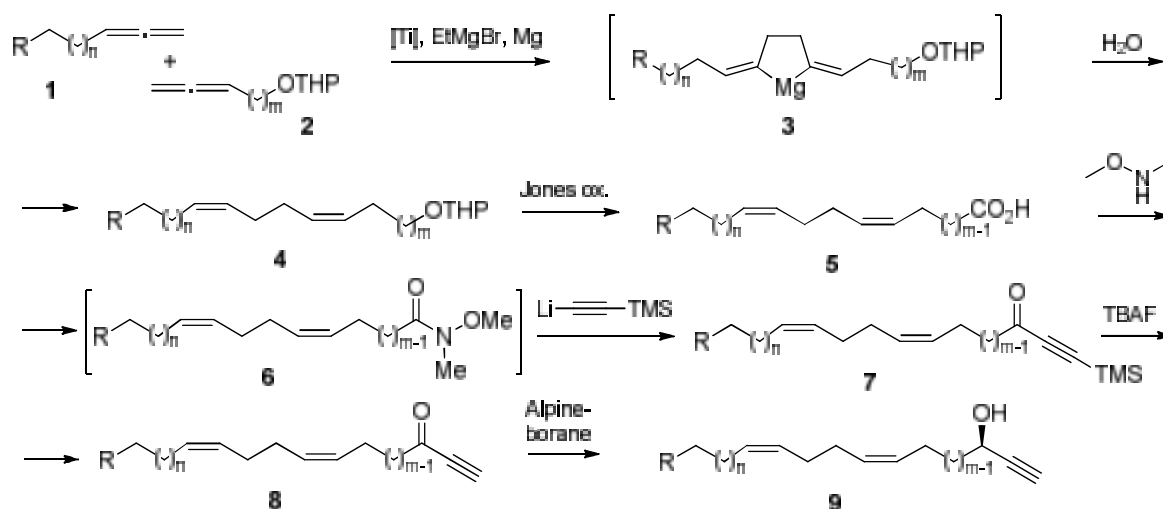
Для синтезированных природных и синтетических лембехинов изучена проявляемая им нейритогенная активность *in vitro* на клеточных линиях нейробластомы Neuro 2А и феохромоцитомы PC12, а также проведены исследования по изучению взаимосвязи структура-активность. Обнаружено, что с увеличением длины углеводородного радикала лембехина наблюдается достоверное уменьшение дифференцирующихся клеток и длины нейритов, а уменьшение длины углеводородной цепи в молекуле лембехинов стимулирует дифференциацию клеток и рост нейритов.

С привлечением проточной цитометрии впервые было показано, что лембехин В является селективным индуктором раннего апоптоза клеточных культур Jurkat, HL-60 и K562.

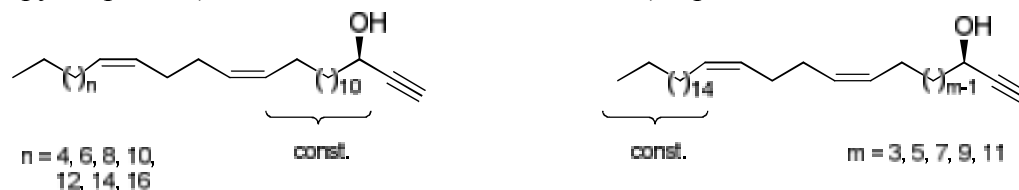
3. Альтернативный метод синтеза рацемического лембехина В и его длинно- и короткоцепочечных аналогов.

С целью оптимизации, ранее предложенной, схемы синтеза лембехина В и его аналогов нами разработан новый малостадийный метод синтеза указанных соединений, основанный на последовательном получении высших непредельных карбоновых кислот **5** с использованием на ключевой стадии реакции кросс-цикломагнирования алифатических 1,2-диенов и тетрагидропирановых эфиров алленовых спиртов, синтеза амида Вайнреба **6** и, через промежуточное получение кетонов **8**, стереоселективного формирования терминального пропаргилового фрагмента (Схема 1) с получением целевых нейритогенных алкиновых спиртов **9** с выходами более 60%.

Схема 1



На основе разработанной схемы синтеза с целью установления закономерностей влияния положения 1Z,5Z-диеновой группировки в молекуле лембехина относительно терминальной тройной связи на проявляемую ими нейритогенную активность осуществлен синтез соответствующих аналогов варьированием числа ($m = 3, 5, 7, 9, 11$) метиленовых звеньев, разделяющих алленовую и гидроксигруппы в 1,2-диенах ($R = \text{CH}_3$, $n = 15$) (Схема 1), а также изменением длины алкильного радикала при 1Z,5Z-диеновой группировке ($R = \text{CH}_3$, $n = 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16$), при $m = 11$.



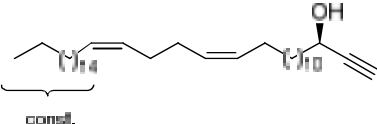
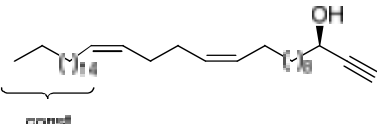
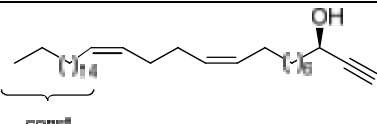
4. Биологические испытания производных лембехинов на проявляемую ими нейритогенную и противоопухолевую активность.

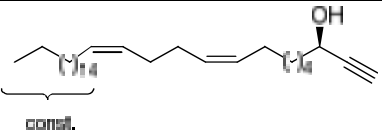
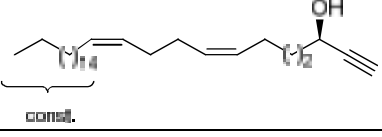
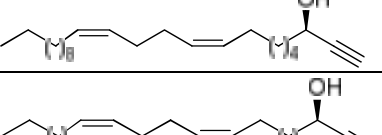
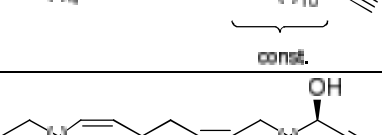
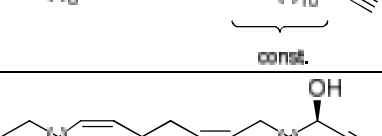
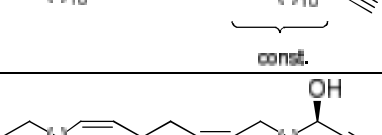
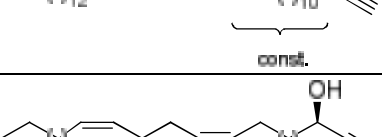
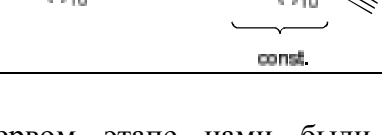
Оценка цитотоксичности лимбехинов и их производных (всего было исследовано 11 соединений) проводилась с помощью проточного цитофлуориметра с использованием набора Guava ViaCount (Millipore). Были исследованы следующие клеточные линии: Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия, человек), K562 (хроническая миелогенная лейкемия,

человек), U937 (гистиоцитарная лимфома, человек), HeLa (карцинома шейки матки, человек), HEK293 (клетки из эмбриональных почек человека), а также линии PC12, PC19 и Neuro2A. Клеточная линия PC12 представляет собой нейроэндокринные клетки опухоли мозгового слоя надпочечников крысы, линия PC19 – эмбриональные клетки тератокарциномы мыши и Neuro2A - клетки нейробластомы мыши (albino). Последние три линии являются удобной моделью для исследования механизмов нейрональной дифференцировки и действия нейротрофных факторов.

Клетки инкубировались в отсутствии (контроль) или в присутствии различных концентраций исследуемых соединений. После 24-48ч культивирования клеток и исследуемых препаратов в питательной среде, содержащей фетальную бычью сыворотку при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в каждую лунку добавляли по 10 мкл Guava ViaCount (Millipore). Через 30 мин экспозиции при 37°C в темноте клеточную суспензию анализировали на проточном цитофлуориметре. Краситель 7AAD проникает и окрашивает только мертвые клетки. Количество живых клеток нормировалось относительно количества в контрольных образцах (без добавок исследуемых компонентов), которое приравнивалось к 100%. Нейритогенез оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии, фиксируя на фотоснимках морфологические изменения клеток и подсчитывая число клеток с нейритами, длина которых превышает длину тела нейрона. Количество клеток с нейритами нормировалось относительно количества клеток в контрольных образцах без нейритов и без добавления исследуемых соединений, которое приравнивалось к 100%.

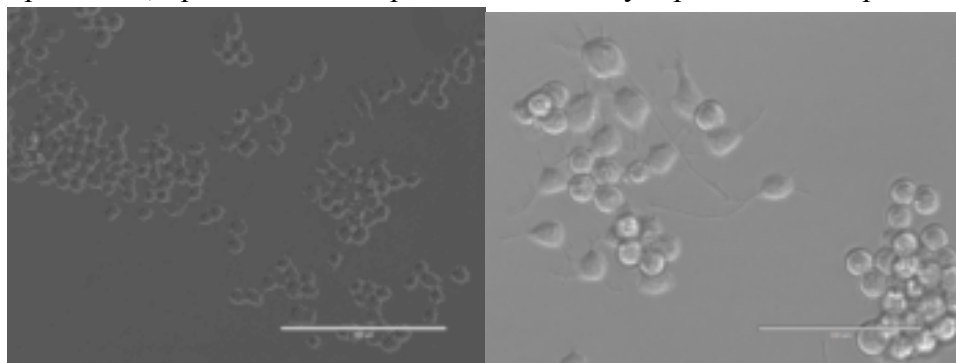
Таблица 1. Свойства лимбехинов.

№	Структурная формула	Цитотоксичность, IC50					Нейритогенез		
		Концентрация соединения, при которой гибнет более половины клеток в течение 72 ч, мкМ					Количество клеток с нейритами, длина которых превышает длину тела нейрона на каждые 100 клеток, при концентрации в-ва 0.2 нМ, инкубация 72 ч, %		
		Jurkat	K562	U937	HELA	HEK293	PC12	PC19	Neuro2A
L1		2	3,1	4,1	3,4	3,8	15	27	37
L2		0,25	0,4	0,5	0,4	0,8	30	28	42
L3		6	4	2	4	2	5	4	5

L4		0,05	0,05	0,1	1	1	53	50	68
L5		0,1	0,5	0,4	0,4	0,8	46	38	54
L6		0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	44	48	51
L7		0,22	0,3	0,25	0,4	0,4	30	28	29
L8		0,4	0,4	0,2	0,8	0,2	28	31	34
L9		0,4	0,4	0,2	1	0,2	15	16	27
L10		2	1	1	4	1	8	9	12
L11		2	2	4	6	2	5	10	14

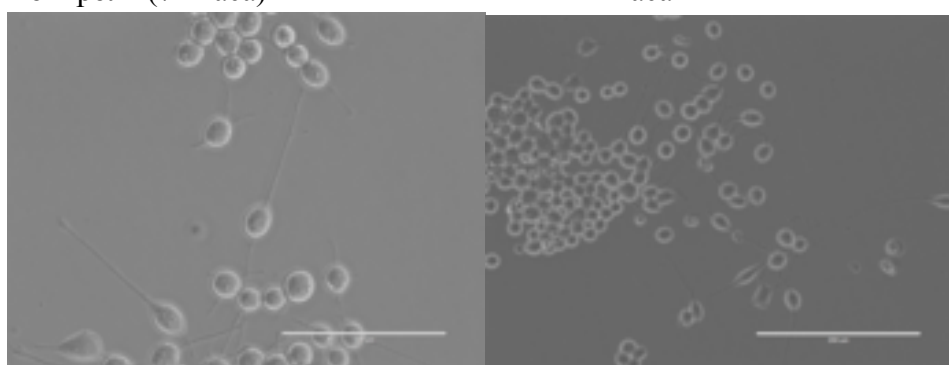
На первом этапе нами были исследованы 11 лембехинов с различной длиной углеводородного радикала. Исследование цитотоксичности данных соединений в отношении опухолевых клеток следующих линий: Jurkat, K562, U937, HeLa и эмбриональных клеток НЕК293 показало, что наиболее высокая цитотоксичность была характерна для соединений L4, L5 и L6, причем для суспензионных культур (Jurkat, K562, U937) данные соединения проявили более высокую цитотоксичность, чем в отношении адгезионных культур. Наиболее высокая цитотоксичность была характерна для L4. Так же, как и остальные исследованные нами лембехины, L4, L5 и L6 стимулировали рост нейритов в трех клеточных линиях PC9, PC12 и Neuro2A, однако в отличие от всех других соединений, их дифференцирующая активность была очень высока и проявлялась уже при низких концентрациях (рис.1, табл.1). При увеличении времени инкубации с лембехинами, процесс дифференцировки усиливался, происходило ветвление и увеличение длины нейритов (рис.2). Также получены интересные результаты при сравнении клеток линии Neuro2A после инкубации в среде с добавлением фактора роста нервов (NGF) в концентрации 2500 пг/мл с клетками, которые инкубировались без NGF, но с добавлением соединения L4. На рисунке 4 хорошо видно заметное преимущество в отношении длины и ветвлении нейритов у клеток, инкубируемых в среде с соединением

L4. Т.е., вполне возможно, действие соединения L4 по активности не уступает NGF, однако для более четкого понимания процессов, происходящих в клетках под воздействием лембехинов необходимо дальнейшее исследование молекулярных процессов, происходящих при лембехин-индуцированном нейритогенезе.



Контроль (72 часа)

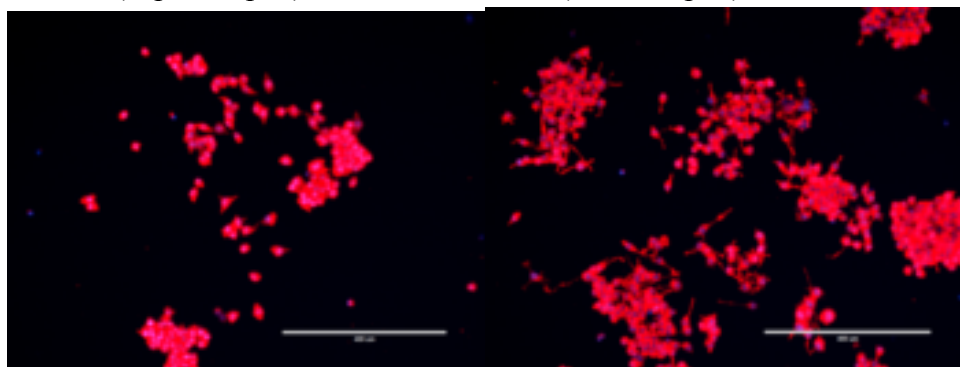
24 часа



48 часов

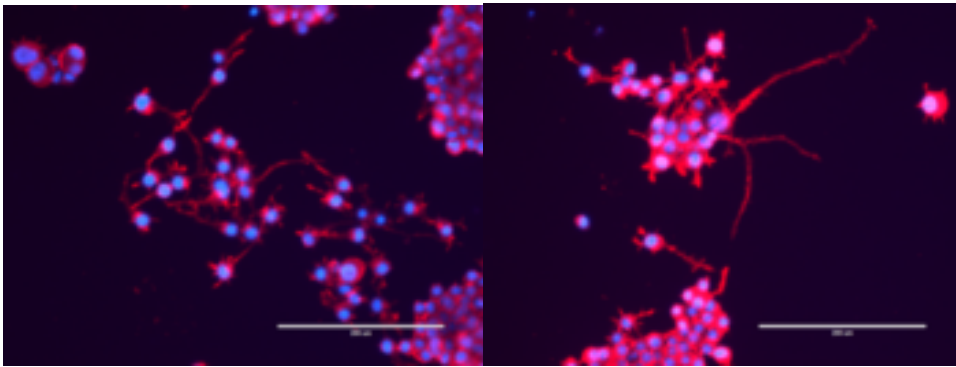
72 часа

Рисунок 1. Фазово-контрастная микроскопия нейритогенеза в клетках Neuro2A под действием L4 в концентрации 0,2 нМ. Время инкубации контрольного образца – 72 часа, 24 часа (верхний ряд) или 48 и 72 часов (нижний ряд).



Контроль 72 часа

24 часа



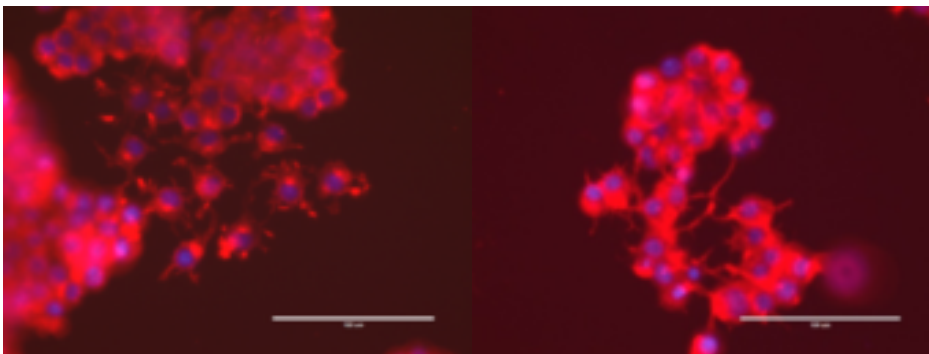
48 часов

72 часа

Рисунок 2. Нейритогенез в клетках линии Neuro2A с различным временем инкубации, индуцированный добавлением соединения L4 в концентрации 0,2 nM и NGF (2500 пг/мл). Окраска клеток DAPI и ActinRedTM 555 ReadyProbesTM Reagent (InvitrogenTM).

NGF(48)

L4(48)



NGF(72)

L4(72)

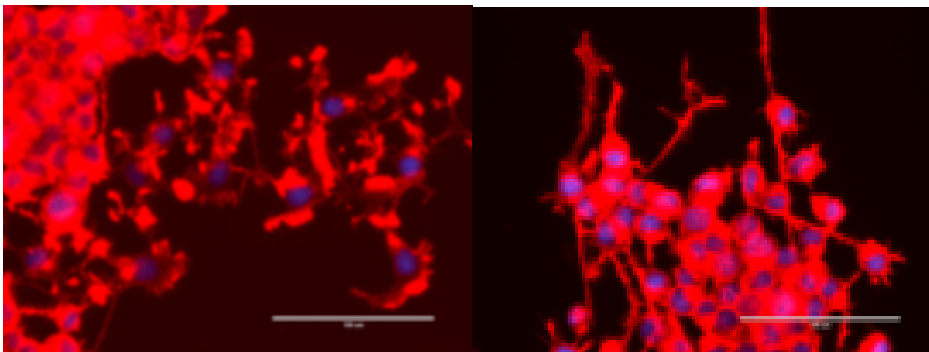


Рисунок 3. Дифференцировка клеток линии Neuro2A при инкубации в течении 48-72 часов только с добавлением в культивационную среду соединения L4 (справа) и отдельно добавления NGF (фактора роста нервов) (слева). Концентрация L4 – 0,2 nM, NGF – 2500 пг/мл. Окраска клеток DAPI и ActinRedTM 555 ReadyProbesTM Reagent (InvitrogenTM).

Такие процессы, происходящие в клетке как апоптоз, некроз, митоз, нейритогенез, находятся под генетическим контролем, а именно, контролируются клеточным циклом. Поэтому для исследования процессов дифференцировки и апоптоза в клетках Jurkat, K562, U937, HeLa, HEK293, PC12, PC19 и Neuro2A необходимо проанализировать кинетику клеточного цикла и сделать возможные предположения о молекулярных механизмах, происходящих в клетке под влиянием различных лембехинов. Нами были выбраны три соединения L4, L5 и L6, показавшие наибольшую цитотоксическую активность и

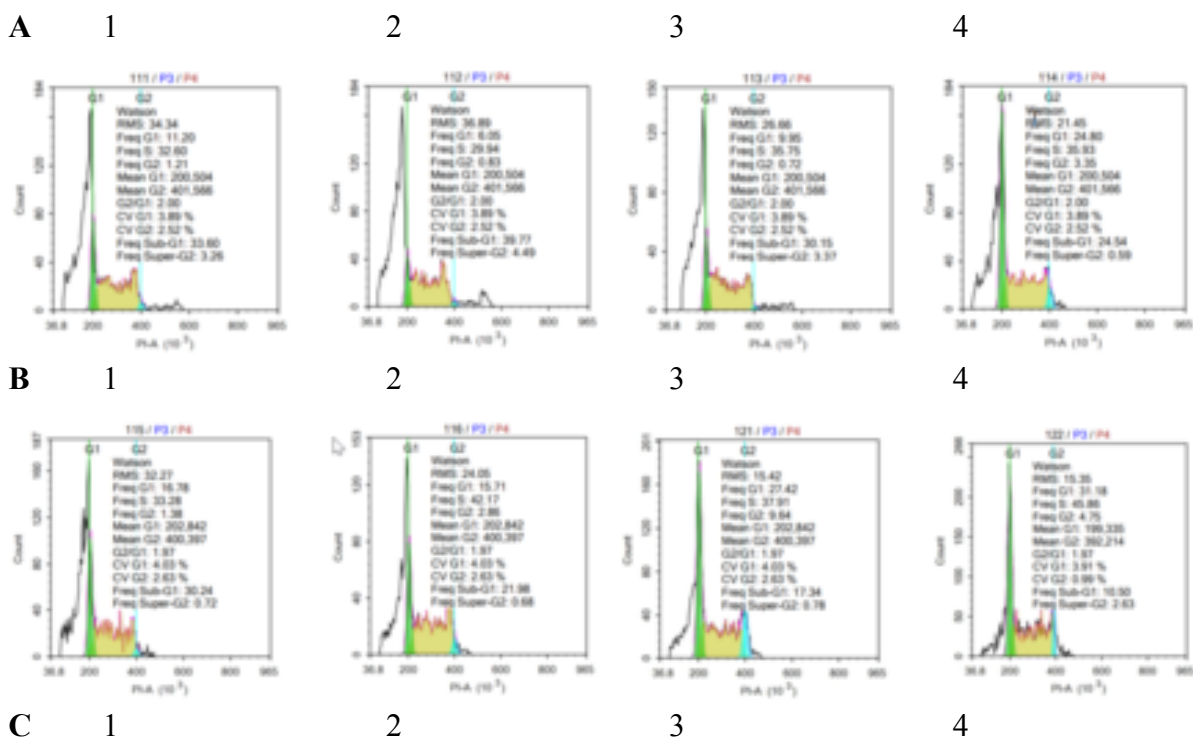
достаточно высокий потенциал в отношении индукции нейритогенеза в клетках PC12, PC19 и Neuro2A.

На рисунке 4 представлены результаты исследования показателей кинетики клеточного цикла клеток линии Jurkat, определяемых методом проточной цитофлуориметрии, после обработки их соединениями L4, L5 и L6 в разных концентрациях через 48 часов.

Показатели клеточного цикла в культурах Jurkat, K562, U937, HeLa и НЕК293 в контрольных образцах характеризовались значительным преобладанием клеток, находящихся в фазе G0-G1 и наличием баланса между процессами синтеза (S-фаза) и апоптоза (интервал sub-G0-G1).

Через 2 суток после экспозиции соединений L4, L5 и L6 практически во всех клеточных опухолевых линиях, в большей степени в суспензионных Jurkat, K562, U937, преобладали процессы апоптоза (увеличение интервала sub-G0-G1) при сохраненной и даже несколько повышенной способности клеток к синтезу ДНК (S-фаза). При этом отмечалось уменьшение доли клеток, находящихся в фазе G0-G1, наряду с увеличением блока пролиферации и снижением индекса пролиферации за счет уменьшения количества клеток в фазе G2 + M (рисунок 4).

Все вышеперечисленное может свидетельствовать о цитотоксической активности соединений L4, L5 и L6 по отношению к клеткам хронической миелоидной и Т-клеточной лейкемии, а также гистиоцитарной лимфомы, обусловленной способностью данных соединений индуцировать апоптоз.



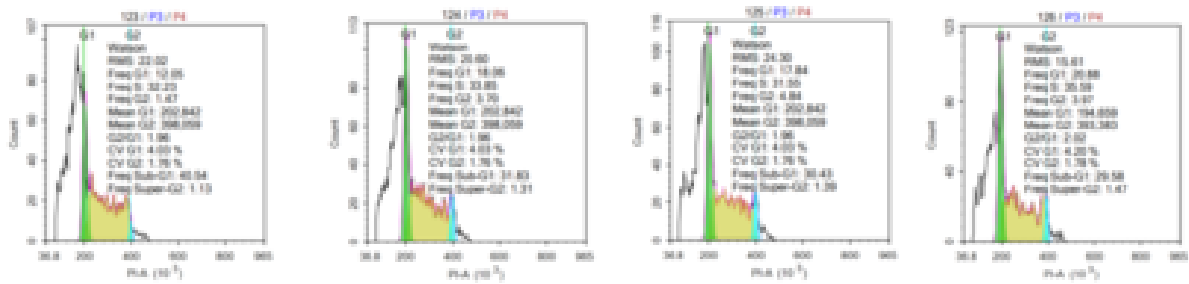
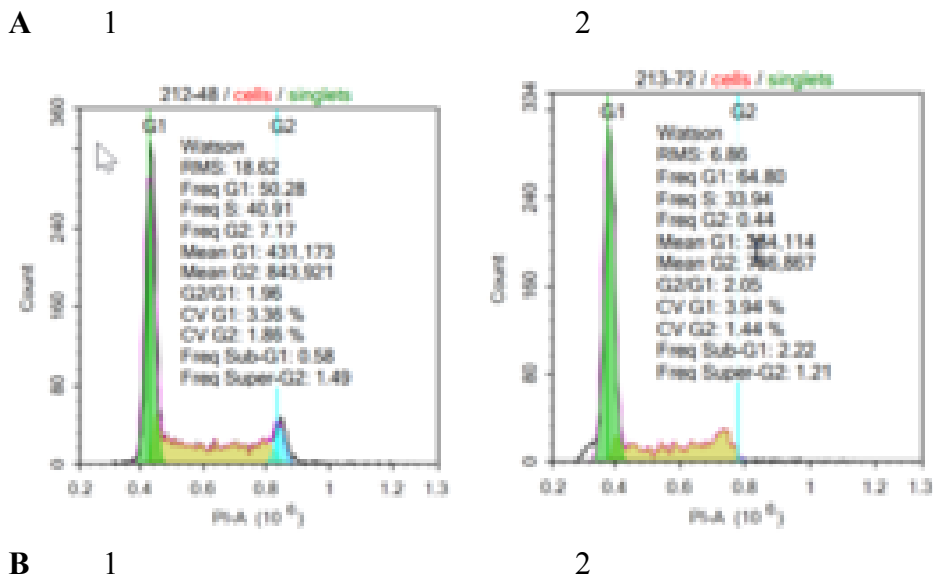


Рисунок 4. Фазы клеточного цикла на клетках Jurkat, обработанных соединениями L4, L5 и L6. (A) 1)L4 (2 μM); 2)L4 (1 μM); 3)L4 (0.5 μM); 4)L4 (0.2 μM) (B) 1)L5 (2 μM); 2)L5 (1 μM); 3)L5 (0.5 μM); 4)L5 (0.2 μM) (C) 1)L6 (2 μM); 2)L6 (1 μM); 3)L6 (0.5 μM); 4)L6 (0.2 μM) (Время инкубации веществ L4, L5 и L6 4 с клетками – 48 часов).

Совершенно иная картина клеточного цикла при проточной цитометрии наблюдается при обработке клеток линий PC12, PC19 и Neuro2A исследуемыми лембехинами L4, L5 и L6 (Рисунок 5). На рисунке 5 при воздействии всех трех лембехинов наблюдается практически одинаковая картина – инкубация клеток Neuro2A с исследуемыми соединениями приводит сначала к несколько повышенной способности клеток к синтезу ДНК (повышение S-фазы), а затем, к концу 3-х суток к выраженному снижению S- и G2 фаз, т.е. к почти полному исчезновению клеток в процессе митоза. Данные результаты проточной цитометрии клеточного цикла в совокупности с изображением клеток, полученным после иммуногистохимического окрашивания и флуоресцентной микроскопии позволяют утверждать, что, скорее всего, клетки нейробластомы мыши, также как нейроэндокринные клетки опухоли мозгового слоя надпочечников крысы (линия PC19) и эмбриональные клетки тератокарциномы мыши (линия PC12), проходят процесс дифференцировки.



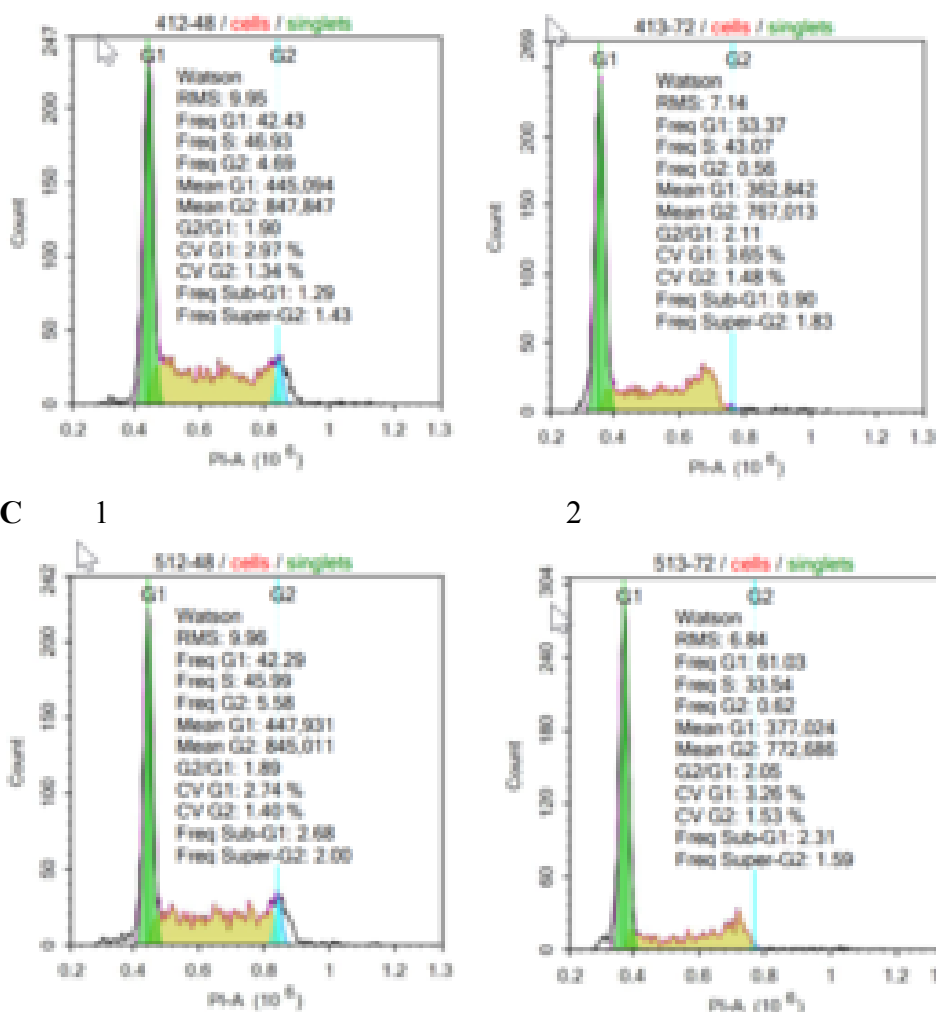


Рисунок 5. Фазы клеточного цикла на клетках Neuro2A, обработанных соединениями L4 (0,05 nM), L5 (0,1 nM) и L6 (0,2 nM) инкубированных с исследуемыми соединениями в течении 48 (1) и 72 (2) часов, соответственно.

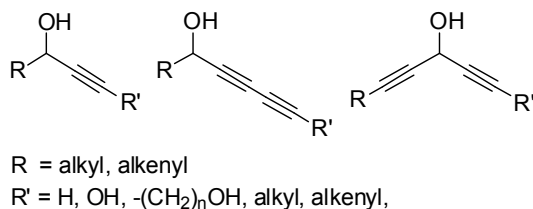
Таким образом, синтезированные лембехины и их аналоги обладают выраженной апоптоз индуцирующей активностью в отношении пяти опухолевых клеточных линий Jurkat, K562, U937, HeLa и HEK293 и нейритогенной активностью в отношении клеточных культур PC12, PC9 и Neuro2A. Кроме того установлено, что лембихины по разному действуют на клеточный цикл в разных типах тканей – в клетках нейронального происхождения данные соединения, вероятно, ингибируют белки-циклины и циклинзависимые протеинкиназы, и, тем самым, являются в полной мере ингибиторами клеточного цикла и активаторами процессов дифференцировки, тогда как в опухолевых клетках эпителиального происхождения лембехины вызывают апоптоз.

5. Синтез ацетиленовых производных лембехина В.

Высшие ацетиленовые спирты и их производные содержатся в большом числе различных видов растений, водорослей, морских беспозвоночных и высших грибов, и к настоящему времени выделено и идентифицировано более 1000 ацетиленовых соединений. На протяжении многих лет наблюдается все возрастающий интерес к этому классу

органических соединений, во многом благодаря проявляемым ими важным биологическим активностям, включая, противоопухолевую, противомикробную, антипаразитарную, антибактериальную, противогрибковую и многие другие.

При всем многообразии известных на сегодня природных алкинолов, наибольшую распространенность имеют производные карбинолов, содержащие одну или несколько тройных связей в α -положении к гидроксильной группе.

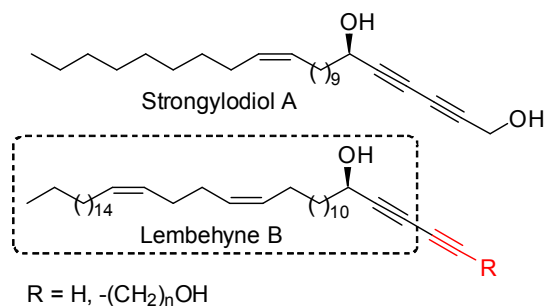


Согласно литературным данным, недавно японскими исследователями выделены из индонезийских морских губок *Haliclona sp.* высшие алкинолы - лембехины А-С, содержащие в своей структуре бис-метиленразделенные *Z*-двойные связи, которые в наноконцентрациях проявляют высокую нейритогенную активность на клетках мышечной нейробластомы Neuro2A и феохромоцитомы крыс P12.

Указанные выше результаты позволяют рассматривать данные соединения в качестве основы при разработке на их основе современных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера, Паркинсона, хорей Хантингтона и др.).

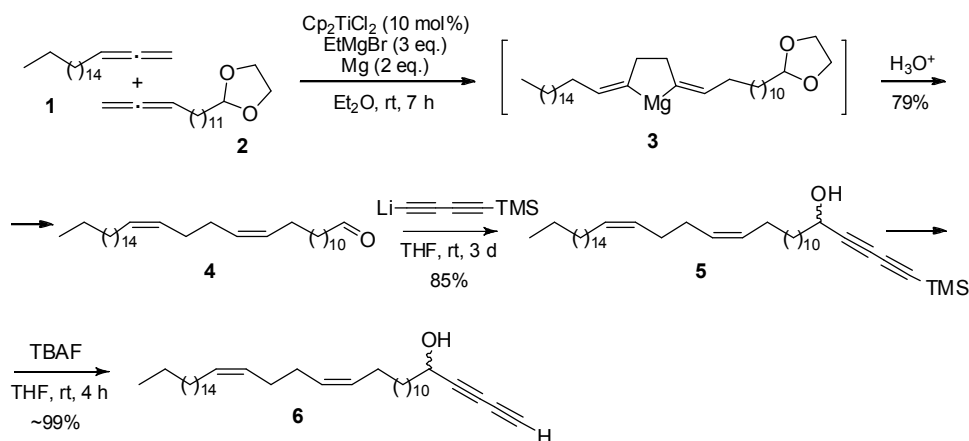
Следует отметить, что исследования в данном направлении существенно сдерживаются из-за крайне низкого содержания лембехинов в морских губках и отсутствия эффективных методов их полного синтеза. В связи с вышеизложенным нами были предприняты исследования с целью разработки оригинальных и стереоселективных подходов к получению как ключевых исходных мономеров, так и полного метода синтеза лембехинов А и В, с применением открытой нами реакции Ti-катализируемого кросс-цикломагнирования кислород-содержащих и алифатических 1,2-диенов с помощью реактивов Гриньяра. Кроме того, с привлечением проточной цитофлуориметрии нами впервые было показано, что лембехин В является индуктором раннего апоптоза в клетках различных видов лейкемии.

В развитие исследований по разработке стереоселективных методов синтеза производных лембехинов, а также изучения влияния их структуры на проявляемую противоопухолевую и нейритогенную активность в рамках данной диссертационной работы впервые осуществлены стереоселективные синтезы ацетиленовых производных лембехина В - близких структурных аналогов природных стронгилодиолов, пелинолов и халицинонов, проявляющих широкий спектр биологических активностей. Кроме того, нами уделено особое внимание изучению противоопухолевой и нейритогенной активности синтезированных соединений с привлечением современных методов проточной цитофлуориметрии и фазово-контрастной микроскопии.



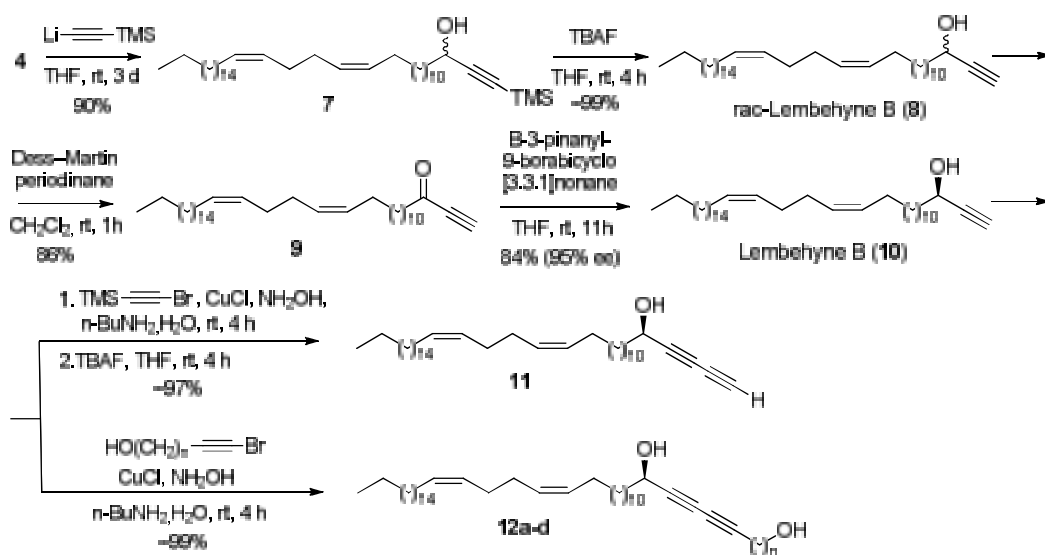
В соответствии с разработанной ранее схемой получения рацемического лембехина В, на первом этапе исследования нами осуществлен синтез (13*Z*,17*Z*)-тетраконта-13,17-диеналеа (**4**) реакцией кросс-цикломагнирования 1,2-нонадекадиена (**1**) и 2-тетрадека-12,13-диен-1-ил-1,3-диоксолана (**2**) с помощью EtMgBr в присутствии металлического Mg и каталитических количеств Cp_2TiCl_2 (10 mol.%) (**1**:**2**:EtMgBr:Mg:[Ti] = 12:10:30:20:0.1, Et_2O , 20–22°C, 7ч), с выходом 79% (Схема 1). На втором этапе последовательными реакциями альдегида **4** с предварительно полученным 1-литий-4-триметилсилил-1,3-бутадиеном, и снятием триметилсилильной группы с помощью триметилбутиламмоний фторидом (TBAF) в ТГФ был получен целевой 1,3-дииновый аналог гас-лембехина В **6** с выходом ~66% (Схема 1).

Схема 1



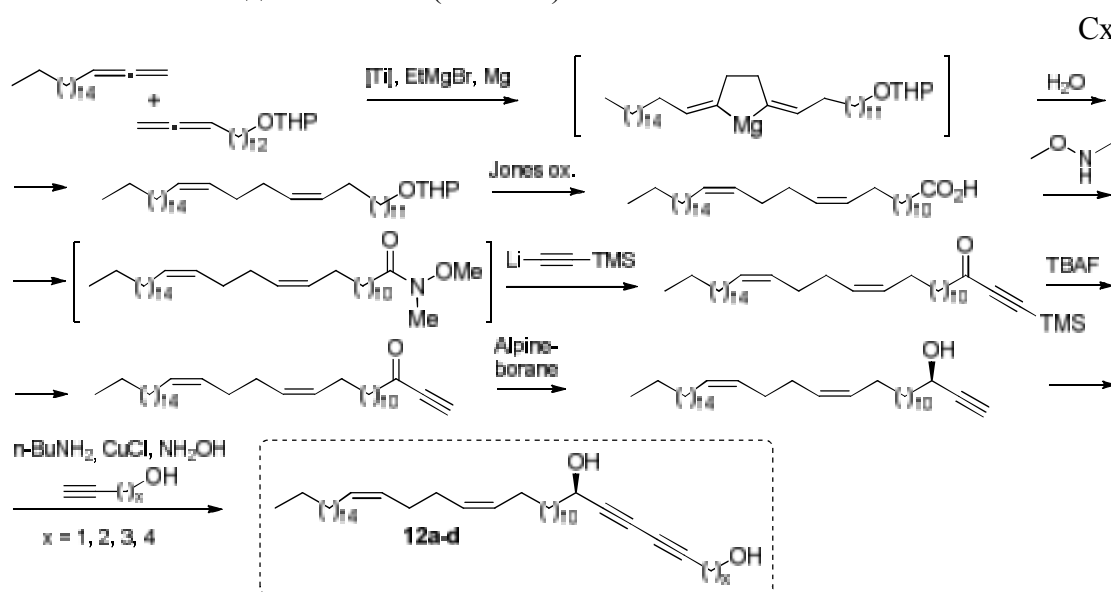
С целью выяснения влияния стереоконфигурации гидроксильной группы в ацетиленовых производных лембехина В нами разработан оригинальный метод синтеза последних, с *R*-конфигурацией гидроксильной группы, путем присоединением соответствующих 1-бромалкинов непосредственно к молекуле лембехина В, синтезированному на основе альдегида **4** по схеме 2:

Схема 2



Так, согласно разработанной ранее схеме нами осуществлен синтез рацемического **8** и природного лембехина **B (10)**, последовательными реакциями присоединения триметилсилацетиленида лития к альдегиду **4**, депротекции образующегося алкина **7**, окисления спирта **8** и стереоселективного восстановления кетона **9** на завершающей стадии синтеза. Реакции природного лембехина **B (10)** с 1-бром-2-триметилсилацетиленом или 1-бром-2-(ω -гидроксиалкил)ацетиленами под действием CuCl привели к целевым 1,3-дииновым аналогам лембехина **B 11** и **12a-d** с высокими выходами (50-67%).

Кроме того, с применением последовательных реакций Ti -катализируемого кросс-цикломагнирования, синтеза амида Вайдреба, присоединения триметилсилацетилена, а также стереоселективного восстановления образующегося кетона удалось сократить количество стадий выделения промежуточных продуктов реакции при получении природного лембехина **B** и разработать альтернативный метод синтеза его ацетиленовых аналогов **12a-d** с выходами 59-74% (Схема 3).



На следующем этапе мы приступили к изучению противоопухолевой и нейритогенной активности синтезированных 1,3-диинов в сравнении с исходным лембехином **B**.

Оценка цитотоксичности производных лимбехина В и их производных (всего было исследовано 6 соединений) проводилась с помощью проточного цитофлуориметра с использованием набора Guava ViaCount (Millipore). Были исследованы следующие клеточные линии: Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия, человек), K562 (хроническая миелогенная лейкемия, человек), U937 (гистиоцитарная лимфома, человек), HeLa (карцинома шейки матки, человек), Нек293 (клетки из эмбриональных почек человека), а также клетки линии Neuro2A. Клеточная линия Neuro2A представляет собой клетки нейробластомы мыши (albino) и является удобной моделью для исследования механизмов нейрональной дифференцировки и действия нейротрофных факторов.

Нами были исследованы два ацетиленовых производных **6** и **11**, основанные на рацемической и природной форме лимбехина В, а также четыре ω-гидрокси-1,3-диинового аналогов лимбехина В (**10**) с различным удалением гидрокси-группы от 1,3-диинового фрагмента **12a-d**. Исследование цитотоксичности данных соединений в отношении опухолевых клеток следующих линий: Jurkat, K562, U937, HeLa и эмбриональных клеток Нек293 показало, что 1,3-диин **6**, полученный на основе рацемического лимбехина В проявляет несколько меньшую цитотоксическую активность в отношении испытанных клеточных линий по сравнению с его аналогом **11**, синтезированным на основе природного лимбехина В. Наиболее высокая цитотоксичность характерна для соединения **12c**, причем для суспензионных культур (Jurkat, K562, U937) данное соединение проявило более высокую цитотоксичность, чем в отношении адгезионных культур (Таблица 1).

Таблица 1. Цитотоксическая и нейритогенная активности аналогов лимбехина В.

	Цитотоксичность, CC_{50} , μM (24 ч)					Нейритогенез [*]
	Jurkat	K562	U937	HeLa	HEK293	72 ч, % Neuro 2A
12a	0.55	0.61	0.52	1.17	0.97	54
12b	0.47	0.54	0.51	1.01	0.88	61
12c	0.34	0.37	0.32	0.79	0.67	72
12d	0.52	0.59	0.49	1.35	1.12	68
6	0.69	0.74	0.61	1.42	1.28	44
11	0.65	0.71	0.58	1.38	1.25	49
10	0.53	0.69	0,56	2.84	2.11	56
NGS	-	-	-	-	-	44

*Максимальное количество клеток с нейритами, длина которых превышает длину тела нейрона, наблюдается в диапазоне концентраций 0,2 нМ, инкубация 72 ч в %.

Так, в концентрации 0.60 $\mu\text{M}/\text{ml}$ исследуемое производное лимбехина В при воздействии на клетки линии Jurkat вызывает апоптоз в 87% всех опухолевых клеток (рисунок 1А), причем на ранний апоптоз (Q7-4) приходится 15%, а на поздний (Q7-2) – более 71%.

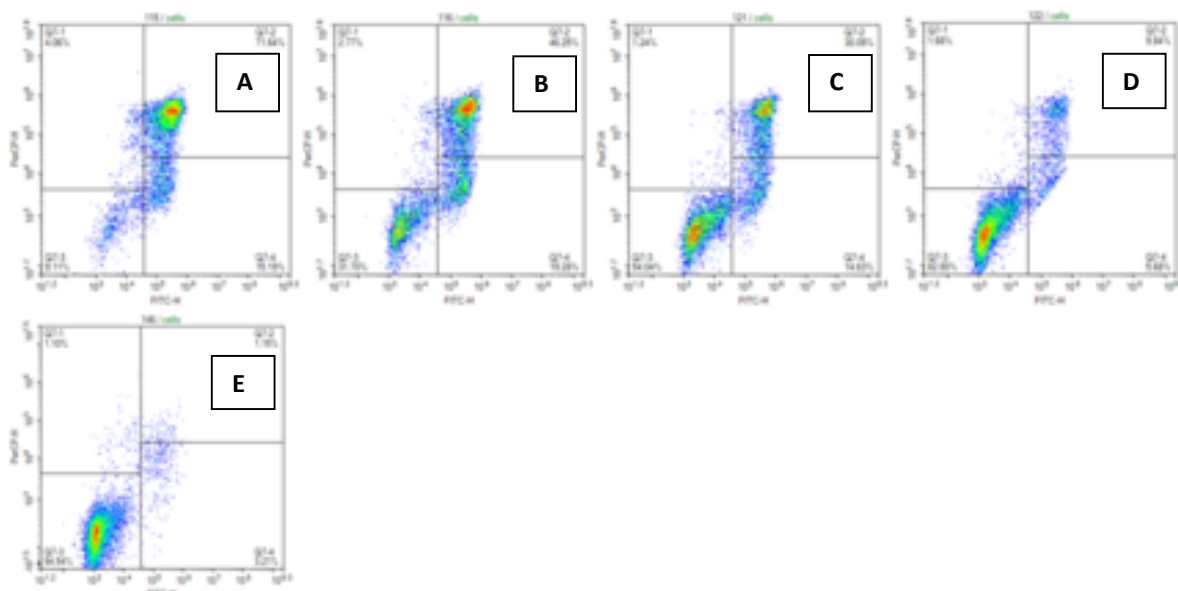


Рисунок 1. Клетки Jurkat обработанные различными концентрациями соединения **12c** (A): 0.6 μM ; (B): 0.4 μM ; (C): 0.2 μM ; (D): 0.1 μM ; (E): контроль. Q7-1, некроз; Q7-2, поздний апоптоз; Q7-3, живые; Q7-4, ранний апоптоз.

Таким образом, производные лембехина В имеют дозозависимое влияние на клеточную популяцию и вызывают индукцию раннего и позднего апоптоза, тогда как ранее было показано, что исходный лембехин В в большей степени является индуктором раннего апоптоза.

На рисунке 2 представлены результаты исследования фаз клеточного цикла линии Jurkat, определяемых методом проточной цитофлуориметрии, после обработки их соединениям **12c** в разных концентрациях через 24 часа.

Показатели клеточного цикла в культурах Jurkat, K562, U937, HeLa и Hek293 в контрольных образцах характеризовались значительным преобладанием клеток, находящихся в фазе G0-G1 и наличием баланса между процессами синтеза (S-фаза) и апоптоза (интервал sub-G0-G1).

Через 24 часа после экспозиции соединения **12c** практически во всех клеточных опухолевых линиях, в большей степени в суспензионных Jurkat, K562, U937, преобладали процессы апоптоза (увеличение интервала subG0-G1) при сохраненной и даже несколько повышенной способности клеток к синтезу ДНК (S-фаза). При этом отмечалось уменьшение доли клеток, находящихся в фазе G0-G1, наряду с увеличением блока пролиферации и снижением индекса пролиферации за счет уменьшения количества клеток в фазе G2+M (рисунок 2A).

Все вышеперечисленное может свидетельствовать о цитотоксической активности соединения **12c** по отношению к клеткам хронической миелоидной и T-клеточной лейкемии, а также гистиоцитарной лимфомы, обусловленной способностью данных соединений индуцировать апоптоз.

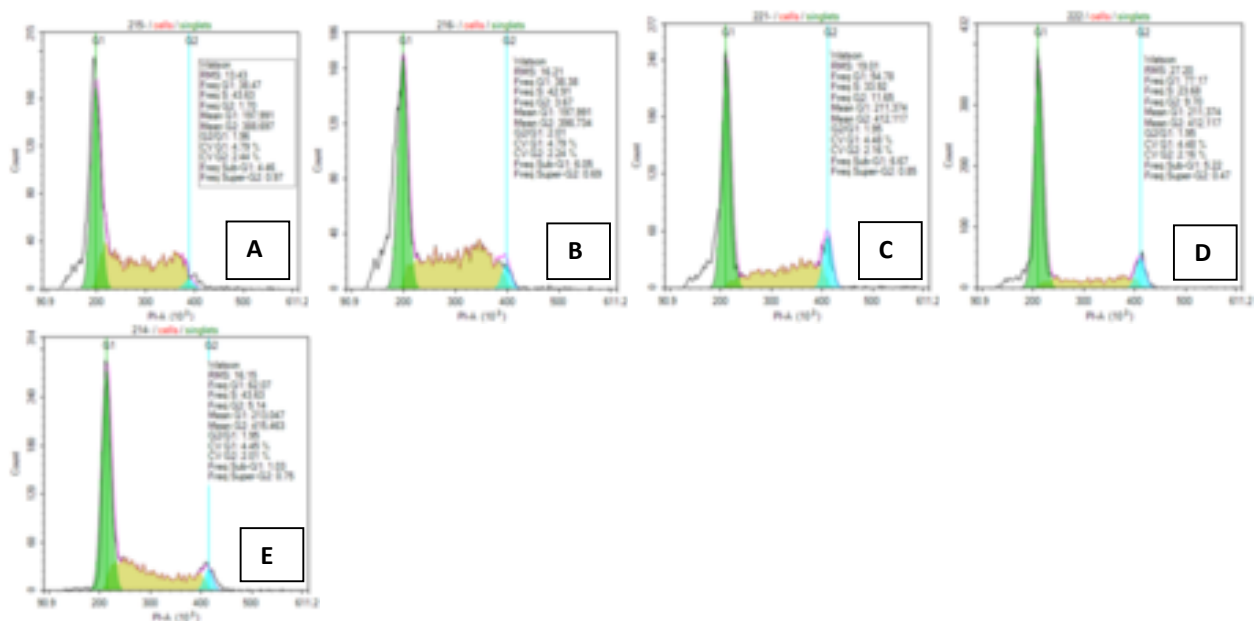
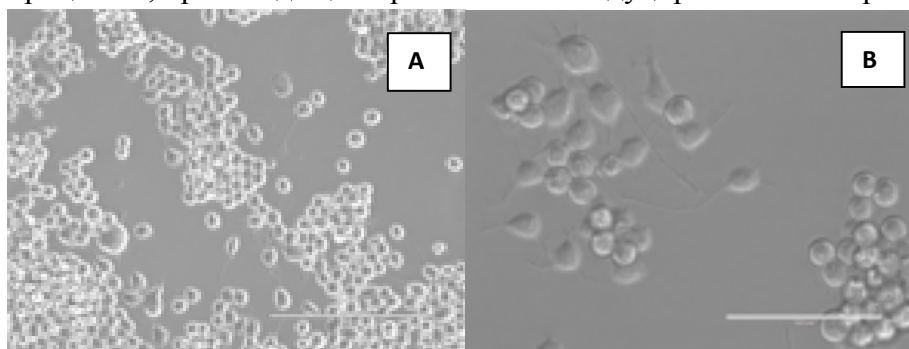


Рисунок 2. Анализ клеточного цикла в клетках Jurkat, после инкубирования с различными концентрациями соединения **12c** в течение 24 часов. (A): 0.6 μM ; (B): 0.4 μM ; (C): 0.2 μM ; (D): 0.1 μM ; (E): контроль.

Сравнение результатов изучения влияния на клеточный цикл для природного лембехина В и его 1,3-диинового аналога **12c** показало некоторые различия. Если лембехин В, помимо накопления клеток в гиподиплоидной популяции (G0), в основном, вызывает остановку клеточного цикла в G1 фазе, то его 1,3-диинового аналоги оказывают прямое влияние на S-фазу, вызывая ее остановку и снижая популяцию клеток в G2 фазе, что также, в конечном итоге, обогащает гиподиплоидную популяцию клеток.

Так же, как и остальные исследованные нами производные, соединение **12c** стимулировало рост нейритов в клеточной культуре Neuro2A, однако в отличие от всех других соединений, его дифференцирующая активность в отношении клеток нейробластомы была очень высока и проявлялась уже при низких концентрациях (рис.3, табл. 1). При увеличении времени инкубации клеток с 1,3-диинном **12c**, процесс дифференцировки усиливался, происходило ветвление и увеличение длины нейритов (рис. 3). На рисунке 3 хорошо видно заметное преимущество в отношении длины и ветвлении нейритов у клеток, инкубируемых в среде с соединением **12c**. Т.е., вполне возможно, действие соединения **12c** по активности не уступает NGF (neuro growth factor), однако для более четкого понимания процессов, происходящих в клетках под воздействием производных лембехинов необходимо дальнейшее исследование молекулярных процессов, происходящих при лембехин-индуцированном нейритогенезе.



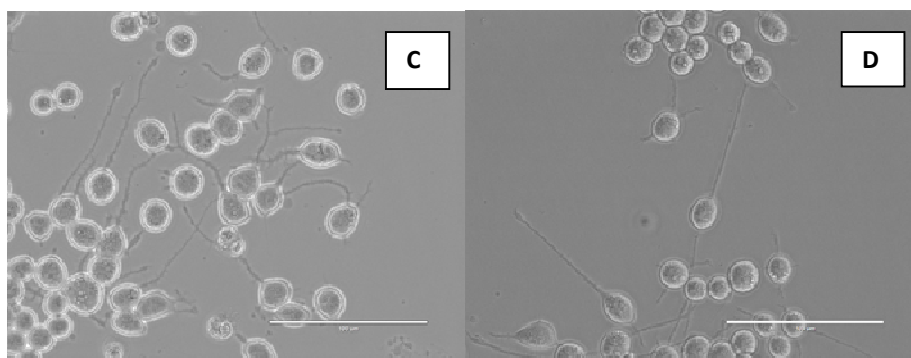


Рисунок 3. Фазово-контрастная микроскопия нейритогенеза в клетках Neuro2A под действием соединения **12c** в концентрации 0.2 nM/ml. (A): инкубация клеток с NGF– 72 часа. Инкубация клеток с соединением **12c** (B): 24 ч, (C): 48 ч, (D): 72 ч.

Совершенно иная картина клеточного цикла при проточной цитометрии наблюдается при обработке клеток линии Neuro2A исследуемым производным лембекина В (рисунок 4).

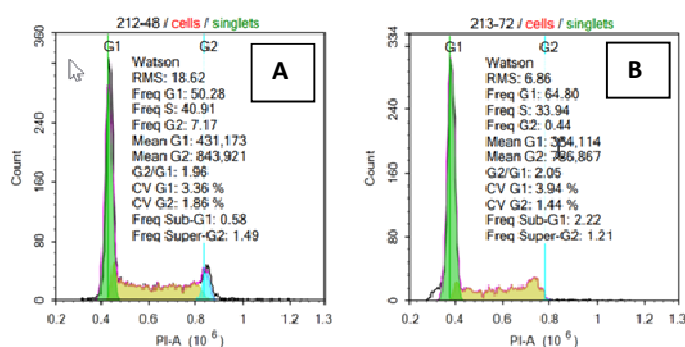


Рисунок 4. Фазы клеточного цикла на клетках Neuro2A, обработанных соединением **12c** (0.2 nM/ml) и инкубированных с исследуемыми соединениями в течении 48 (A) и 72 (B) часов, соответственно.

На гистограммах фаз клеточного цикла в клетках Neuro2A при экспозиции соединения **12c** сначала наблюдается несколько повышенная способности клеток к синтезу ДНК (повышение S-фазы), а затем, к концу 3-х суток характерно выраженное снижение S- и G2 фаз, т.е. почти полное исчезновение клеток в процессе митоза.

Полученные данные позволяют предположить, что, скорее всего, клетки нейробластомы мыши под действием производных лембекина В начинают проходить процесс дифференцировки, что подтверждается активизацией процессов нейритогенеза.

Таким образом, нами разработаны оригинальные методы стереоселективного синтеза природных алкинолов, содержащих бис-метиленразделенные Z-двойные связи, а также получена синтезирована линейка ацетиленовых аналогов природного лембекина В с высокими выходами и селективностью. Исследования биологической активности *in vitro* выявили высокий потенциал синтезированных соединений для их применения в качестве основы при разработке современных противоопухолевых или нейритогенных препаратов для лечения социально значимых заболеваний человека.

6. Синтез природного лембехина С. К настоящему времени из морских организмов выделено и охарактеризовано несколько тысяч органических соединений, и, как было показано многочисленными исследованиями, проявивших противоопухолевую, антибактериальную, противовирусную, противогрибковую, антипаразитарную или другие виды биологической активности. Отдельные соединения находятся на I-III стадиях клинического и предклинического тестирования.

Выделенные соединения поражают многообразием структур - это стероиды, макролиды, лактамы, алкалоиды, нуклеозиды, жирные кислоты, а также различные длинно- и короткоцепочечные функционально-замещенные алкены и алкины.

В большинстве случаев содержание того или иного компонента биомассы составляет микро- и наногаммы, что является существенным препятствием для их детального биологического тестирования и полного раскрытия биомедицинского потенциала. Поэтому, учитывая все возрастающие потребности современной медицинской химии, фармакологии и клинической медицины в области высокоэффективных, малотоксичных и избирательно действующих антибактериальных и противоопухолевых, разработка препаративных полных методов синтеза природных соединений является важной и актуальной задачей.

В контексте вышеизложенного, изучение природных соединений, выделяемых из морских обитателей – важная научная область, на стыке биологии и химии. Более того, синтез, и различные модификации данных соединений, а также изучение их влияния на биологические процессы могут привести к созданию новых биологически активных соединений, что, в свою очередь, способствует продвижению исследований по разработке новых лекарственных препаратов.

Ранее было показано, что применение разработанной нами реакции каталитического кросс-цикломагнирования О-содержащих и алифатических 1,2-диенов с помощью реактивов Гриньяра в присутствии Cr_2TiCl_2 (5-10 мол.%) на ключевой стадии позволило осуществить полный стереоселективный синтез природного алкинола - лембехина В (Рисунок 1) в 6 стадий с высоким выходом, что в свою очередь позволило наработать лембехин В и подробно изучить его противоопухолевую активность.

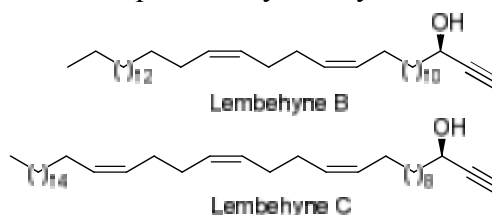


Рисунок 1. Природные ацетиленовые спирты - лембехины В и С.

В развитие этих исследований нами была поставлена задача впервые реализовать полный синтез выделенного ранее в микроколичествах из индонезийской морской губки *Haliclona sp.* алкинола - лембехина С (Рисунок 1), содержащего три бис-метиленразделенные Z-двойные связи, с применением на ключевой стадии синтеза Ti-катализируемого кросс-цикломагнирования 1,2-диенов. Кроме того, японскими исследователями была обнаружена высокая нейритогенная активность лембехинов, установлено, что эти соединения являются эффективными низкомолекулярными аналогами белков, относящихся к семейству нейротрофинов, выполняющих такую

важную функцию как поддержание жизнеспособности нейронов. Тем самым лембехины рассматривают как потенциальные лекарственные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также хореи Гентингтона. Кроме того, учитывая, что лембехин В проявил высокую противоопухолевую активность на клетках лейкемии человека, индуцируя ранний апоптоз, поэтому представляло интерес также поработать и подробно изучить противоопухолевую активность схожего по структуре лембехина С.

Несмотря на кажущуюся простоту структуры лембехина С задача его полного синтеза является непростой из-за необходимости формирования трех бис-метиленразделенных Z-двойных связей. Удивительно, но в литературе практически отсутствуют эффективные методы формирования 1Z,5Z,9Z-триенового фрагмента, за исключением разработанного А. Старком крайне интересного, но довольно трудоемкого подхода к неразветвленным 1,5,9,n-полиенам, использованного им в полном синтезе ацетогенина - chatenaytrienin⁴. Поэтому для решения данной проблемы мы решили обратиться к разработанной нами новой реакции Ti-катализируемого кросс-цикломагнирования функционально-замещенных и алифатических 1,2-диенов, использованной ранее в полном синтезе лембехинов А и В, 5Z,9Z-диеновых кислот, ацетогенинов, макродиолоидов и ряда феромонов насекомых-вредителей.

Так, предварительный ретросинтетический анализ структуры лембехина С показал, что полный синтез может быть реализован через Ti-катализируемое кросс-цикломагнирование (6Z)-трикоза-1,2,6-триена с тетрагидропирановым эфиром 11,12-тридекадиенола или 2-додека-10,11-диен-1-ил-1,3-диоксоланом (Схема 1). На последующих стадиях предполагалось формирование терминального пропаргилового фрагмента с получением рацемического лембехина С, окисление гидрокси-группы и ее стереоселективное восстановление (Схема 1).

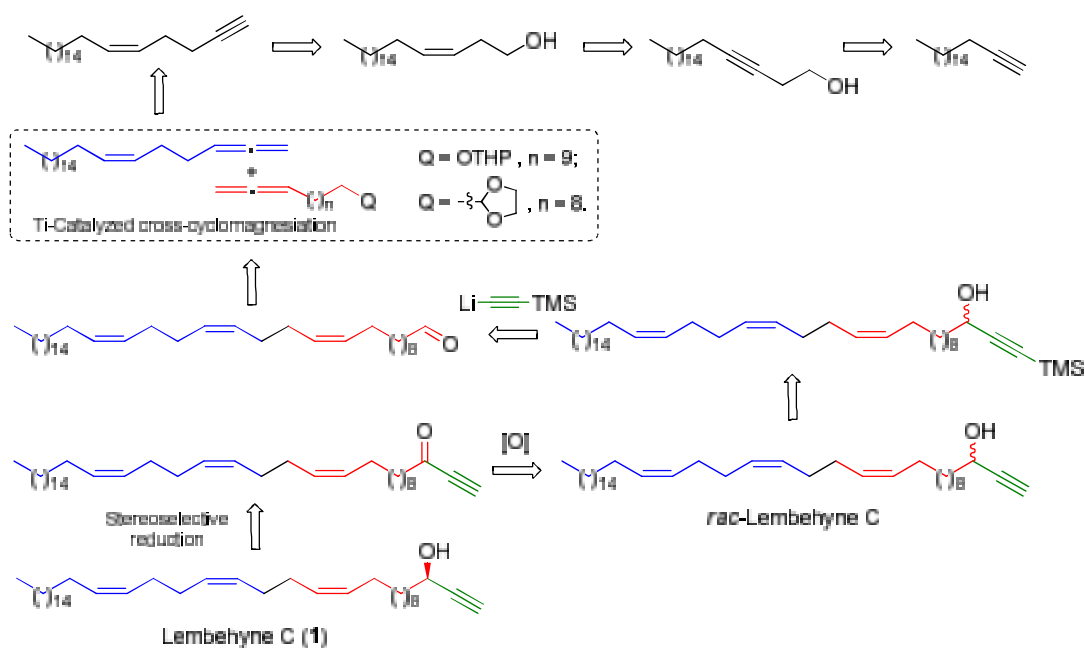


Схема 1. Ретросинтетический анализ тотального синтеза лембехина С.

Следует отметить, что синтез ключевого мономера - (6Z)-трикоза-1,2,6-триена, это отдельная задача, поэтому нами было разработано два подхода к его получению, исходя из коммерчески доступных 1-бромгексадекана (Схема 2) или 4-пентин-1-ола (Схема 3). Первый подход, включающий 8 стадий, предполагает взаимодействие 1-бромгексадекана **2** с этилендиаминовым комплексом ацетиленида лития в ДМСО с получением 1-октадецина (**3**) с выходом 93%, последующая обработка которого EtMgBr в ТГФ и кипячения в течение 3 часов дает соответствующий ацетиленид магния **4**, реакция которого с этиленоксидом и последующим кислотным гидролизом приводит к эйкоз-3-ин-1-олу (**5**). На следующем этапе синтезировали (3Z)-эйкоз-3-ен-1-ол (**6**) через Ni(OAc)₂-катализируемое гидрирование алкинола **5**, с последующей обработкой полученного спирта **6** метансульфонилхлоридом в CH₂Cl₂ в течение 4 часов и образованием мезилата **7**. Кипячение последнего 3 часа в ацетоне с бромидом лития привело к 1-бром-(3Z)-эйкоз-3-ену (**8**) с выходом 85%. На завершающем этапе последовательно синтезировали алкин **9** реакцией алкенилбромида **8** с этилендиаминовым комплексом ацетиленида лития и через ацетилен-алленовую перегруппировку алкина **9** в условиях реакции Манниха получили целевой (6Z)-трикоза-1,2,6-триен (**10**) (Схема 2).

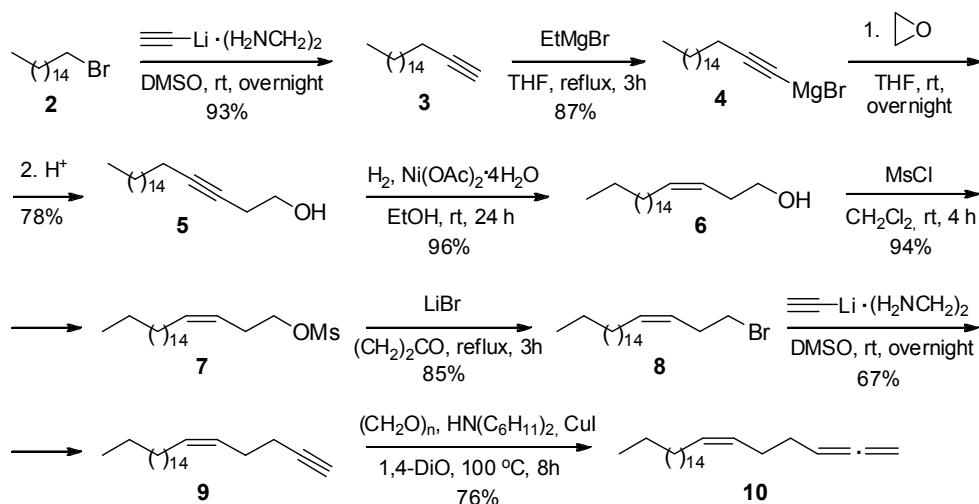


Схема 2. Синтез (6Z)-Трикоза-1,2,6-триена (10).

Альтернативный (5 стадийный) метод синтеза (6Z)-трикоза-1,2,6-триена (**10**) основан на использовании в качестве исходного мономера 4-пентин-1-ола, который последовательно обрабатывали n-BuLi и 1-бромгексадеканом с получением 4-генэйкозин-1-ола (**12**), в результате каталитического гидрирования последнего молекулярным водородом в присутствии Ni(OAc)₂ получен 4Z-генэйкоз-4-ен-1-ол (**13**) с выходом 85% на две стадии (Схема 3). Окисление спирта **13** периодинамом Десс-Мартина привело к 4Z-генэйкоз-4-ен-1-олю (**14**), реакцией которого с диметил(1-диазо-2-оксопропил)фосфонатом синтезирован (5Z)-докоз-5-ен-1-ин (**9**). На завершающем этапе алкин **9** подвергли ацетилен-алленовой перегруппировке кипячением с параформом и дигексиламином в присутствии CuI в диоксане (100 °C, 8ч) с получением аллена **10** (Схема 3).

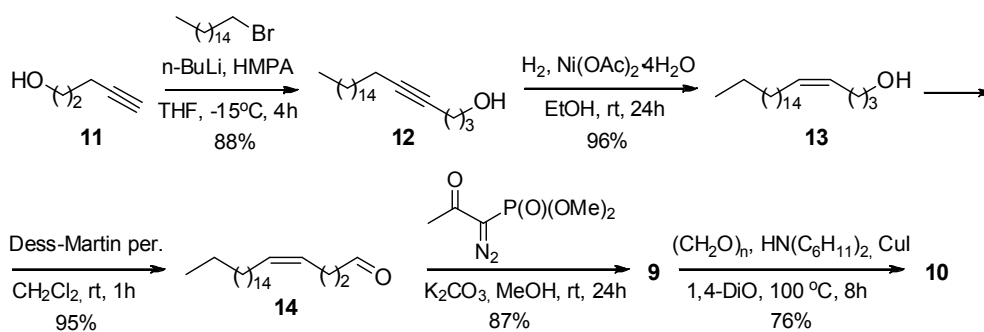


Схема 3. Альтернативный подход к синтезу (6Z)-Триакоса-1,2,6-триена (10).

На следующем этапе согласно разработанной на основе ретросинтетического анализа схемы полного синтеза лембекина С (схема 1) провели реакции межмолекулярного кросс-цикломагнирования (6Z)-трикоза-1,2,6-триена (10) с 2-додека-10,11-диен-1-ил-1,3-диоксоланом (15a) или тетрагидропирановым эфиром 11,12-тридекадиенола (15b) с помощью EtMgBr в присутствии Mg (порошок) и каталитических количеств Cp_2TiCl_2 ($10:15\text{a}(15\text{b}):\text{EtMgBr}:\text{Mg}:[\text{Ti}] = 12:10:36:24:0.1$, Et_2O , $20\text{--}22^\circ\text{C}$, 10h), которые после кислотного гидролиза образующихся *in situ* магнезациклопентанов 16a,b, привели к альдегиду 17 и тетрагидропиранову эфиру 18, содержащих 11Z,15Z,19Z-диеновые фрагменты, с выходами 81 и 89%, соответственно (Схема 4). Последовательными реакциями снятия тетрагидропиранильной защиты и окисления реагентом Десс-Мартина эфир 18 был превращен в альдегид 17 с выходом $\sim 64\%$ (Схема 4), что свидетельствует о предпочтительности синтеза альдегида 17 через диоксалан 15a.

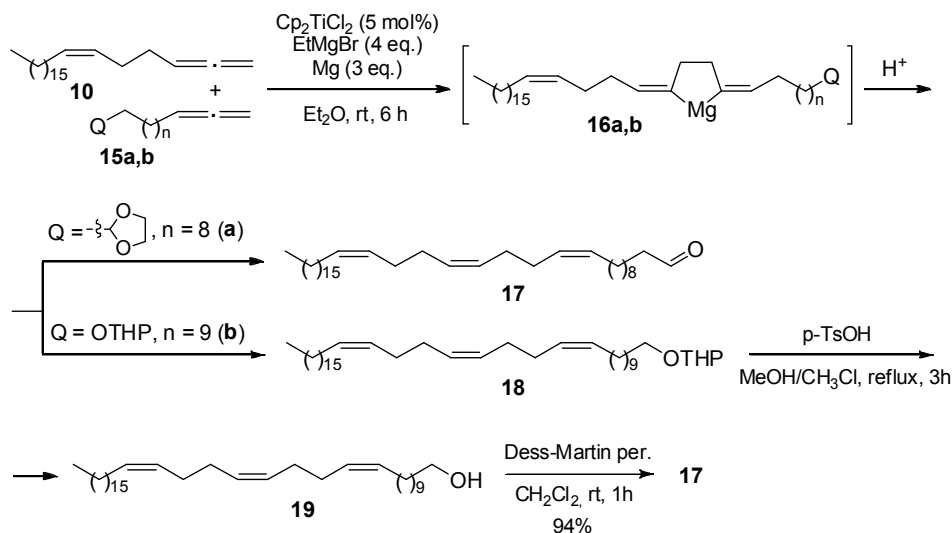


Схема 4. (Z,Z,Z)-Стереоселективный синтез Гексаконта-11Z,15Z,19Z-триен-1-аля (17).

Взаимодействие гексаконта-11Z,15Z,19Z-триен-1-аля (17) с триметилсилилацетиленидом лития, предварительно синтезированным реакцией

эквимольных количеств триметилсилилацетилена и *n*-BuLi в ТГФ, за 3 дня при комнатной температуре привел к получению силана **20** с выходом 91%. Удаление терминальной триметилсилильной группы обработкой силана **20** тетрабутиламмоний фторидом (ТБАФ) в ТГФ за 4 часа напрямую приводит к получению рацемического лембехина С (**21**) практически с количественным выходом (Схема 5).

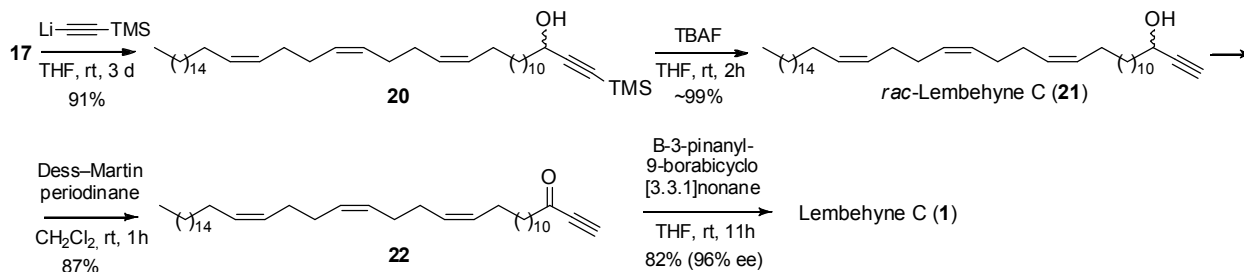


Схема 5. Полный синтез природного лембехина С (1).

Рацемический лембехин С (**21**) окислили периодианом Десс-Мартина до соответствующего кетона **22** с выходом 87% (Схема 5). На завершающем этапе синтеза с использованием реагента *B*-3-пинанил-9-борабицикло[3.3.1]нонана (Alpine-borane), предварительно приготовленного из (+)- α -пинена (98%*ee*) и 9-борабицикло[3.3.1]нонана, реализовали стереоселективное восстановление кетона **22** в природный лембехин С (**1**) с выходом 82% и энантиомерной чистотой (96%*ee*).

Противоопухолевая активность лембехина С.

Таблица 1. Цитотоксическая активность *in vitro* природного и рацемического лембехина С. Получено на культурах опухолевых клеток (Jurkat, K562, HL60, U937) (μ M/L)

Compound	Jurkat	K562	U937	HL60
1 (Natural)	54.91 \pm 1.87	76.74 \pm 2.11	49.37 \pm 1.49	37.21 \pm 1.28
21 (Racemic)	16.45 \pm 0.69	37.62 \pm 1.43	12.29 \pm 0.53	14.25 \pm 0.24
22 (Kenton)				

Для синтезированного лембехина С впервые были проведены исследования на противоопухолевую активность *in vitro* на клеточных линиях лейкемии (Jurkat, HL-60, U937 и K562), включающие определение IC₅₀, изучение жизнеспособности клеток, влияния на клеточный цикл, а также изучение механизма индукции апоптоза с применением проточной цитофлуориметрии и мультиплексного анализа Luminex xMAP белков основных сигнальных путей, отвечающих за рост и пролиферацию клетки.

Количественный и качественный анализ жизнеспособности клеток, клеточного цикла и апоптозиндуцирующей активности лембехина С проводили с помощью наборов реагентов Guava Nexin Reagent, Guava Cell Cycle и Guava ViaCount (Millipore).

Цитотоксическая активность лембехина С *in vitro* по отношению к клеткам лейкемии человека Jurkat, HL-60, U937 и K562 была исследована с помощью набора Guava ViaCount (Millipore). Лембехин С, как и ранее синтезированный нами лембехин В проявляет

выраженный цитотоксический эффект по отношению ко всем исследуемым типам опухолевых клеток. Однако лембехин С проявляет несколько большую цитотоксичность по сравнению с лембехином В. Так наибольший IC50 при обработке клеток лембехином С был получен для клеточной линии K562 (76,6 $\mu\text{M/L}$), тогда как для U937, HL-60 и Jurkat IC50 составил 1,5 μM , 1,6 и 1,4 μM , соответственно.

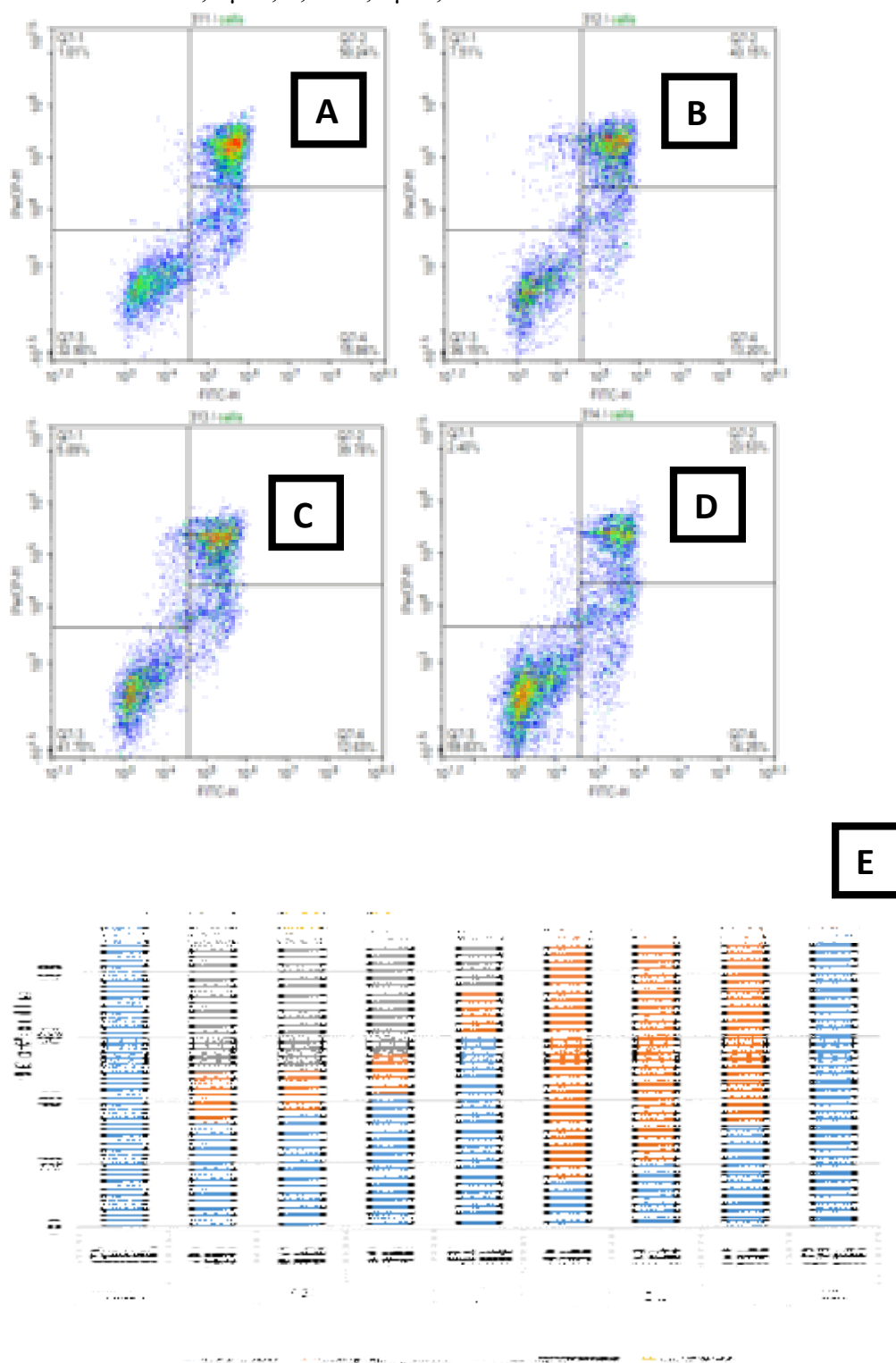
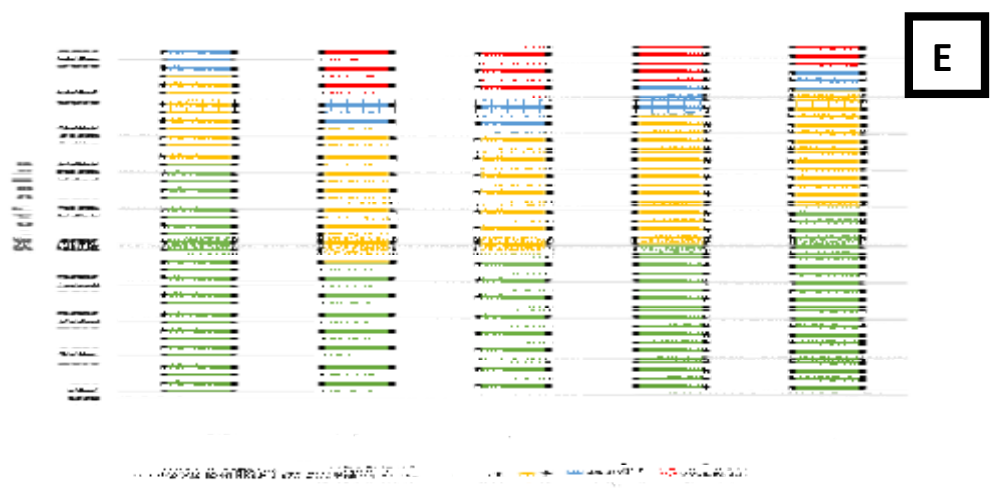
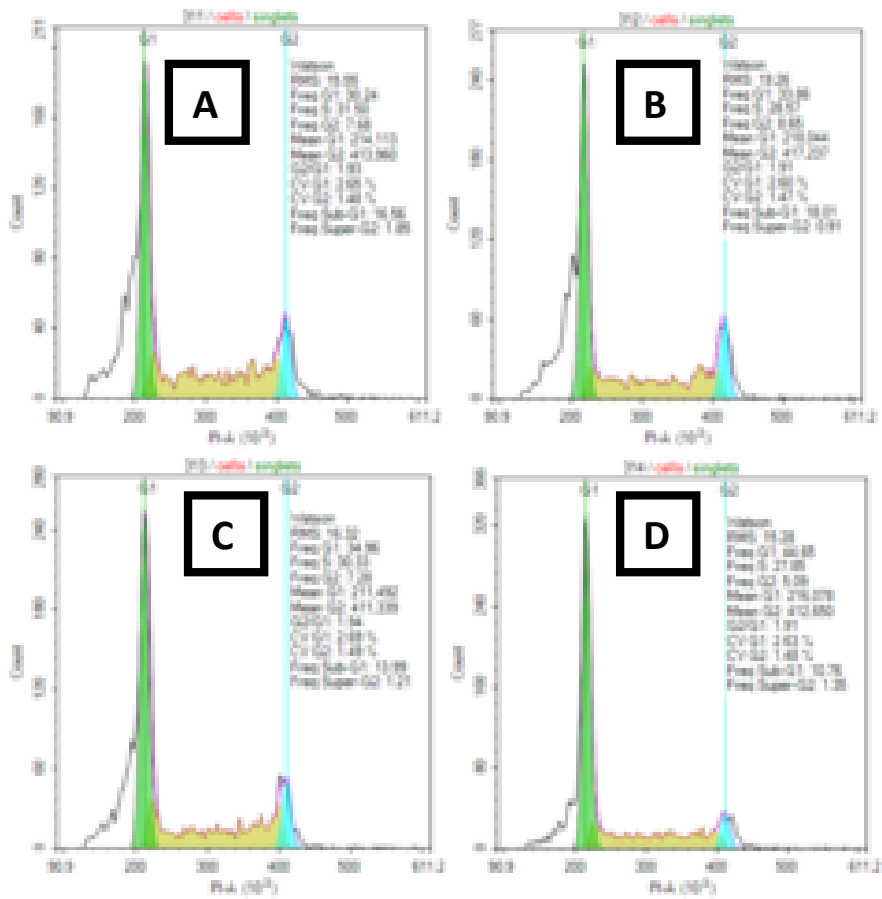


Рисунок 1. Цитофлуориметрический анализ апоптозіндуцірующей активности лембехина С в клетках опухолевой клеточной линии Jurkat под влиянием различных концентраций

исследуемого соединения. **A** - 4mkL, **B** - 2 mkL, **C** - 1 mkL, **D** - 0.5 mkL, **E** – гистограмма фаз апоптоза клеток линии Jurkat, обработанных лембехином **C** в различных концентрациях (для сравнения приведены данные по лембехину **B**. Клетки окрашены annexineV/7AAD. Время инкубации 24 часа. The histogram shows the apoptosis rate (%); *P<0.05 when compared with the control group (n=5).

Для изучения апоптоза в культурах клеток Jurkat, HL-60, U937 и K562 под действием лембехина **C** был использован универсальный метод детекции экстернализации фосфатидилсерина аннексиномV на плазматической мембране после обработки культуры клеток данным веществом. Влияние Лембехина **C** на индукцию апоптоза в клетках Jurkat более выражено по сравнению с остальными исследованными типами опухолевых клеток, что согласуется с более высокой цитотоксичностью соединения по отношению к клеткам данной клеточной линии. Как известно из литературных источников, одной из особенностей клеток линии Jurkat является дефектный ген TP53, который кодирует опухолевый супрессор p53, участвующий в поддержании геномной стабильности. Таким образом, клетки линии Jurkat являются более устойчивыми к ряду апоптозиндуцирующих агентов, инициирующих апоптоз по p53 зависимому механизму. Как видно из рисунка 1, по сравнению с лембехином **B** воздействие лембехина **C** на культуру опухолевых клеток Jurkat приводит к значительному дозозависимому повышению количества апоптотических клеток, находящихся на поздних стадиях апоптоза. Более того, при сравнении с теми же концентрациями лембехина **B** при воздействии лембехина **C** наблюдается дозозависимое увеличение некротических клеток (7,5% при концентрации лембехина **C** 2μM. Наиболее высокий процент раннего апоптоза (78,6%) наблюдается при концентрации вещества 2 μM, тогда как при этой же концентрации лембехина **C** процент раннего апоптоза в разы ниже (15,86%), а преобладающим является поздний апоптоз (50,24%).

Лембехин **C** по данным исследования клеточного цикла с помощью Guava Cell Cycle Reagent оказался мощным индуктором гиподиплоидной популяции клеток (суб-G1 фаза) во всех трех клеточных линиях после соответствующей обработки исследуемым веществом. Для сравнения гиподиплоидная популяция клеток при схожих концентрациях для опухолевой линии Jurkat была несколько выше именно для лембехина **C** – 18,1% (2μM) (Лембехин **B** – 15,1% для 2μM). Практически те же самые закономерности наблюдались и для других опухолевых суспензионных культур клеток (HL-60, K562 и U937). Таким образом мы можем утверждать, что лембехин **C**, также как и лембехин **B** является индуктором апоптоза в различных исследованных клеточных линиях. Более того, в клетках p53-дефицитной линии Jurkat в ответ на обработку лембехином **C** развивается апоптоз при инкубации клеток с исследуемым веществом в течении 24 часов.



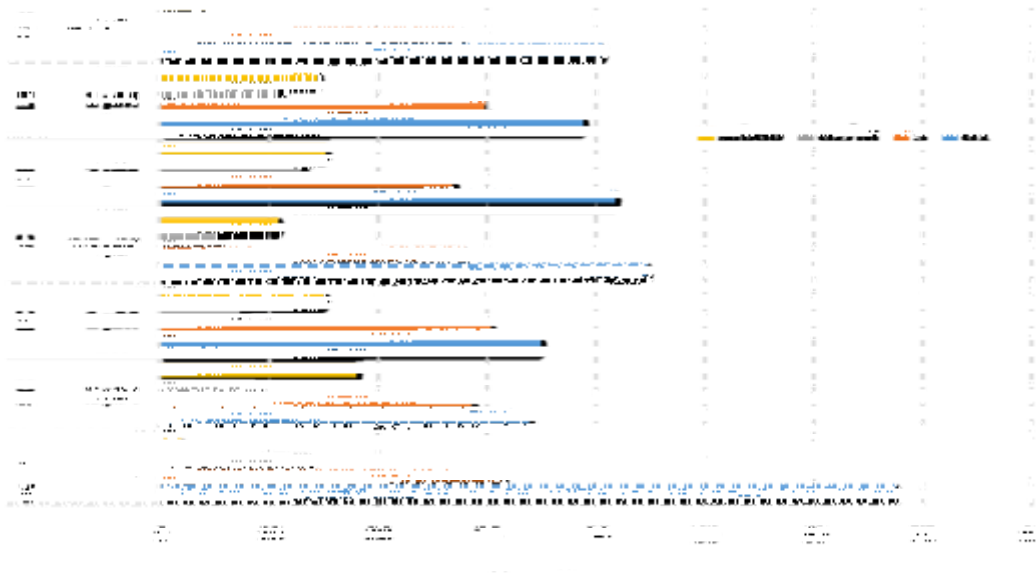


Рисунок 2. Анализ фаз клеточного цикла в клетках Jurkat, обработанных лембехином С в различных концентрациях **A** - 4mkL, **B** - 2 mkL, **C** - 1 mkL, **D** - 0.5 mkL, **E** – диаграмма фаз клеточного цикла; **G** – гистограмма фаз клеточного цикла клеток линии Jurkat, обработанных лембехином С в различных концентрациях (для сравнения приведены данные по лембехину В). Время инкубации лембехина С и лембехина В с клетками – 24 часа.

Далее, для более детального понимания механизмов действия лембехинов В и С было проведено исследование возможного повреждения ДНК в опухолевых клетках Jurkat. Причина резистентности к противоопухолевым агентам, вызывающим апоптоз по р53-зависимому механизму в клетках Jurkat может быть связана не только с отсутствием самого белка р53 или наличия его дефектной формы, но и с поломками других молекулярных мишеней, вовлеченных в каскады трансдукции сигнала или выполнения терминальных стадий апоптоза.

Одновременная детекция в одном и том же образце клеток фосфорилированного и нефосфорилированного белка H2A.X представляет из себя чувствительный метод, позволяющий исследовать связь между повреждением ДНК, контрольными точками клеточного цикла и инициацией апоптоза. Многие химиотерапевтические агенты, такие, например, как ингибиторы топоизомеразы II (этопозид), повреждают опухолевые клетки путем индукции двунитевых разрывов ДНК. Также было показано, что уровень γ -H2A.X, обнаруживаемый посредством цитофлуориметрии, коррелирует с разрывами ДНК, и гибелью опухолевых клеток [Muslimovic, A., et al. (2008). An optimized method for measurement of gamma-H2AX in blood mononuclear and cultured cells. Nat Protoc.; 3(7):1187-93.]. По мере увеличения уровня повреждения ДНК уровень фосфорилированного гистона H2A.X (γ H2AX) увеличивается, накапливаясь именно в местах разрывов ДНК. Также белок H2A.X играет важную роль в процессах репарации ДНК [Ewald, B., et al. (2007).

H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint. *Mol Cancer Ther.*; 6(4):1239–48.].

При стимуляции клеток Jurkat контрольным веществом этопозидом в течение 2 часов отмечается выраженное увеличение количества фосфорилированных гистонов H2A.X (рисунок 2, гистограмма). При анализе клеток линии Jurkat, обработанных лембехинами В и С было показано, что данные соединения не влияют на процесс фосфорилирования H2A.X (рисунок 2, гистограмма). Совершенно очевидно, что лембехин С, также, как и лембехин В, не вызывают разрывов ДНК в клетке, и, соответственно не инициируют апоптоз по p53-зависимому механизму.

Histones (24h).

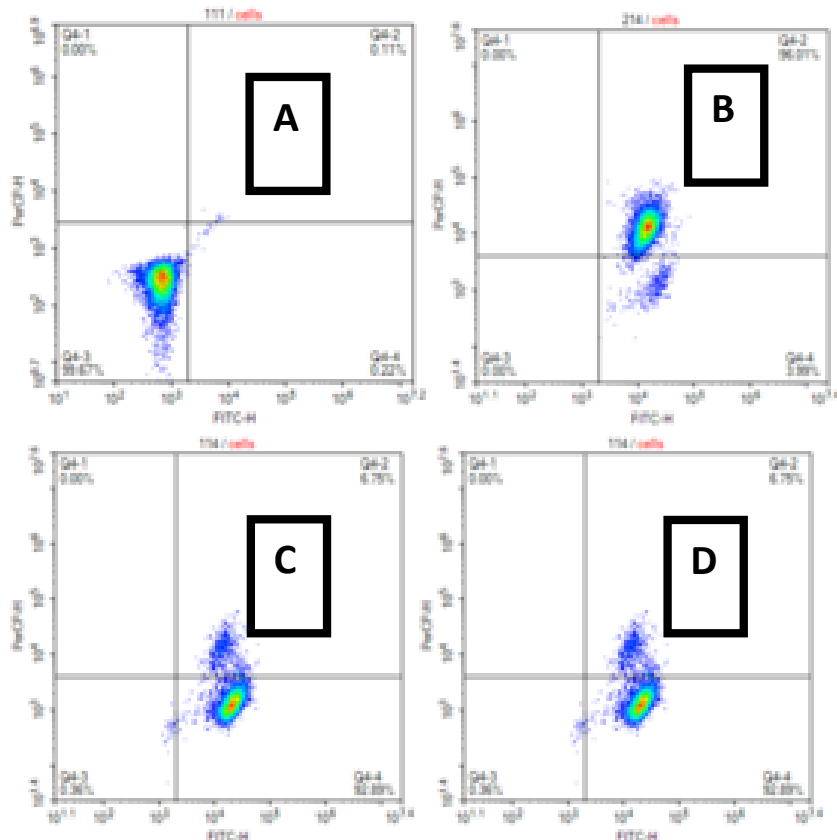


Рисунок 2. Детекция накопления фосфорилированного H2A.X в клетках линии Jurkat при воздействии лембехинов В и С. Контроль (интактные живые клетки) (А); клетки, обработанные этопозидом в концентрации 2 μМ/мл (В); клетки, обработанные лембехином С в концентрации 2 μМ/мл (С); клетки, обработанные лембехином В в концентрации 1,5 μМ/мл (D). клетки, обработанные соединением М34 в концентрации 1,5 μМ/мл (Е); Инкубация с исследуемыми соединениями проводилась 2 часа

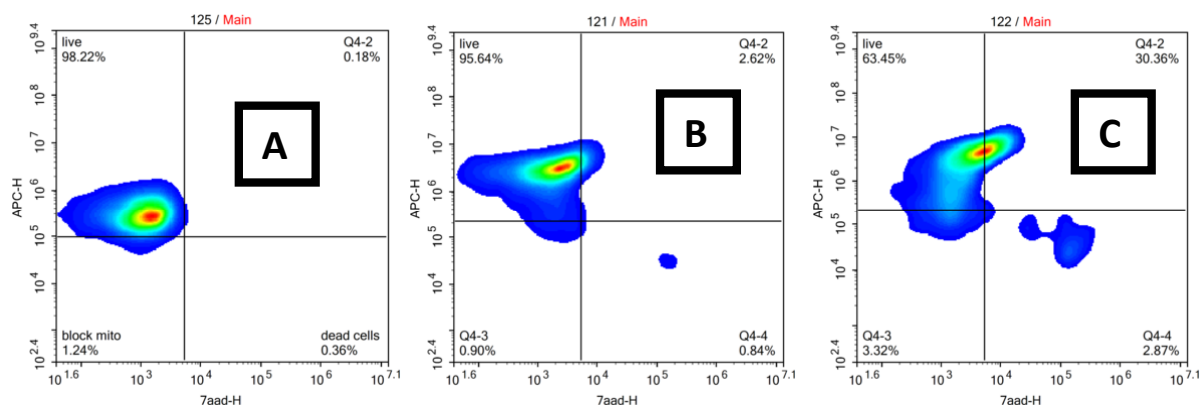


Рисунок 3. Детекция изменений митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi$) в клетках Jurkat, обработанных лембехином С в различных концентрациях. А - контрольный образец, содержащий живые клетки, В – лембехин С (2 μL), С – лембехин С (4 μL), Клетки окрашены MitoSense Red и 7-AAD. Время инкубации 4 часа.

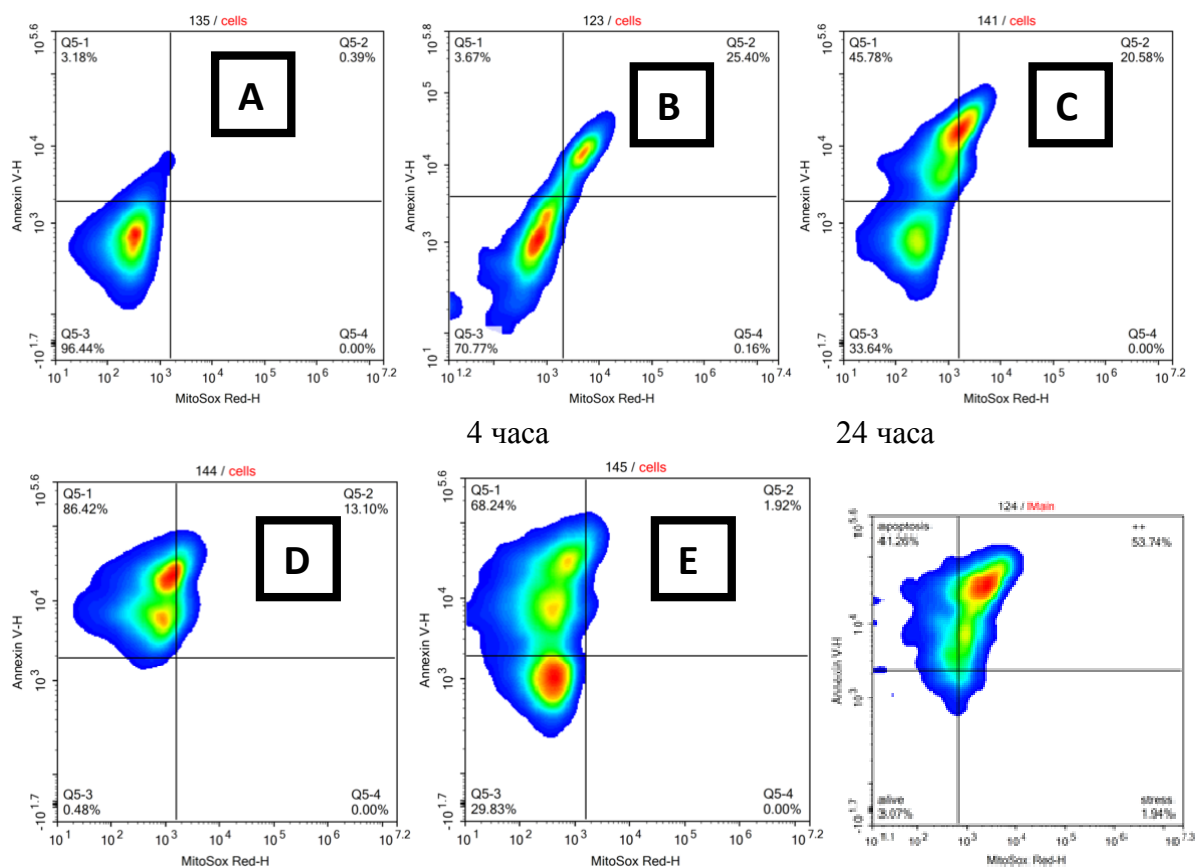


Рисунок 4. Продукция активных форм кислорода и явления апоптотической гибели в клетках линии Jurkat, обработанных лембехином С в различных концентрациях и с разным временем инкубирования (А – контрольный образец, В – LC (2 μL) инкуб 4 часа, С – LC (4 μL) инкуб 24 часа, D – Этопозид (2 μL) инкубация 4 часа, E – камптотецин (2 μL) инкубация 4 часа. Клетки окрашены MitoSox Red и аннексином V- CF488A.

Основные результаты и выводы

1. Выполнена оригинальная программа исследований по разработке новых регио и стереоселективных методов полного синтеза природных и синтетических аналогов лембехинов А,В,С, основанных на применений на ключевой стадии формирования Z,Z-диеновой системы реакций кросс-цикломагнирования 1,2-диенов по Джемилеву.

Для синтезированных лембехинов изучена проявляемая ими нейритогенная и противоопухолевая активности, а также изучена взаимосвязь структура-активность.

2. Разработаны две альтернативные новые схемы синтеза рацемического лембехина В с применением реакций каталитического кросс-цикломагнирования 1,2-нонадекадиена с тетрагидропирановым эфиром 13,14-пентадекадиен-1-ила или 2-тетрадека-12,13,диен-1-ил-1,3-диоксаном с помощью EtMgBr в присутствии катализатора Cr_2TiCl_2 приводящей к соответствующим ключевым 2,5-диалкилиды магнезациклопентанам.

Гидролиз полученных магнезациклопентанов 5%HCl приводит к целевым тетраконта-13Z,17Z-диену или тетраконта-13Z,17Z-диеналу с выходами 88 и 77% соответственно.

3. Взаимодействием, полученного двумя новыми методами, тетраконта-13Z,17Z-диенала с триметилсилилацетеленидом лития с последующим снятием триметилсилильной группы с помощью тетрабутиламмоний фторидом(TBAF) синтезирован целевой рацемический лембехин В с практически количественным выходом.

4. Впервые синтезирован длинно(C36-C40) и короткоцепочные(C25-C34) аналоги лембехина В,содержащие 1Z,5Z-диеновую группировку, с использованием на ключевой стадии синтеза реакцию кросс-цикломагнирования алифатических и О-содержащих 1,2-диенов катализируемую Cr_2TiCl_2 .

5. Впервые разработана оригинальная схема полного стереоселективного синтеза и природного лембехина В с R-конфигурацией гидроксильной группы восстановлением гексаконта-15Z,19Z-диен-1-ил-3-она, полученного в 5 стадий, с помощью В-3-пинанил-9-борабодико[3,3,1]-нонана(Alpine borane) реакцией рацемического и энантиомерно чистого лембехинов В с 1-бром-2-триметилсилилацетеленом или 1-бром-2(на гидроксилалкил)-ацетиленами. Впервые получены 1,3-диеновые производные с высокими выходами.

6. Впервые синтезирован рацемический (\pm)лембехин С и стереоизомерно чистый (*ee*) лембехин с использованием на ключевой стадии реакций каталитического кросс-цикломагнирование трикоза-1,2,6Z-триена с 2-додека-10,11-диен-1-ил-1,3-диоксаланом или эфиром 11,12-тридекадиен-1-ола с помощью EtMgBr в присутствии катализатора Cr_2TiCl_2 в условиях (20°C в Et_2O 10ч.) с получением соответствующих диалкилиден-магнезациклопентанов которые после последовательных превращений дали целевой (\pm)и (*ee*)-лембехина С.

7. Для синтезированных природных и синтетических аналогов лембехинов В,С и А подробно изучены апаптоз индуцирующая активность в отношении пяти опухолевых клеточных линий Jurkat, K562, U937, HeLa и HEK293 и нейритогенная активность в отношении клеточных культур PC12, PC9 и Neuro2A.

а) Установлено, что клетки нейронального происхождения ингибируют белки-циклины и циклин зависимые протеинкиназы, являясь тем самым, ингибиторами клеточного цикла и активаторами процессов дифференцировки.

Обнаружено, что с увеличением длины углеводородного радикала в синтетических лембехинах наблюдается достоверное уменьшение дифференцирующихся клеток и длины нейритов, а уменьшение длины углеводородной цепи стимулирует дифференциацию клеток и рост нейритов.

б) Показано, что рацемический и природный лембехины В в концентрациях от 0,5 до 4 мМ проявляют выраженный цитотоксический эффект по отношению ко всем исследуемым телам раковых клеток.

Наибольший IC 50 получен для клеточной линии K562(3мМ), тогда как для Jurkat и HL-60 IC 50 составили 2мМ и 2,2мМ соответственно.

Лембехин В является мощным индуктором гиподиплоидной популяции клеток(суб-G1 фаза) во всех трех клеточных линиях после обработки исследуемым веществом.

8. Впервые проведены исследования га противоопухолевую активность рацемического и стереоизомерно чистого лембехинов С in vitro на клеточных линиях лейкемии (Jurkat HL-60, U937 и K562,) в ключающие определения IC 50, изучение жизнеспособности клеток, влияние на клеточный цикл, а также изучение механизма индукции апоптоза с применением проточной цитофлуориметрии и мультиплексного анализа Luminex xMAP белков основанных сигнальных путей, отвечающих за рост и пролиферацию клетки.

Установлено, что лембехин С проявляют большую цитотоксичность по сравнению с лембехином В

При обработке клеток лембехином с полученный большой IC 50 для клеточных линий K562(76,6мМ/l), тогда как для U937, HL-60 и Jurkat IC 50 составляет 1,5мМ, 1,6мМ и 1,4мМ соответственно

Исследованные лембехины А,В,С представляют исключительный интерес и открывают перспективы для разработки современных противоопухолевых препаратов для медицины.

Основное содержание научно-квалификационной работы изложено в следующих работах:

Статьи:

1. В. А. Дьяконов, Л. У. Джемилева, А. А. Макаров, **Е. Н. Андреев**, У. М. Джемилев, Короткий и эффективный путь синтеза лембехина В с нейритогенной активностью, *Журнал органической химии*, **2016**, Т.52, Вып. 12, 1850-1852.
2. L. U. Dzhemileva, V. A. D'yakonov, A. A. Makarov, **E. N. Andreev**, M. M. Yunusbaeva, U. M. Dzhemilev, The first total synthesis of the marine acetylenic alcohol, lembehyne B – a selective inducer of early apoptosis in leukemia cancer cells, *Organic&Biomolecular Chemistry*, **2017**, 15, 470–476.
3. V. A. D'yakonov, A. A. Makarov, A. R. Salimova, **E. N. Andreev**, U. M. Dzhemilev, A new stereoselective synthesis of biologically active di- and trienoic acids containing a 1Z,5Z-diene moiety, *Mendeleev Communications*, **2017**, 27, 234-236.
4. V. A. D'yakonov, A. A. Makarov, L. U. Dzhemileva, **E. N. Andreev**, U. M. Dzhemilev, The first example of total synthesis of Lembehyne B, *Mendeleev Communications*, **2017**, 27, 122-124.
5. V. A. D'yakonov, A. A. Makarov, L. U. Dzhemileva, **E. N. Andreev**, U. M. Dzhemilev, Total Synthesis of Neuritogenic Alkynes: Lembehyne B and Key Intermediate of Lembehyne A, *ChemistrySelect*, **2017**, 2, 1211–1213.
6. L.U. Dzhemileva, V. A. D'yakonov, A. A. Makarov, **E. N. Andreev**, M. M. Yunusbaeva, U. M. Dzhemilev, New 1,3-Diynoic Derivatives of Natural Lembehyne B: Stereoselective Synthesis, Anticancer and Neuritogenic Activity, *Eur. J. Med. Chem.* (отправлена в печать).
7. L.U. Dzhemileva, V.A. D'yakonov, A.A. Makarov, E.Kh. Makarova, **E.N. Andreev**, U.M. Dzhemilev, First Total Synthesis of Natural Lembehyne C, and Investigation of Its Anticancer Properties, *J. Nat. Prod.* (отправлена в печать).

Тезисы докладов:

1. **Андреев Е.Н.**, Джемилева Л.У., Дьяконов В.А., Макаров А.А., Джемилев У.М., Направленный дизайн, синтез и изучение нейритогенной активности лембехинов и их производных в качестве инновационных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, Научная конференция грантодержателей РФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века» 20-24 ноября **2016** года, г. Москва
2. Дьяконов В.А., Джемилева Л.У., Макаров А.А., **Андреев Е.Н.**, Юнусбаева М.М., Джемилев У.М. (D'yakonov V.A., Dzhemileva L.U., Makarov A.A., Andreev E.N., Yunusbaeva M.M., Dzhemilev U.M.) Стереоселективный синтез лембехина В - индуктора раннего апоптоза клеток лейкемии Jurkat, HL-60 и K562 Сборник тезисов Всероссийской научной конференции с международным участием "СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ", Новосибирск (2017 г.)
3. Дьяконов В.А., Джемилева Л.У., Макаров А.А., **Андреев Е.Н.**, Юнусбаева М.М., Джемилев У.М. (D'yakonov V.A., Dzhemileva L.U., Makarov A.A., Andreev E.N., Yunusbaeva M.M., Dzhemilev U.M.) The First Total Synthesis of the Marine Acetylenic

- Alcohol, Lembehnye B - a Selective Inducer of Early Apoptosis in Leukemia Cancer Cells Abstract book of 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry, Kazan (2017 г.)
4. Дьяконов В.А., Джемилева Л.У., Туктарова Р.А., Макаров А.А., **Андреев Е.Н.**, Юнусбаева М.М., Салимова А.Р., Ишмухаметова С.Р., Джемилев У.М. (D'yakonov V.A., Dzhemileva L.U., Tuktarova R.A., Makarov A.A., **Andreev E.N.**, Yunusbaeva M.M., Salimova A.R., Ishmukhametova S.R., Dzhemilev U.M.) Природные и синтетические 5Z,9Z-диеновые кислоты: стереоселективный синтез и противоопухолевая активность Сборник тезисов Всероссийской научной конференции с международным участием "СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ", Новосибирск (2017 г.)