

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

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

*На правах рукописи*

**ИШМУХАМЕТОВА СВЕТЛАНА РАФИСОВНА**

**СИНТЕЗ ГИБРИДНЫХ МОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ СТЕРОИДОВ И Z,Z-  
ДИЕНОВЫХ КИСЛОТ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ  
АКТИВНОСТИ**

02.00.03 – органическая химия

**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**

**Научный руководитель:** – Джемилев УсеинМеметович, доктор химических наук, чл.корр. РАН

**Рецензенты:**

- Султанов РифкатМухатьярович, доктор химических наук, профессор, УГНТУ
- Рамазанов ИльфирРифович, доктор химических наук, профессор, ИНК УФИЦ РАН

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Несмотря на значительные достижения в области синтеза эффективных противоопухолевых препаратов, в настоящее время как в Российской Федерации, так и за рубежом остро стоит вопрос подбора эффективных схем лечения онкологических заболеваний. Проблема с каждым годом усугубляется из-за явления множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), приобретая все более катастрофические масштабы. Следствием МЛУ является значительное снижение или полная потеря эффективности препаратов в отношении опухолевых клеток. Поэтому на протяжении последних десятилетий наблюдается интенсивный рост научных исследований, направленных на разработку новых эффективных противоопухолевых лекарственных препаратов.

Одним из перспективных направлений в области создания новых лекарственных препаратов является разработка подходов, основанных на получении гибридных молекул, сочетающих структурные особенности двух или более биологически активных веществ в одной молекуле. Такой подход к разработке лекарственного препарата базируется на предположении, что новая молекула может «унаследовать» нужные фармакологические свойства активных фрагментов или привести к появлению новых свойств.

Растительный и животный мир являются доступными источниками структурно разнообразных биоактивных соединений. Неудивительно, что именно химические модификации природных метаболитов стали одним из наиболее перспективных направлений поиска физиологически активных соединений.

Исходя из литературных данных, среди таких биологически активных соединений привлекательными объектами для синтетических трансформаций могут являться стероиды, благодаря проявляемому ими широкому спектру биологической активности, наличию различных функциональных групп, расположенных вокруг жесткого тетрациклического каркаса. Следует

отметить, что стероиды включают три очень важные группы низкомолекулярных биорегуляторов: желчные кислоты, кортикостероиды, половые гормоны и серию отдельных соединений с разными биологическими функциями. Решающим шагом в развитии направленного синтеза производных стероидных соединений стало обнаружение фармакологического эффекта кортизола и прогестерона в начале 50-х годов прошлого столетия. С тех пор в клиническую практику введено большое число синтетических стероидов, полученных путем сложных химических превращений.

Ранее, сотрудниками лаборатории каталитического синтеза ИНК РАН было показано, что синтетические аналоги природных 5Z,9Z-диеновых кислот, содержащие стероидный фрагмент, проявляют высокую цитотоксическую активность в отношении ряда опухолевых клеточных линий, а также являются эффективными ингибиторами человеческих топоизомераз I/II.

В связи с вышеизложенным, исследования направленные на разработку перспективных для практического применения методов синтеза гибридных соединений на основе стероидов и *цис*-ненасыщенных кислот или ацетогенинов, проявляющих противоопухолевую активность, с использованием на ключевой стадии синтеза новой реакции каталитического кросс-цикломагнирования функционально замещенных и алифатических 1,2-диенов с помощью реактивов Гриньяра в присутствии  $\text{Cr}_2\text{TiCl}_2$ , является важной и актуальной задачей.

**Цель исследования.** Разработка эффективных методов синтеза гибридных молекул на основе стероидов и *цис*-ненасыщенных кислот, проявляющих противоопухолевую активность, с использованием на ключевой стадии синтеза новой реакции каталитического цикломагнирования функционально замещенных 1,2-диенов с помощью реактивов Гриньяра в присутствии  $\text{Cr}_2\text{TiCl}_2$ . Исследование противоопухолевых свойств синтезированных гибридных молекул *invitro* на

тест системах ингибирования процесса релаксации ДНК под действием человеческих топоизомераз I/II и цитотоксичности в отношении нормальных и опухолевых клеточных линий с целью выявления закономерностей.

В рамках диссертационной работы определены следующие наиболее важные задачи:

- влияния структуры новых гибридных молекул на проявляемую ими противоопухолевую активность.

- разработать условия синтеза 5Z,9Z-диендикарбоновой кислоты, с использованием ранее разработанной в лаборатории реакции гомоцикломагнирования O-содержащих 1,2-диенов с помощью EtMgBr в присутствии катализатора  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$ .

- разработать эффективные методы получения гибридных молекул на основе стероидов (холестерин, андростерон, прегненолон и литохолевая кислота) и Z,Z-диеновой кислоты путем связывания последних в виде сложных эфиров, амидов или через бифункциональные спейсеры.

- разработать эффективный малостадийный метод синтеза биопредшественника ацетогенинов – мурикаденина и его аналогов, выделенных в минорных количествах из корней *Annonamuricata* с применением реакции кросс-цикломагнирования O-содержащих и алифатических 1,2-диенов с помощью EtMgBr в присутствии катализатора  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$ .

- осуществить синтез ранее неописанных конъюгатов на основе литохолевой кислоты и биопредшественника ацетогенинов – мурикаденина и его аналогов.

- для синтезированных в рамках предлагаемого проекта гибридных молекул выявить закономерность влияния химической структуры исследуемых соединений на каталитическую активность топоизомераз I и II путем синтеза смоделированных структур, а также изучить селективную цитотоксическую активность новых гибридных молекул на опухолевых клеточных линиях.

**Научная новизна.** Впервые реализован синтез гибридных молекул на основе стероидов (холестерин, андростерон, прегненолон и литохолевая кислота) и 1,14-тетрадека-5Z,9Z-диендикарбоновой кислоты с применением на ключевой стадии реакции гомо-цикломагнирования O-содержащих 1,2-диенов с помощью EtMgBr в присутствии катализатора  $\text{Cr}_2\text{TiCl}_2$ .

Впервые разработан эффективный малостадийный метод получения биопредшественника ацетогенинов – мурикаденина и его аналогов, выделенных в минорных количествах из корней *Annonamuricata* с применением реакции кросс-цикломагнирования O-содержащих и алифатических 1,2-диенов с помощью EtMgBr в присутствии катализатора  $\text{Cr}_2\text{TiCl}_2$ .

Впервые осуществлен синтез гибридных молекул на основе литохолевой кислоты и биопредшественника ацетогенинов – мурикаденина и его аналогов.

**Практическая ценность работы.** В результате проведенных исследований Ti-катализируемого гомо(кросс)-цикломагнирования O-содержащих и терминальных алифатических 1,2-диенов с помощью EtMgBr в присутствии металлического магния, а также реакций этерификации полученных 5Z,9Z-диеновых кислот со стероидами разработаны эффективные препаративные способы синтеза гибридных молекул, представляющих значительный интерес для получения ценных биологически активных соединений и лекарственных препаратов. Показано, что новые гибридные молекулы проявляют высокую цитотоксичность *invitro* в отношении опухолевых клеточных линий, оказывают фазоспецифичное цитотоксическое действие в период S и G2 фазы клеточного цикла, а также являются эффективными индукторами апоптоза.

**Апробация работы и публикации.** Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на XIX Молодёжной конференции-школе по органической химии «Оргхим» (г. Санкт-Петербург, 2016); XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (г. Екатеринбург,

2016); X Международной конференции молодых учёных по химии «Менделеев-2017» (г. Санкт-Петербург, 2017); X Всероссийской научной конференции и школе молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (г. Казань, 2017); Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии» (г. Новосибирск, 2017); IV Всероссийской молодежной конференции «Достижения молодых ученых: химические науки» (г. Уфа, 2018); II Всероссийской "Байкальской школе-конференции по химии" (г. Иркутск, 2018); Междисциплинарном симпозиуме по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике, (МОБИ-ХимФарма, 2018).

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в зарубежных журналах, 8 тезисов докладов конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора на тему «Гибридные молекулы на основе стероидов, третерпеноидов и жирных кислот», обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы из 121 наименований. Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста, включает 13 рисунков, 6 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **1. Синтез гибридных молекул на основе кето-, этиленгликоль производных и оксимов стероидов и (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-дикарбоновой кислоты и их противоопухолевая активность**

Ненасыщенные жирные кислоты, выделенные из морских губок и некоторых видов растений, представляют интерес благодаря проявляемому ими широкому спектру биологических активностей, таких как антимицобактериальная, фунгицидная, антимикробная, противомаларийная и противоопухолевая активность. Кроме того, 5Z,9Z-диеновые кислоты

проявляют высокую ингибирующую активность в отношении человеческих топоизомераз I и II, рассматриваемых в качестве перспективных внутриклеточных мишеней действия химиотерапевтических препаратов, которые препятствуя репарации разрывов, способны вызывать накопление повреждённых молекул ДНК, форсируя, таким образом, гибель опухолевой клетки.

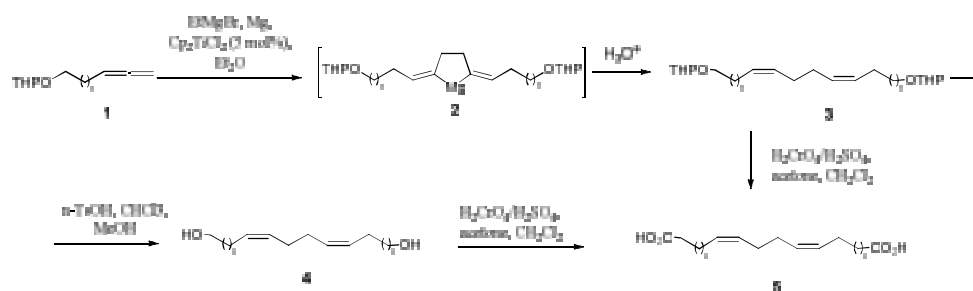
В последние годы в литературе появляется все больше сообщений о возможности применения в лечении онкологических заболеваний цитотоксичных стероидов, большинство из которых представляют собой гибридные молекулы, в которых цитотоксичный заместитель связан с одной из функциональных групп стероида. Стероидный радикал в данных молекулах выполняет роль транспорта цитостатика, благодаря своим липофильным свойствам и возможности легко проникать через билипидный слой биологических мембран, обеспечивая, тем самым, доступ к определенным целевым белкам и увеличивая селективность действия лекарственного соединения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что основным механизмом действия стероидных молекул является воздействие последних непосредственно на генетический аппарат клетки.

Ранее в нашей лаборатории был разработан оригинальный стереоселективный метод синтеза диеновых кислот, содержащих 1Z,5Z-диеновый фрагмент в указанном положении по отношению к карбоксильной группе. Метод основан на использовании новой реакции каталитической кросс-цикломагнирования функционально замещенных 1,2-диенов на ключевой стадии синтеза. Этот подход обеспечивает двухэтапное стереоселективное получение природных или синтетических диеновых кислот с высокими выходами. Кроме того, было обнаружено, что в зависимости от положения диеновой группы кислоты могут эффективно ингибировать топоизомеразу I или II, а также выступать в качестве двойственных ингибиторов топоизомераз.



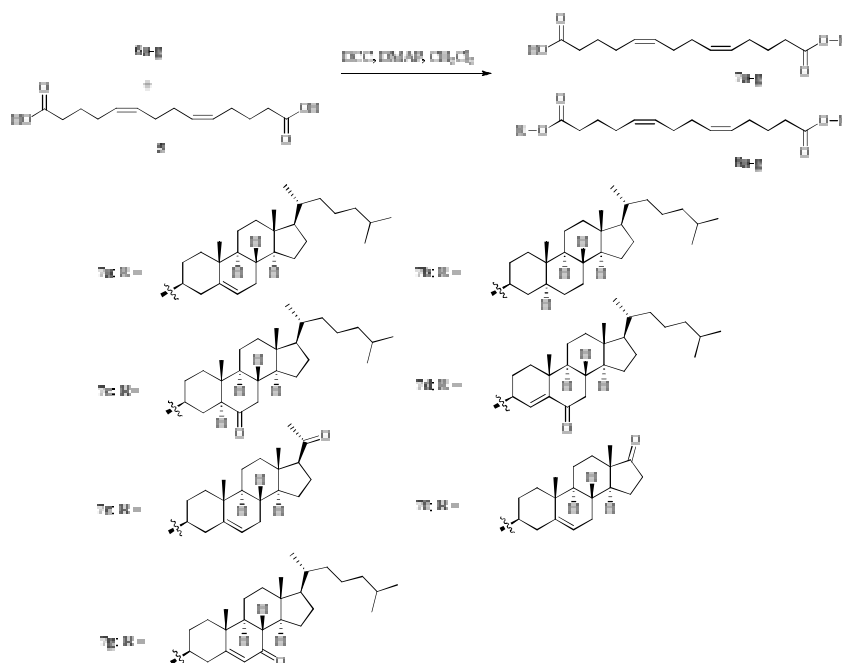
С целью реализации запланированной программы исследований по синтезу гибридных молекул на основе стероидов и *5Z,9Z*-диеновых кислот на первом этапе разработали метод синтеза (*5Z,9Z*)-тетрадека-5,9-диендикарбоновой кислоты **5** с выходом 52%, основанный на последовательным гомо-цикломагнитировании тетрагидропиранового эфира 5,6-гепта-5,6-диен-1-ола **1** с помощью EtMgBr в присутствии магния и катализатора  $\text{Cr}_2\text{TiCl}_2$  (5 мол%) с получением *insitu* магнезациклопентана **2**, кислотный гидролиз которого дает 1,14-бис-тетрагидропиранил-*5Z,9Z*-диен-1,14-диол **3**. Окисление последнего реактивом Джонса дает целевую кислоту **5** с выходом 74% (Схема 1).

Схема 1

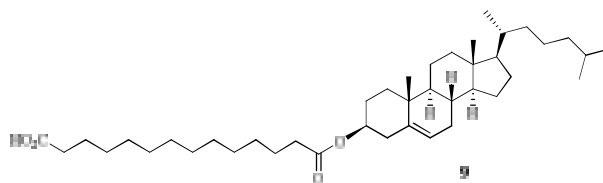


На следующем этапе наших исследований реакцией каталитической этерификации стероидов **6a-g** (холестерин, холестеран и их кетоаналоги, прегненолон, андростерон) с (*5Z,9Z*)-тетрадека-5,9-диеновой кислотой **5** с помощью DCC/DMAP получили целевые *5Z,9Z*-диеновые кислоты **7a-g** с выходами ~55–60% наряду с симметричными димерами **8a-g**, выход которых не превышает 15% (Схема 2).

## Схема 2



Нами впервые синтезирован моноэфир **9** (Рис. 1) реакцией 1,14-тетрадекандикарбоновой кислоты с холестерином под действием каталитических количеств DCC/DMAP, использованный в качестве вещества сравнения.



**Рисунок 1.** Структура 14-[(3β)-холест-5-ен-3-илокси]-14-оксотетрадекановой кислоты **9**

Структуры синтезированных соединений **7a–g** надежно охарактеризованы с помощью одно- ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ) и двумерных (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) экспериментов ЯМР.

Новые полусинтетические производные 5Z,9Z-диеновых кислот стероидной структуры **7a-g**, **9** испытали *invitro* на ингибирующую активность по отношению к человеческой топоизомеразе IhTopI в реакции релаксации

суперскрученной плазмидной ДНК в стандартных условиях. Во всех опытах в качестве контроля использовали известный ингибитор hTopI - камптотецин. Установили, что под действием топоизомеразы I суперскрученная форма плазмидной ДНК релаксирует, образуя набор топоизомеров. Судя по остаточному количеству не вступившей в реакцию суперспирализованной формы плазмиды, ингибирующая активность соединений **7c**, **7e** и **7g** оказалась несколько выше, чем всех остальных соединений в диапазоне концентраций от 1  $\mu\text{M}$  до 0.02  $\mu\text{M}$ .

В продолжение намеченных исследований для всех синтезированных кислот было проведено тестирование ингибирующей активности новых – стероидных производных 5Z,9Z-диеновых кислот (**7a–g**) на жизнеспособность опухолевых клеток человека на примере опухолевых линий HEK293, Jurkat и K562. В качестве контроля использовали известные ингибиторы топоизомераз I и II, камптотецин и этопозид, соответственно. Также были протестированы прекурсоры соединений **7a–g** - холестан, прегненолон и андростерон. Количественная характеристика цитотоксической активности (50 % ингибирующие дозы, IC<sub>50</sub>) производных 5Z,9Z-диеновых кислот, а также известных ингибиторов топоизомераз (камптотецина и этопозида) приведена в таблице 1.

**Таблица 1.** Ингибирование жизнеспособности опухолевых клеток производными 5Z,9Z-диеновых кислот **7a–g**, **9**, IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )  $\pm$ SE.

Соединение	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) HEK 293	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) Jurkat	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) K562	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) Normal lymphocytes	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) Fibroblasts
<b>7a</b>	0.13 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.06	0.67 $\pm$ 0.04
<b>7b</b>	1.4 $\pm$ 0.09	0.8 $\pm$ 0.008	0.28 $\pm$ 0.001	0.50 $\pm$ 0.003	0.54 $\pm$ 0.01
<b>7c</b>	0.16 $\pm$ 0.013	0.40 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.016	0.34 $\pm$ 0.011	0.55 $\pm$ 0.01
<b>7d</b>	0.19 $\pm$ 0.016	0.13 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.06
<b>7e</b>	0.11 $\pm$ 0.010	0.18 $\pm$ 0.001	0.19 $\pm$ 0.014	4.24 $\pm$ 0.013	8.28 $\pm$ 0.016
<b>7f</b>	2.6 $\pm$ 0.09	3.5 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.12	6.6 $\pm$ 0.10	8.0 $\pm$ 0.15
<b>7g</b>	0.12 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.09	1.8 $\pm$ 0.16	2.0 $\pm$ 0.10
<b>9</b>	10.0 $\pm$ 0.8	21.5 $\pm$ 1.2	14.4 $\pm$ 1.2	18.18 $\pm$ 0.8	62.4 $\pm$ 1.2
Холестан	125.17 $\pm$ 0.9	133.6 $\pm$ 2.3	145.4 $\pm$ 1.6	182.9 $\pm$ 1.3	145.1 $\pm$ 1.6

Прегненолон	78.2±0.5	59.6±0.2	183.9±1.1	143.2±1.2	130.1±3.7
Андростерон	88.2±1.7	70.6±2.1	135.9±2.1	128.2±1.2	100.3±1.4
Камптотецин	25.17±0.9	45.4±1.6	33.6±2.3	60.9±1.6	82.9±1.3
Этопозид	19.45±0.8	48.6±2.5	34.7±1.5	74.5±1.8	68.5±1.4

Из результатов, полученных в ходе эксперимента и представленных в таблице 1, видно, что клеточные линии оказались в разной степени чувствительны к действию изучаемых стероидных гибридных соединений. Выраженная гетерогенность значений IC50 между различными клеточными линиями опухолевых клеток *invitro* является одним из главных критериев, свидетельствующих в пользу специфической противоопухолевой активности, нежели о неспецифической токсичности, где в разных линиях получаются значения IC50, сходные между собой. Кроме того, наблюдается хорошая корреляция цитотоксического действия кислот с их ингибирующей активностью по отношению к топоизомеразе I.

Ингибирующая доза (IC50) исследованных соединений находилась в интервале между 0.11±0.010 и 145.1±1.6 мМ. Соединение **7e** явилось наиболее активным ингибитором роста опухолевых клеток НЕК293, Jurkat и К562, поскольку оно ингибировало жизнеспособность клеток в наименьших концентрациях (IC50 составила 0.18±0.001–8.28±0.016 мМ), чем камптотецин (IC50 25.17±0.9–82.9±1.3 мМ) или этопозид (IC50 19.45±0.8–74.5±1.8 мМ) (табл. 1).

Наряду с полученными экспериментальными результатами нами проведено теоретическое исследование механизма действия гибридных молекул и 5,9-диеновых кислот с помощью молекулярного докинга. С помощью программы AutoDock 3.0 был проведен анализ взаимодействия производных 5Z,9Z-диеновых кислот стероидной структуры **7a-g**, **9c** К443, К587 и N722 аминокислотными остатками фермента в области 1A36. В результате было обнаружено, что наиболее типичный сценарий взаимодействия холестерин содержащей кислоты с белком заключается в

связывании карбоксилат-аниона с каталитическим центром топо I (K443, K587 и N722), находящегося на внутренней поверхности белка напротив “губ” фермента (рис.2).

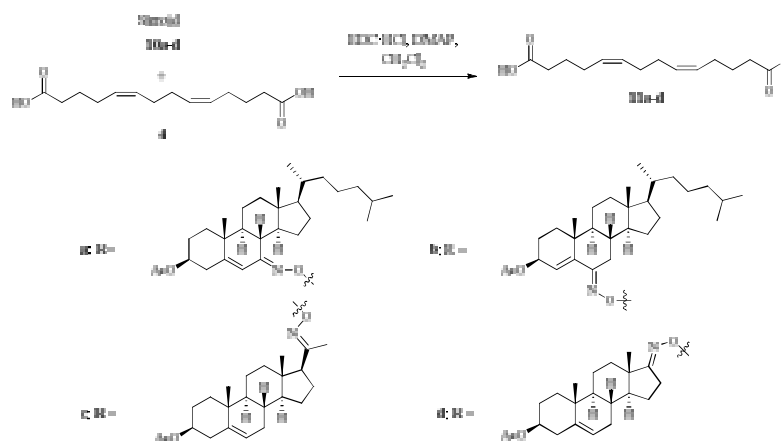


**Рисунок 4.** Молекулярный докинг кислоты **6св** полости топоизомеразы I.

В развитие исследований по разработке новых эффективных, малотоксичных и избирательно действующих противоопухолевых препаратов, а также с целью изучения влияния структуры исходных молекул на биологические свойства полученных соединений нами синтезированы гибридные молекулы на основе оксимов, моно- и диэтиленгликоль производных холестерина, прегненолона, андростерона и тетрадека-5*Z*,9*Z*-диен-1,14-дикарбоновой кислоты.

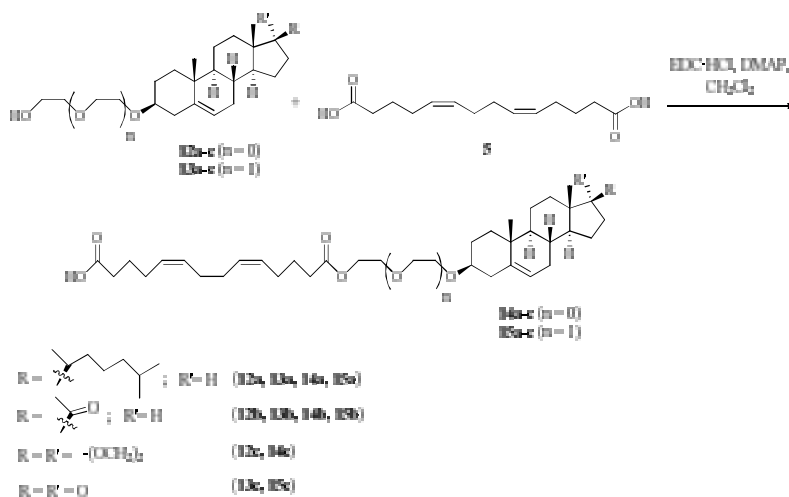
Взаимодействие 1,14-тетрадека-5*Z*,9*Z*-диендикарбоновой кислоты **5**соксимами кето-стероидов **10a-d** осуществили с применением *N*-[3-(метиламино)пропил]-*N'*-этилкарбодиимидгидрохлорида (EDC·HCl) и каталитических количеств 4-диметиламинопиридина (DMAP) (Схема 3).

**Схема 3**



В аналогичных условиях были получены гибридные молекулы **14a–c**, **15a–c** на основе моно- **12a–c** и диэтиленгликоль **13a–c** производных стероидов 1,14-тетрадека-5*Z*,9*Z*-диендикарбоновой кислоты **5** (Схема 4).

Схема 4



Для всех синтезированных кислот **11a-d**, **14a–c**, **15a–c** и предшествующих им исходных стероидов **10a-d**, **12a–c**, **13a–c** нами впервые была проведена оценка противоопухолевой активности *invitro* на клеточных линиях Jurkat, K562, Hek293, HeLa, и U937, включающая определение IC<sub>50</sub> (Таблица 2 и Таблица 3).

**Таблица 2.** Ингибирование жизнеспособности опухолевых клеток производными 5*Z*,9*Z*-диеновых кислот **11a-d** и оксимами стероидов **10a-d**, IC<sub>50</sub> (μM) ± SE.

	Jurkat	K562	U937	Hek293	HeLa	Fibrobl.
IC <sub>50</sub> (10a)	1.36±0.026	1.14±0.027	0.81±0.035	0.92±0.033	0.73±0.028	1.52±0.034
IC <sub>50</sub> (10b)	1.12±0.029	0.61±0.023	0.71±0.029	1.24±0.037	1.04±0.027	1.39±0.045

<b>IC<sub>50</sub> (10c)</b>	0.82±0.015	1.01±0.022	0.74±0.018	0.62±0.021	0.64±0.024	1.19±0.032
<b>IC<sub>50</sub> (10d)</b>	0.67±0.012	0.53±0.017	0.45±0.025	0.74±0.021	0.71±0.015	1.12±0.021
<b>IC<sub>50</sub>(11a)</b>	0.68±0.018	0.27±0.027	0.38±0.035	0.49±0.023	0.30±0.034	1.17±0.047
<b>IC<sub>50</sub> (11b)</b>	0.51±0.026	0.33±0.021	0.49±0.035	0.76±0.023	0.58±0.017	1.13±0.043
<b>IC<sub>50</sub> (11c)</b>	0.32±0.035	0.34±0.012	0.41±0.028	0.13±0.011	0.29±0.036	0.79±0.019
<b>IC<sub>50</sub> (11d)</b>	0.02±0.004	0.02±0.003	0.04±0.003	0.03±0.007	0.17±0.006	0.55±0.023
<b>IC<sub>50</sub>(camp.)</b>	1.12±0.012	2.10±0.013	1.32±0.011	3.21±0.017	2.18±0.016	4.19±0.067

**Таблица 3.** Цитотоксическая активность синтезированных гибридных стероидов 14a–с и 15a–с измерена на культурах опухолевых клеток (Jurkat, K562, Hek293, HeLa, U937) и на нормальных фибробластах ( $\mu\text{M}$ )  $\pm$  SE.

	<b>Jurkat</b>	<b>K562</b>	<b>Hek293</b>	<b>HeLa</b>	<b>U937</b>	<b>Fibroblasts</b>
<b>IC<sub>50</sub> (14a)</b>	0.18±0.001 9	0.15±0.001 1	0.51±0.00 15	0.79±0.005 7	0.26±0.0048	1.17±0.00 11
<b>IC<sub>50</sub> (14b)</b>	0.06±0.002 3	0.15±0.001 2	0.42±0.00 14	0.15±0.001 7	0.10±0.0011	0.67±0.00 33
<b>IC<sub>50</sub> (14c)</b>	0.13±0.001 1	0.14±0.001 2	0.03±0.00 43	0.68±0.003 1	0.16±0.0034	0.69±0.00 38
<b>IC<sub>50</sub> (15a)</b>	0.20±0.002 9	0.39±0.004 3	0.48±0.00 12	0.75±0.003 6	0.30±0.0042	0.82±0.00 31
<b>IC<sub>50</sub> (15b)</b>	0.14±0.001 2	0.11±0.001 7	0.41±0.00 38	0.53±0.001 2	0.13±0.0028	0.77±0.00 15
<b>IC<sub>50</sub> (15c)</b>	0.33±0.003 7	0.21±0.002 4	0.62±0.00 11	0.74±0.004 8	0.21±0.0024	0.64±0.00 28
<b>IC<sub>50</sub> (camp.)</b>	1.03±0.001 5	1.29±0.001 9	1.41±0.00 15	1.19±0.004 9	0.98±0.0025	3.64±0.00 17

Наибольшую активность в отношении клеток хронической миелоидной лейкемии (линия K562) и Т-клеточной лейкемии (Jurkat) проявила кислота 11d ( $\text{IC}_{50}= 0,14$  и  $\text{IC}_{50}= 0,09$ , соответственно) в ряду соединений 11a–d, при этом ее цитотоксический эффект носит дозозависимый характер и значительно превышает активность камптотецина на клетках данных линий.

Из таблицы 3 видно, что в целом, значение ингибирующей концентрации  $\text{IC}_{50}$  для кислот 14b и 15b, полученное в результате экспозиции исследуемых соединений на клеточных линиях с последующим окрашиванием клеток красителем 7AAD варьируется в зависимости от

клеточной культуры, но наименьшая она для двух линий - Jurkat и U937. В случае с культурой Jurkat она наименьшая и составляет 0.06  $\mu\text{M}$  для соединения 14b и 0.14  $\mu\text{M}$  для вещества 15b. В случае с культурой U937 она составляет 0.10  $\mu\text{M}$  для соединения 14b и 0.13  $\mu\text{M}$  для 15b.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что стероид содержащие 5Z,9Z-диеновые кислоты, полученные каталитической этерификацией (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диендикарбоновой кислоты с оксимами, гидрокси-, моно- и диэтиленгликольпроизводными стероидов под действием DCC/DMAP (или EDC·HCl/DMAP) способны индуцировать апоптоз клеточных линий рака K562, HeLa, Hek296, U937, Jurkat и K562, а также ингибируют процессы релаксации суперскрученной ДНК под действием топоизомеразы *in vitro*.

## **2. Синтез и противоопухолевая активность гибридных молекул на основе литохоевой и (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диендикарбоновой кислот**

Неотъемлемой частью в исследованиях биологической активности соединений является изучение влияния строения молекул, поэтому следующим этапом наших исследований, касающихся конструирования гибридных систем, проявляющих противоопухолевую активность, стал синтез конъюгатов на основе литохоевой и (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диендикарбоновой кислот, которые связаны между собой через этиленгликолевые и диаминоалкановые спейсеры разной длины.

Желчные кислоты представляют собой конечные продукты обмена холестерина и играют важную роль в регулировании процесса пищеварения, переваривания и абсорбции пищевых жиров и жирорастворимых витаминов. Однако после открытия в 1999 г фарнезоидных X-рецепторов (FXR), эндогенными лигандами которых являются желчные кислоты и обнаружения Магуама и др. G-белкового рецептора клеточной мембраны (TGR5), который также активируется с помощью желчных кислот, физиологическая



роль ЖК в организме значительно расширилась. Желчные кислоты стали рассматривать в качестве сигнальных молекул с различными эндокринными и паракринными функциями, участвующие в гомеостазе холестерина, липидного и углеводного обмена, а также в регулировании иммунной системы.

Наиболее гидрофобной из желчных кислот является литохолевая кислота, которая содержится в желчи человека в очень малых количествах. Следует особо отметить, что литохолевая кислота и ее производные проявляют противомикробную, антибактериальную, противоопухолевую активность. Кроме того они являются регуляторами протеасом, модуляторами рецептора витамина D, ингибиторами ДНК-полимераз  $\beta$  ( $pol\beta$ ).

Использование диаминоалканоновых фрагментов в качестве спейсеров обусловлено тем, что полиаминовые соединения выполняют важные физиологические функции в организме, участвуя в регуляции клеточного роста, пролиферации, дифференциации и регуляции экспрессии генов. Немаловажным свойством полиаминов является их способность взаимодействовать с высокомолекулярными макромолекулами (белками, ДНК и РНК) и мембранными структурами. Показано, что полиамины участвуют в регуляции апоптоза, проявляя как про-, так и антиапоптозный эффект в зависимости от условий эксперимента.

В свою очередь этиленгликоли являются своеобразными «якорями» для биологических рецепторов и лигандов, которые уменьшают неспецифическое связывание белков и других биоактивных молекул.

Синтез целевых гибридных молекул на основе литохолевой кислоты осуществили применяя два подхода. Во-первых, ацелирование литохолевой кислоты в С-3 положении с помощью дикарбоновой кислоты, второй способ подразумевает модификацию карбоксильной группы в С-24 положении (Схема 5 и 6).

Схема 5

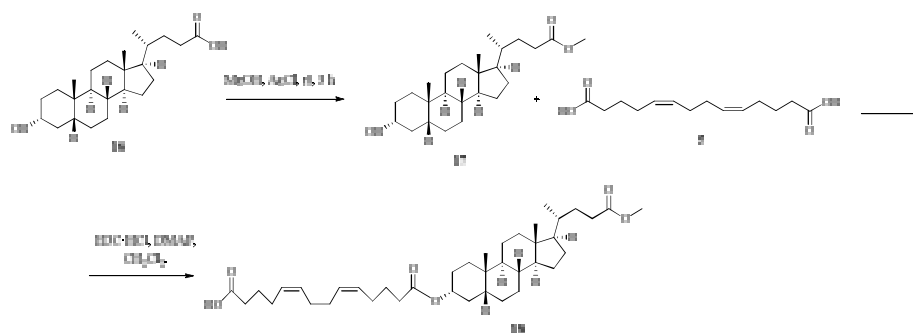
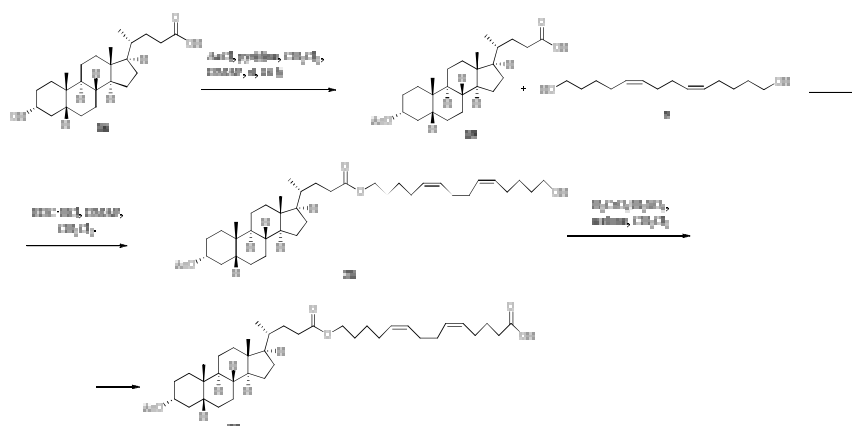
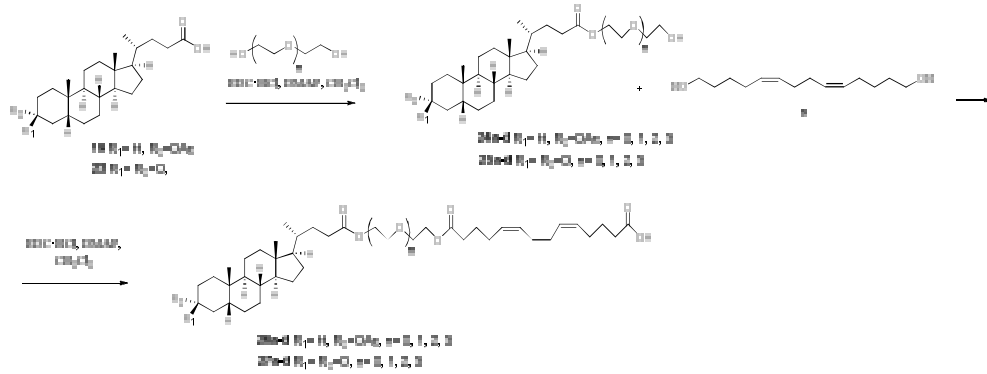


Схема 6



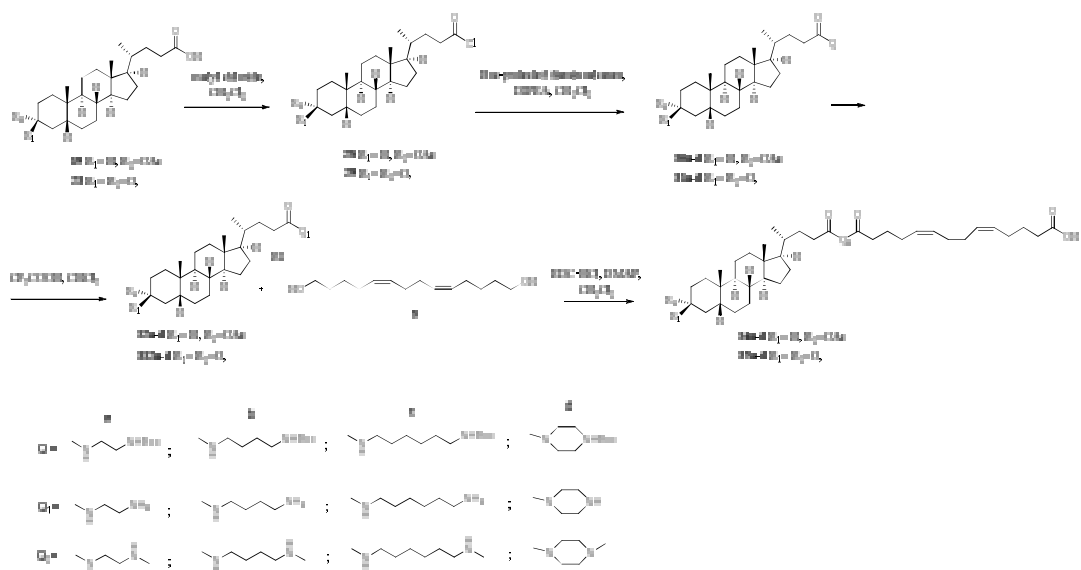
С целью изучения влияния этиленгликолевых и диаминоалкановыхспейсеров на противораковую активность соединений, были синтезированы конъюгатылитохолевой и (5*Z*,9*Z*)-тетрадека-5.9-диендикарбоновой кислот, связанные через этиленгликолевые и диаминоалкановые фрагменты разной длины (Схема 7, Схема 8). Реакцию этерификации этиленгликолей с 3α-О-ацетиллитохолевой кислотой**19** и 3-оксохолан-24-овой кислотой**23**, а также синтез целевых (5*Z*,9*Z*)-диеновых кислот литохолевой кислоты**26a-d** и **27a-d**проводили в присутствии*N*-[3-(метиламино)пропил]-*N'*-этилкарбодиимидгидрохлорида (EDC·HCl) и каталитических количеств 4-диметиламинопиридина (DMAP).

Схема 7



Синтез конъюгатов литохолевой и (5*Z*,9*Z*)-тетрадека-5,9-диендикарбоновой кислот, связанные через диаминоалкановые фрагменты разной длины осуществили в несколько стадий. Первоначально, были синтезированы хлорангидрид производные **28** и **29** соединений **19** и **23** с помощью оксалилхлорида в дихлорметане. Хлорангидрид производные **28** и **29** были вовлечены в реакцию с диаминоалканами, в которых одна из аминогрупп защищена с трет-бутоксикарбонильной защитой (Boc), с образованием амидов **30a-d** и **31a-d**. После снятия Boc-защиты в соединениях **30a-d** и **31a-d** с помощью трифторуксусной кислоты в хлороформе, амиды **32a-d** и **33a-d** этерифицировали с (5*Z*,9*Z*)-тетрадека-5,9-диендикарбоновой кислотой **5** по вышеприведенной методике (Схема 8).

Схема 8



Структура синтезированных гибридных молекул установлена с помощью масс-спектрометрии и ЯМР спектроскопии  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , а также двумерных гетероядерных корреляционных экспериментов (HSQC, HMBC).

### **3. Ti-Катализируемое кросс-цикломагнирование 1,2-диенов в синтезе мурикаденина и его аналогов, исследование ингибирующей активности к человеческой топоизомеразе I / Pa и цитотоксическое действие на опухолевые клетки**

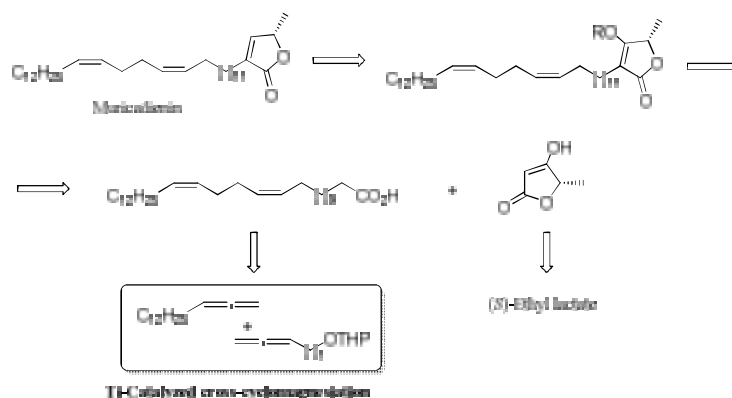
На следующем этапе диссертационного исследования была определена задача по разработке эффективного малостадийного метода синтеза мурикаденина-биопредшественника ацетогенинов на основе Ti-катализируемой реакции кросс-цикломагнирования O-содержащих и терминальных алифатических 1,2-диенов с помощью  $\text{EtMgBr}$  в присутствии металлического магния.

Ацетогенины - группа природных соединений, выделяемых из листьев, корней, семян и коры растений рода *Annonaceae*, представляющие собой неразветвленные жирные кислоты (C32–C34), содержащие  $\gamma$ -лактонный фрагмент. В большинстве случаев молекулы ацетогенинов содержат дополнительные гидроксильные, кетонные, эпоксидные, тетрагидрофурановые и тетрагидропирановые группы, а также двойные и тройные связи. Повышенный интерес к этому классу соединений обусловлен широким спектром проявляемых ими биологических активностей, например, инсектицидная, антифидантная, антипротозойная, иммуносупрессорная и противоопухолевая. Более того, показано, что ацетогенины способны оказывать цитотоксическое действие на опухоли с множественной лекарственной устойчивостью и являются наиболее активными среди известных на сегодняшний день ингибиторов митохондриального комплекса I.

Несмотря на то, что в литературе имеется большое число исследований, посвященных изучению противоопухолевой активности соламина и его производных до настоящего времени отсутствуют сведения о биологической активности его биопредшественника - мурикадиенина. Следует отметить, что мурикадиенин не был выделен в чистом виде, а имеющийся в литературе единственный пример его полного синтеза, осуществленный в 2014 году К. Старком (Christian B. W. Stark) в 11 стадий с выходом 42%, по мнению авторов, ограничен для широкого распространения в практике из-за многостадийности.

Для рационального выбора схемы синтеза мурикадиенина нами проведен ретросинтетический анализ структуры последнего, который предполагает последовательно стереоселективный синтез (13Z,17Z)-триаконта-13,17-диеновой кислоты, каталитического кросс-цикломагнирования на ключевой стадии с последующим формированием терминального  $\alpha$ -замещенного бутенолида, включающего перегруппировку Фриса на завершающей стадии синтеза (Схема9).

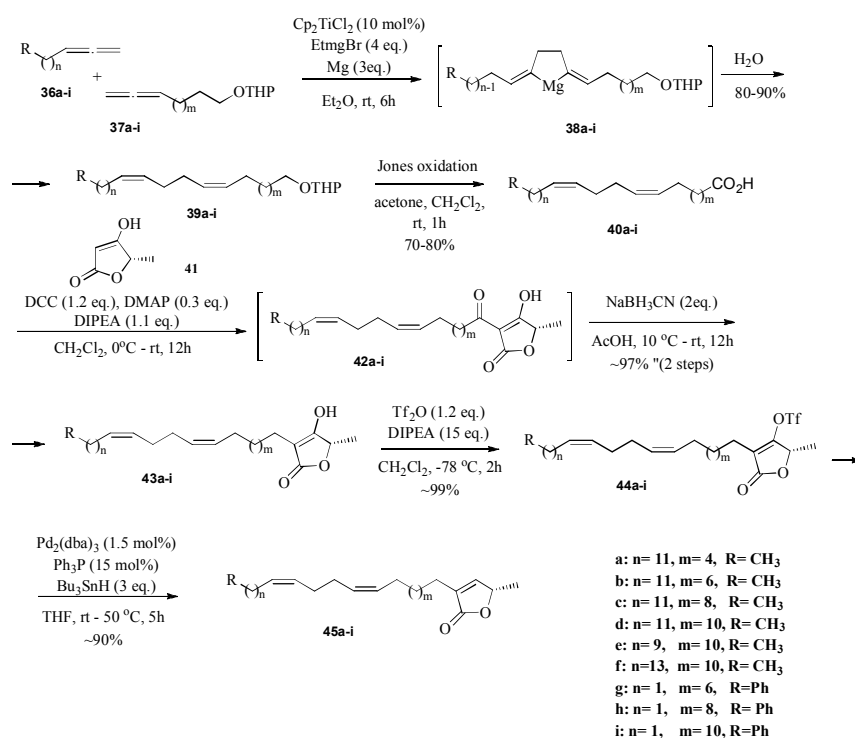
Схема 9



В соответствие с разработанной схемой ключевой синтон при получении мурикадиенина – (13Z,17Z)-триаконта-13,17-диеновая кислота **40d** синтезирована в две стадии с применением ранее разработанной реакции кросс-цикломагнирования 1,2-пентадекадиена **36d** и пиранового эфира 13,14-пентадекадиенола **37d** с помощью EtMgBr (2:3:EtMgBr:Mg:[Ti] =

10:12:40:30:0.5; Et<sub>2</sub>O, 6 h, rt) в присутствии катализатора Cp<sub>2</sub>TiCl<sub>2</sub> (5 мол %) с последующим окислением образующегося после гидролиза магнезациклопентана **38d** пиранового эфира (13*Z*,17*Z*)-триаконта-13,17-диенола **39d** реактивом Джонса с выходом ~68% на две стадии (Схема 10).

## Схема 10



Формирование терминального бутенолидного фрагмента выполнено с привлечением описанного в литературе метода, который основан на применении перегруппировки Фриса, катализируемой DMAP (Схема 10). О-Ацилирование циклического β-кето эфира **41**, полученного согласно известной методике в две стадии из (S)-этиллактата кислотой **40d** с последующей перегруппировкой Фриса, инициированной DMAP приводит к образованию интермедиата **42d**, восстановление которого с помощью

$\text{NaBH}_3\text{CN}$  в уксусной кислоте дает  $\alpha$ -алкилированный бутенолид **43d** с высоким выходом ~97%.

На завершающем этапе последовательно осуществили синтез трифлата бутенолида **44d** и его восстановление с помощью  $\text{Bu}_3\text{SnH}$ , катализируемое  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , что привело к получению целевого (+)-мурикаденина (**45d**) с выходом ~60%.

С целью изучения влияния длины и природы углеводородной цепи, а также удаления лактонового кольца от *Z,Z*-ненасыщенной системы на противоопухолевую активность производных мурикаденина нами синтезированы несколько аналогов мурикаденина с различной длиной углеводородной цепи (Схема 10).

#### **4. Синтез гибридных молекул на основе ацетогенинов и литохоловой кислоты и их противоопухолевая активность**

Вне всякого сомнения, отправной точкой в развитии исследований и всестороннего изучения ацетогенинов в качестве уникальных потенциальных объектов для создания лекарственных препаратов можно считать выделение из корней *Uvaria accuminata* в 1982 г биологически активного уварицина, который проявил высокую противоопухолевую активность в системе лимфоцитарной лейкемии P-388 у мышей. С тех пор в литературе описано и идентифицировано более чем 400 ацетогенинов, выделенных из различных растений семейства *Annonaceae*, которые широко распространены в тропических и субтропических регионах. Кроме того, осуществленные за последние десятилетия многими группами исследователей многостадийные синтезы более 100 видов ацетогенинов позволили лучше понимать полное строение и абсолютную конфигурацию некоторых тяжело хроматографируемых стереоизомеров.

Несмотря на значительные успехи в изучении структуры и биологической активности ацетогенинов, а также в разработке

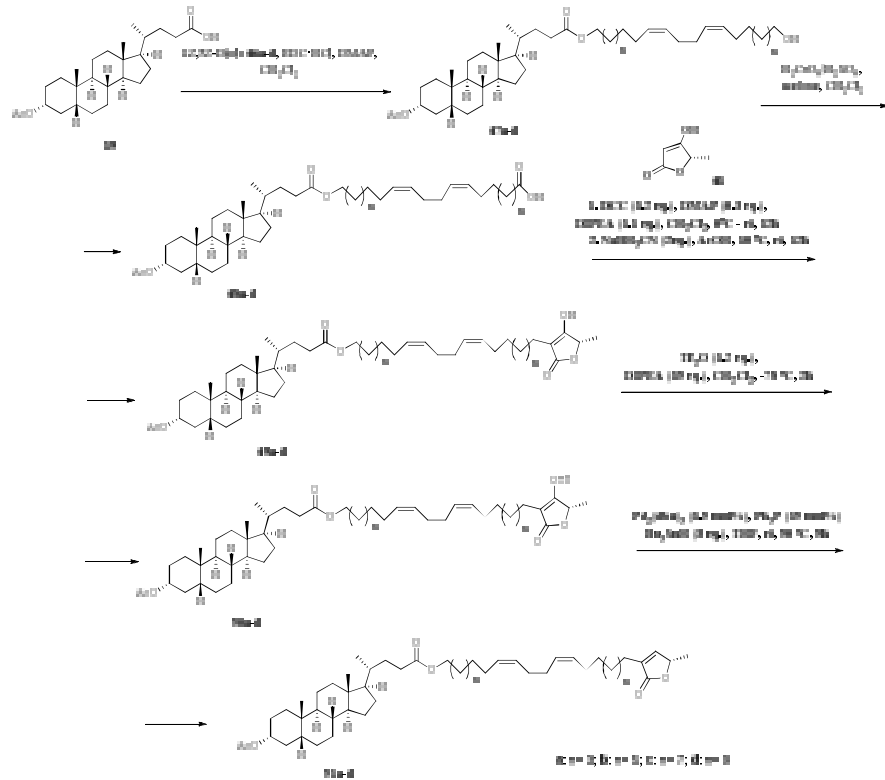
разносторонних подходов в синтезе данного класса соединений и их аналогов, в мировой литературе практически отсутствуют сведения по синтезу гибридных молекул на основе стероидов и ацетогенинов.

В связи с вышесказанным, принимая во внимание высокую практическую значимость исследований, направленных на разработку эффективных методов синтеза гибридных систем сочетающих в себе структурные особенности двух или более различных биологически активных фрагментов, нами осуществлен синтез конъюгатов литохолевой кислоты и аналогов мурикаденина.

На начальной стадии были синтезированы 1*Z*,5*Z*-диола **46a–d** с применением ранее разработанной реакции гомо-цикломагнирования тетрагидропирановых эфиров 1,2-диеновых спиртов с помощью EtMgBr в присутствии катализатора Cr<sub>2</sub>TiCl<sub>2</sub> (5 мол %) и последующим снятием тетрагидропиранильной защиты с соединений образующихся после продукта в присутствии каталитических количеств *n*-толуолсульфокислоты (Схема 1). Дальнейшее взаимодействие 1*Z*,5*Z*-диола **46a–d** с 3α-О-ацелиллитохолевой кислотой проходит в присутствии *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимидгидрохлорида (EDC·HCl) и каталитических количеств диметиламинопиридина (DMAP) с образованием продуктов ацелирования **47a–d**. Реакцией окисления соединений **47a–d** реагентом Джонса были получены стероидные кислоты **48a–d** хорошими выходами 77%. Формирование терминального бутенолидного фрагмента выполнено с привлечением метода, о котором было сказано выше.

**Схема 11**





Структура синтезированных гибридных молекул **51a-d** надежно доказана с помощью масс-спектрометрии и ЯМР спектроскопии  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , а также двумерных гетероядерных корреляционных экспериментов (HSQC, HMBC). В спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  соединений **51a-d** в слабом поле наблюдаются, помимо сигналов углеродов сложноэфирных групп литохоловой кислоты, сигналы при  $\delta\text{C} = 134$ , 148 и 173 м.д., соответствующие углеродам бутенолидного кольца, а также сигналы углеродов двойных связей углеводородной цепи ацетогенинного остатка при  $\delta\text{C} = 129$  и 130 м.д. Метильные протоны бутенолидного кольца и протон при двойной связи в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  характеризуются дублетом с центром при  $\delta = 1.4$  м.д. и  $\delta = 6.9$  м.д., соответственно, метиновый протон дает квартет с центром при  $\delta = 5.0$  м. д.

### Выводы

1. В результате проведенных исследований осуществлен синтез гибридных молекул на основе стероидов (холестерин, андростерон, прегненолон и литохоловая кислота) и 5Z,9Z-диендикарбоновой кислоты с применением на

ключевой стадии реакции гомо-цикломагнирования O-содержащих 1,2-диенов с помощью EtMgBr в присутствии катализатора  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$ .

2. Разработан эффективный пятистадийный метод получения биопредшественника ацетогенинов – мурикадиенина и его аналогов, выделенных в минорных количествах из корней *Annonamuricata* с применением реакции кросс-цикломагнирования O-содержащих и алифатических 1,2-диенов с помощью EtMgBr в присутствии катализатора  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$ .

3. Впервые разработан эффективный метод синтеза гибридных молекул на основе литохолевой кислоты и ацетогенинов с применением на ключевой стадии реакции гомо-цикломагнирования O-содержащих 1,2-диенов с помощью EtMgBr в присутствии катализатора  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$ .

4. С привлечением современных методов проточной цитофлуориметрии и мультиплексного анализа впервые показано, что синтезированные гибридные молекулы проявляют высокую цитотоксическую активность *invitro* в отношении опухолевых клеточных линий Jurkat, K562, U937, HeK293 and HeLa. Кроме того, показано что гибель опухолевых клеток имеет дозозависимый характер и проходит через индукцию раннего и позднего апоптоза.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

**Статьи:**

1. V.A. Dyakonov, R. A. Tuktarova, S. R. Ishmukhametova, U. M. Dzhemilev. The facile first total synthesis of a deuterated analog of natural muricadienin// Tetrahedron. – 2016. – V. 72. – P. 5783–5787.
2. U. M. Dzhemilev, V. A. D'yakonov, R. A. Tuktarova, L. U. Dzhemileva, S. R. Ishmukhametova, M. M. Yunusbaeva, A. de Meijere. Short Route to the Total Synthesis of Natural Muri-cadienin and Investigation of Its Cytotoxic Properties. // J. Nat. Prod. – 2016. – V. 79. – P. 2039–2044.

3. V. A. D'yakonov, L. U. Dzhemileva, R. A. Tuktarova, S. R. Ishmukhametova, M. M. Yunusbaeva, I. R. Ramazanova, U.M. Dzhemilev. Novel hybrid molecules on the Basis of Steroids and (5Z,9Z)-Tetradeca-5,9-dienoic Acid: Synthesis, Anti-Cancer Studies and Human Topoisomerase I Inhibitory Activity. // *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* – 2017. – V. 17. – P. 1126–1135.
4. V. A. D'yakonov, L. U. Dzhemileva, R. A. Tuktarova, S. R. Ishmukhametova, M. M. Yunusbaeva, U.M. Dzhemilev. Catalytic cyclometallation in steroid chemistry VI: Targeted synthesis of hybrid molecules based on steroids and tetradeca-5Z,9Z-diene-1,14-dicarboxylic acid and study of their antitumor activity. // *Steroids.* – 2018. – V. 138. – P. 6–13.
5. V. A. D'yakonov, L. U. Dzhemileva, R. A. Tuktarova, S. R. Ishmukhametova, M. M. Yunusbaeva, U.M. Dzhemilev. Catalytic cyclometallation in steroid chemistry V: Synthesis of hybrid molecules based on steroid oximes and (5Z,9Z)-tetradeca-5,9-dienedioic acid as potential anticancer agents. // *Steroids.* – 2018. – V. 138. – P. 14–20.

***Тезисы докладов:***

6. Туктарова Р.А., Ишмухаметова С.Р., Дьяконов В.А., Джемилев У.М. Гибридные молекулы на основе оксимов стероидов и тетрадека-5Z,9Z-диен-1,14-дикарбоновой кислоты: синтез и противоопухолевая активность // Кластер конференций по органической химии «ОргХим-2016». – Санкт-Петербург. – 2016.
7. Дьяконов В.А., Макаров А.А., Туктарова Р.А., Джемилева Л.У., Юнусбаева М.М., Салимова А.Р., Ишмухаметова С.Р., Джемилев У.М. Новое поколение малотоксичных таргетных противоопухолевых препаратов на основе природных и синтетических 5Z,9Z-диеновых кислот // Научная конференция грантодержателей РНФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века». – Москва. – 2016.
8. Tuktarova R.A., D'yakonov V.A., Ishmukhametova S.R., Dzhemilev U.M. New hybrid molecules based on lithocholic and (5Z,9Z)-tetradeca-5,9-dienedioic acid:

synthesis and antitumor activity // X Международная конференция молодых учёных по химии «Менделеев-2017». – Санкт-Петербург. – 2017.

9. Туктарова Р.А., Дьяконов В.А., Ишмухаметова С.Р., Джемилев У.М. Реакция кросс-цикломагнирования 1,2-диенов в синтезе мурикадиенина // X Всероссийская научная конференция и школа молодых ученых «Химия и технология растительных веществ». – Казань. – 2017.

10. Туктарова Р.А., Дьяконов В.А., Ишмухаметова С.Р., Джемилев У.М. Стереоселективный синтез аналогов природного мурикадиенина с применением реакции кросс-цикломагнирования 1,2-диенов // Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии». – Новосибирск. – 2017.

11. Туктарова Р.А., Дьяконов В.А., Ишмухаметова С.Р., Джемилев У.М. Направленный синтез конъюгатов на основе литохолевой и (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диендикарбоновой кислот // IV Всероссийская молодежная конференция «Достижения молодых ученых: химические науки». – Уфа. – 2018.

12. Туктарова Р.А., Дьяконов В.А., Ишмухаметова С.Р., Джемилев У.М. Синтез гибридных молекул на основе холестерина и nZ,(n+4)Z-ненасыщенных дикарбоновых кислот // II Всероссийская «Байкальская школа-конференция по химии». – Иркутск. – 2018.

13. Туктарова Р.А., Ишмухаметова С.Р., Дьяконов В.А., Джемилев У.М., Направленный синтез гибридных молекул на основе литохолевой кислоты и ацетогенинов // Междисциплинарный симпозиум по медицинской органической, биологической химии и фармацевтике. – МОБИ-ХимФарма. – 2018.