

На правах рукописи



Загитов Вадим Венерович

**СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ
ПРОСТАНОИДОВ J,E-ТИПА ИЗ КЛОПРОСТЕНОЛА**

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Уфа – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук (в лаборатории физико-химических методов анализа Уфимского Института химии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УФИХ УФИЦ РАН))

Научный руководитель:	Мифтахов Мансур Сагарьярович доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории синтеза низкомолекулярных биорегуляторов Уфимского Института химии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
Официальные оппоненты:	Султанова Римма Марсельевна доктор химических наук, профессор, профессор кафедры общей, аналитической и прикладной химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет» Дьяконов Владимир Анатольевич доктор химических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник, руководитель группы «Лаборатория металлоорганического синтеза и катализа №25» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский университет науки и технологии», г. Уфа

Защита диссертации состоится «21» февраля 2024 года в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 24.1.218.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук по адресу 450054, Республика Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, д. 69 (УФИХ УФИЦ РАН, зал заседаний). Тел./факс: (347)2356066. E-mail: dissovetioh@gmail.com

С диссертацией и авторефератом диссертации можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук и на официальном сайте Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук по адресу: http://ufaras.ru/wp-content/uploads/2023/10/2023_6_ZagitovVV_Dissertaciya.pdf

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор химических наук, профессор



Шарипов Г.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Простагландины являются физиологически важными мессенджерами, без которых невозможно нормальное функционирование живого организма. Они содержатся в подавляющем большинстве тканей и клеток животных и человека. Природные простагландины находят применение в терапии язвенных патологий, в офтальмологии, лечении сердечно-сосудистых болезней и в гинекологии. Так, простагландины PGE₂ и PGF_{2α} используются для подготовки к родам и регуляции родовой деятельности у женщин.

Отличительной особенностью простагландинов, называемых также локальными гормонами, является их низкая стабильность из-за быстрого метаболического распада *in vivo*. Целенаправленные изменения в структуре молекулы простагландина, а именно ω-цепи позволяет значительно увеличить общую стабильность молекулы, как следствие - время ее неизменного пребывания в организме, а значит и увеличить интенсивность биологического воздействия. Одним из вариантов модифицирования является введение в ω-цепь ароматических фрагментов, благодаря чему получается стабилизировать гидроксильную группу при C-15 и улучшить показатели связывания с активными центрами рецепторов.

Научно-квалификационная работа выполнена в лаборатории синтеза низкомолекулярных биорегуляторов в соответствии с планом научно-исследовательских работ УФИХ УФИЦ РАН по теме «Дизайн и синтез биоактивных природных и не природных циклопентаноидов, гетероциклов, эптоилонов и аналогов [проект № 122031400261-4]» при финансовой поддержке гранта РБ «Синтез и исследование новых простагландинов антиракового и антиглаукомного действия [проект № 11ГР]» и гранта РФФИ «Аспиранты» «Клопростенол и производные. F/J переход и новые кросс-сопряженные циклопентановые простагландины с ω-(м-хлорфеноксид)-замещением [проект № 20-33-90114]». Физико-химические анализы выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования «Химия» УФИХ УФИЦ РАН и Центра коллективного пользования «Агидель» УФИЦ РАН.

Степень разработанности темы. Вопросы полного синтеза простагландинов активно решались в последние три декады прошлого века. За это время были описаны основные подходы, ставшие классическими для построения целевой молекулы. Новый расцвет синтез простагландинов получил ближе к началу нового столетия, когда была обнаружена цитотоксичность кросс-сопряженных циклопентановых простагландинов (сyPG). Практически все маститые школы полного синтеза отметились в синтезе кросс-сопряженных сyPG.

Подавляющее большинство методов, разработанных ранее, касаются направленного получения целевой молекулы простагландина, исходя из простых исходных составляющих. Можно выделить лишь несколько работ, в которых был осуществлен переход от одного вида простагландинов к другому. Таким образом выходит, что данный аспект химии этих веществ является малоизученным и открывает поле для исследовательской деятельности.

Объектом исследования является молекула синтетического аналога простагландина $\text{PGF}_{2\alpha}$ – клопростенола. Отличительной особенностью его является наличие 16-*м*-хлорфенокси- фрагмента в ω -цепи, что привело к улучшению метаболической стабильности и улучшению лютеолетических свойств молекулы. Клопростенол нашел свое применение в ветеринарии для синхронизации охоты и индукции родов самок сельскохозяйственных животных.

Цель научно-квалификационной работы: изучение трансформации клопростенола в плане поиска новых структур, перспективных для терапии офтальмологических и онкологических заболеваний и применения в гинекологии.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Дифференцирование гидроксильных групп исходной молекулы клопростенола для последующего направленного модифицирования.
2. Введение атома фтора в молекулу клопростенола с целью получения фторзамещенных производных и изучения их свойств.
3. Выявление возможностей селективного окисления C9-OH и C11-OH клопростенола в подходах к соответствующим PGE_2 и кросс-сопряженным суPG.
4. Разработка и подбор условий “сдвига” Δ^{13} -двойной связи и наведения $\Delta^{12,14}$ -кросс-сопряженной системы в соответствующих производных PGJ_2 .

Научная новизна. В ходе исследовательской работы разработаны методы направленного многостадийного перехода от клопростенола к его PGE_2 аналогу (5 стадий); 8 α -F, 8 β -F и 9 β -F аналогам (5 стадий); 11-дезоксид- $\Delta^{8,9}$ аналогу (4 стадии); Δ^{12} - PGJ_2 и $\Delta^{12}(\text{E})$ - PGJ_2 аналогам (9 стадий); 15-дезоксид- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 аналогу (10 стадий).

На пути достижения цели были разработаны новые подходы, позволяющие модифицировать структуру молекулы простагландина. Так, в 9,11-дигидрокси производных клопростенола установлена возможность провести направленную защиту силановой защитной группой гидроксила в 11 положение молекулы не затрагивая гидроксил в 9 положении при комнатной температуре с помощью триэтилсилилморфолина.

Установлено, что окисление гидроксила в 11 положении при одновременном присутствии легкоэлиминирующейся группы в 9 положении приводит к необходимой циклопентеновой системе, благодаря тандему реакций окисления и отщепления. Исследование реакции сдвига Δ^{13} двойной связи с получением кросс-сопряженной системы выявило, что данный процесс может быть осуществлен в условиях катализа переходными металлами, основаниями и кислотами. Наилучшие результаты показало использование систем DABCO-MeOH и *p*TSA-CH₂Cl₂. При том в случае DABCO удалось выделить оба изомера по новообразованной Δ^{12} -двойной связи, а *p*TSA давала исключительно продукт природной конфигурации. Изучение реакции взаимодействия 11,15-дизащищенного производного клопростенола с фторирующим реагентом DAST выявило сложный характер превращения из-за образования как необходимого продукта S_N2 – замещения C9-OH, так и аномальных продуктов. Применение классического метода гидролиза сложноэфирной группы метилового эфира PGE₂ аналога клопростенола было невозможно осуществить из-за высокой вероятности эпимеризации и отщепления C11-OH группы. Поэтому для решения этой задачи был разработан мягкий вариант энзиматического гидролиза с использованием панкреатической свиной липазы.

Теоретическая значимость. Найдены условия селективной защиты и дифференцирования гидроксильных групп в молекуле клопростенола, оптимизированы стадии изомеризации $\Delta^{13,14}$ -двойной связи молекулы с получением Δ^{12} -E и Δ^{12} -Z изомеров клопростенола.

Практическая значимость. Разработаны методы направленного синтетического перехода от простагландинов PGF_{2 α} типа к простагландинам PGE₂, PGJ₂, Δ^{12} -PGJ₂ и 15-дезоксид- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂. Осуществлено получение новых F-замещенных простагландинов с ароматическим фрагментом. В ряду кросс-сопряженных аналогов клопростенола выявлено соединение лидер (15-дезоксид-16-(*m*-хлорфенокси)-17,18,19,20-тетранор- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂) для дальнейшего поиска противораковых структур.

Методология и методы исследования. Стандартные методы многостадийного органического синтеза. Очистку растворителей проводили методами фракционной перегонки, вакуумной перегонки и ректификации. Для очистки полученных веществ применяли методы экстракции, колоночной хроматографии, перекристаллизации и вакуумной перегонки. Интерпретацию полученных результатов проводили с привлечением методов физико-химического анализа, таких как ИК-спектроскопия, ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопия, хроматомасс-спектрометрия, ГЖХ, ВЭЖХ, тонкослойная хроматография и др.

Положения, выносимые на защиту. Синтез новых 9 β -F и эпимерных 9-дезоксиг-8 α,β -F аналогов клопростенола. Проведение направленного синтетического перехода от простагландина F-типа клопростенола к соответствующим E₂, J₂, Δ^{12} -J₂ и 15-дезоксиг- $\Delta^{12,14}$ -J₂ типа простагландинам. Исследование и оптимизация реакций перемещения $\Delta^{13,14}$ -двойной связи и дегидратации гидроксильных групп при C9 и C15 в D- и J- типа предшественниках.

Личный вклад автора состоит в поиске и изучении литературы по теме научного исследования; осуществлении синтетических экспериментов; разработке и оптимизации методик синтеза; подготовке образцов полученных соединений для дальнейших исследований методами физико-химического анализа; интерпретация данных анализов; подготовка результатов экспериментов к публикации в научных журналах; представление работы на научных конференциях. Все данные и результаты, представленные в научно-квалификационной работе, принадлежат автору и получены им лично.

Степень достоверности. Достоверность представленных результатов гарантируется высоким методическим уровнем выполнения работы и базируется на значительном объеме экспериментальных данных, полученных с использованием современного аналитического оборудования, и квалифицированного анализа полученных результатов.

Апробация работы. Данные научной работы представлены на конкурсе на лучшие научно-исследовательские работы Уфимского института химии УФИЦ РАН (Уфа, 2019), на V Всероссийской молодежной конференции «Достижения молодых ученых: химические науки» (Уфа, 2020), VI междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (Нижний Новгород, 2020), молодежном Международном форуме «Ломоносов - 2021» (Москва, 2021), VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (Москва, 2021), 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» (Волгоград, 2021)

Публикации. По материалам научного исследования опубликовано 5 статей, из них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и входящих в международные базы цитирования Web of Science и Scopus, тезисы 4 докладов на Международных и Всероссийских конференциях.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы на тему «Синтезы и биологическая активность некоторых природных и синтетических простагландинов», обсуждения результатов, экспериментальной части,

заклучения, выводов и списка цитируемой литературы (84). Объем работы составляет 142 страницы машинописного текста. Работа содержит 46 схем, 22 рисунка, 9 таблиц и 3 приложения.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю доктору химических наук Мифтахову Мансуру Сагарьяровичу за неоценимую помощь в научных изысканиях, внимание и поддержку; кандидату химических наук Вострикову Николаю Сергеевичу за важные наставления и поддержку в ведении эксперимента и ценный исследовательский опыт; всем сотрудникам лаборатории синтеза низкомолекулярных биорегуляторов УФИХ УФИЦ РАН.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи работы, определена научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

Литературный обзор (глава 1) состоит из 7 разделов, в которых рассмотрены вопросы, касающиеся общей информации о природных простагландинах (биосинтез и биологическая активность), данных о простагландинах с ароматическим фрагментом и кросс-сопряженных циклопентеноновых простагландинах, включая опубликованные на данный момент материалы по теме.

В главе 2 (обсуждение результатов), состоящей из 4 разделов, представлены результаты синтезов, проделанных в плане поиска F-замещенных аналогов клопростенола (3 соединения), трансформации молекулы в PGE типа простагландин (2 соединения) и направленного перехода к суPG аналогам клопростенола (4 соединения). Для всех целевых молекул проведены необходимые биологические испытания, соответствующие предполагаемому профилю биологической активности.

В третьей главе приведены методики блокировки гидроксильных групп с помощью силановых и мезилатных защитных групп, введения атома F в молекулу, снятия защитных групп со спиртовых функций, окисления гидроксильных групп, изомеризации двойной связи. Приведены физико-химические характеристики полученных соединений.

СИНТЕЗ ФТОРИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ КЛОПРОСТЕНОЛА

В решении задачи модифицирования структуры исходной молекулы клопростенола важным моментом стало дифференцирование трех гидроксильных групп стартовой молекулы **1**. Интересным моментом явилось то, что блок **2** в синтетических условиях удалось получить в одну стадию, при контролируемом действии двухкратного избытка защищающего реагента. Уже этот факт говорил нам о разнице в химической активности между 9 и 11 гидроксильными группами. В

развитом подходе к целевым фторсодержащим соединениям 11,15-дизащищенный блок **2** стал базовой молекулой, позволяющей провести направленную атаку фторирующего реагента на гидроксил в 9 положении.

Атом фтора планировали ввести замещением незащищенной гидроксильной группы действием диэтиламиносульфотрифторида (DAST). Как известно, DAST реагирует со вторичными спиртами по схеме S_N2-замещения, однако в ряде случаев наблюдаются и побочные направления, ведущие к продуктам перегруппировки, элиминирования и эпимеризации.

В синтезе **2** вначале 11,15-гидроксильные группы **1** селективно блокировали в виде бис – TBDPS эфира медленным, по мере израсходования хлорсилана (контроль ТСХ), прикапыванием раствора TBDPSCl в CH₂Cl₂ к перемешиваемому раствору **1** и имидазола в CH₂Cl₂.

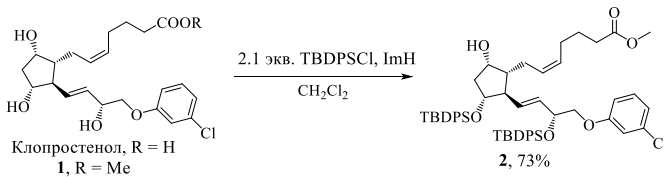


Схема 1. Получение базового блока в синтезе фторированных аналогов клопростенола

Реакцию **2** с двумя эквивалентами DAST в CH₂Cl₂ начинали при –78°C с постепенным (~1 ч) подъемом температуры до комнатной. После израсходования **2** (контроль ТСХ), реакционную массу разбавили равным объемом воды, органический слой отделили и промыли водным NaHCO₃, сушили MgSO₄ и упарили в вакууме.

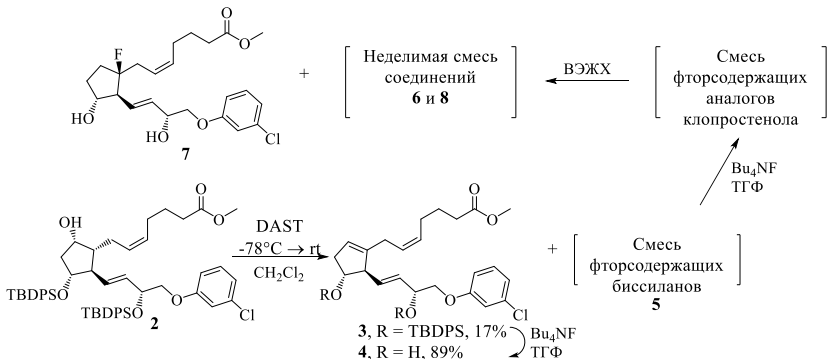


Схема 1. Схема получения 8β-F аналога клопростенола ВЭЖХ разделением смеси фторированных аналогов клопростенола

Хроматографированием остатка на колонке с SiO_2 выделили два соединения, детектируемые по ТСХ как хорошо сформированные одиночные пятна. Более полярному соединению, которое согласно спектральным данным оказалось индивидуальным, была приписана структура $\Delta^{8,9}$ -производного **3**. Последний обработкой Bu_4NF превратили в диол **4**. Аналогичный гидролиз второго пятна **5** Bu_4NF привел к смеси трех диолов (Схема 2). Из них методом полупрепаративной ВЭЖХ удалось выделить индивидуальное минорное соединение **7**, которому по данным ЯМР соответствовала структура 8- β F изомера **7**. Смесь **6+8** разделить не удалось.

Напротив, смесь бис-силанов **5** была успешно разделена на соответствующие **9**, **10** и **11** методом полупрепаративной ВЭЖХ. Последние действием Bu_4NF были превращены в индивидуальные PG **6-8** (Схема 3).

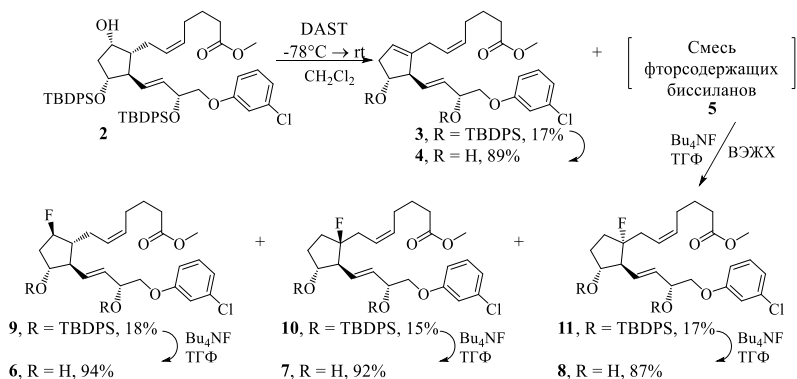


Схема 3. Схема получения индивидуальных фторированных аналогов клопростенола

Таким образом, нами был осуществлен синтез 3 новых фторсодержащих простагландинов и 1 нового $\Delta^{8,9}$ -производного клопростенола.

Как известно, простагландины серии $\text{F}_{2\alpha}$ проявляют антиглаукомные свойства как агонисты рецепторов $\text{PGF}_{2\alpha}$, и при этом антиглаукомные свойства соединений в значительной степени коррелируют с другими видами активности, такими как антиагрегационная и утеротоническая. Поэтому было принято решение в первую очередь оценить именно этот вид биологической активности полученных молекул

Для улучшения растворимости соединений были проделаны небольшие манипуляции со структурой, а именно проведен гидролиз сложноэфирной группы в щелочных условиях (Схема 4).

По данным исследований биологической активности фторпроизводных клопростенола, клопростенол в концентрации 10^{-8} мкг/мл снижал уровень максимальной амплитуды агрегации тромбоцитов, вызванной индуктором агрегации АДФ (2×10^{-5} М/л), на 63,8% ($p < 0,036889$, U-критерий Манна-Уитни) по отношению к контрольной группе. Из испытанных в равных концентрациях новых производных клопростенола наибольшую антитромбоцитарную активность проявляло соединение **4**, снижавшее максимальную амплитуду агрегации тромбоцитов на 27,4% по отношению к контролю. Соединения **10**, **9** и **8** снижали этот показатель на 18,9% (10^{-6} г/мл), 13% (10^{-10} г/мл) и 6,5% (10^{-10} г/мл) соответственно относительно контроля.

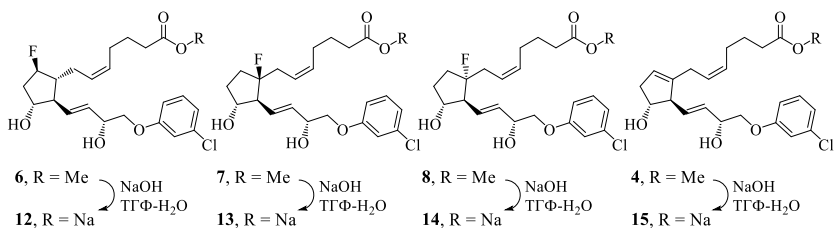


Схема 4. Щелочной гидролиз фторированных аналогов клопростенола

В эксперименте по изучению утеротонической активности два производных клопростенола: **9** (10^{-8} г/мл) и **10** (10^{-6} г/мл) увеличивали величину (AUC), силу и частоту сокращений роговых полосок маточно-беременных крыс по отношению к спонтанным сокращениям.

Что касается клопростенола (концентрация 10^{-8} г/мл), то его особенностью является увеличение таких показателей, как частота сокращений (161,7%) и тонус (40%) относительно исходных сокращений. При этом сила сокращения снижена на 24% и, соответственно, величина сокращений (AUC) составляет 38,4% относительно исходных сокращений.

СИНТЕЗ PGE₂ АНАЛОГА КЛОПРОСТЕНОЛА

Синтез PGE₂ аналога клопростенола **18** проведен по схеме 5. Исходным послужил метиловый эфир клопростенола **1**, который, уже по примененной ранее методике, обработкой 2.1 экв. TBDPSCl-ImH в CH₂Cl₂ трансформировали в 11,15-бис TBDPS производное **2** с выходом 73%. Следующие стадии окисления 11-ОН группы соединения **2** с помощью системы PCC-AcONa с получением кетона **16** и удаления TBDPS-защитных групп с последнего соединения действием n-Bu₄NF протекали

без осложнений и приводили к метиловому эфиру PGE₂ аналога клопростенола **17**.

Для гидролиза сложного эфира **17** было решено применить энзиматический метод, так как наличие оптического центра в α-положении к кетогруппе давало высокую вероятность эпимеризации и отщипления 11-ОН при гидролизе в основных средах. Энзиматический (Lipase PPL, Sigma, ЕС 3.1.13) гидролиз с использованием панкреатической свиной липазы эфира **17** дал целевую кислоту **18** с хорошим выходом.

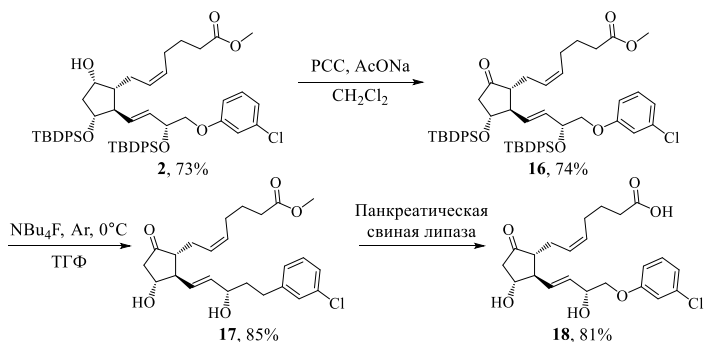


Схема 5. Получение PGE₂ аналога клопростенола

Получение PGE₂ аналога клопростенола **18** важно в поиске соединений мягкого действия для гинекологии с более стабилизированными утеротоническими и лютеолитическими свойствами. С этой целью изучены сравнительные с клопростенолом, его метиловым эфиром **1** и метиловым эфиром полученного PGE₂ аналога **17** утеротонические свойства, в частности влияния **17** и **18** на амплитуду и частоту сокращений отрезка рога матки крысы.

При изучении влияния новых производных клопростенола в диапазоне концентраций от 10⁻¹¹ до 10⁻⁵ г/мл на матки небеременных крыс в условиях *in vitro*, метиловые эфиры **2** и **17** показали активность при меньших концентрациях введения, по сравнению с соответствующими кислотами **1** и **18** (таблица 1).

Таблица 1. Эффективная концентрация [EC₅₀] производных клопростенола в условиях *in vitro*

	12	13	КР	1
EC ₅₀ (г/мл)	5,1×10 ⁻¹⁰	1,0×10 ⁻⁴	1,0×10 ⁻⁹	2,8×10 ⁻¹⁰
[95% Доверительный интервал]	[9,3×10 ⁻¹⁴ to 2,8×10 ⁻⁰⁹]	[7,6×10 ⁻⁶ to 8,9×10 ⁻³]	[2,5×10 ⁻¹¹ to 2,5×10 ⁻⁷]	[4,7×10 ⁻¹² to 5,2×10 ⁻⁶]

Среди изученных соединений, E-типа метиловый эфир **17** в два раза эффективнее, чем клопростенол, соединения **1** и **18** влиял на частоту

сокращений, при этом увеличивая тонус матки и незначительно влияя на амплитуду ее сокращений. Метилловый эфир **1** не увеличивал частоту сокращений, увеличивая амплитуду в 1,8 раз по сравнению со спонтанными сокращениями.

Результаты исследований однозначно свидетельствуют о влиянии структурных изменений в клопростеноле (F/E-переход) на утеротоническую активность.

СИНТЕЗ КРОСС-СОПРЯЖЕННЫХ ЦИКЛОПЕНТЕНОВЫХ АНАЛОГОВ КЛОПРОСТЕНОЛА

В подходах к целевым молекулам кросс-сопряженных циклопентеновых аналогов клопростенола **КР** нами адаптирован биоинспирированный вариант. Как известно, *in vivo* суPG образуются из PGD альбумин катализируемой реакцией сдвига C¹³- двойной связи и затем отщеплением C¹⁵-ОН. В этом плане мы запланировали получение из исходного клопростенола **КР** соответствующего PGD производного **19** с последующим генерированием системы Δ¹²- и Δ^{12,14}- двойных связей.

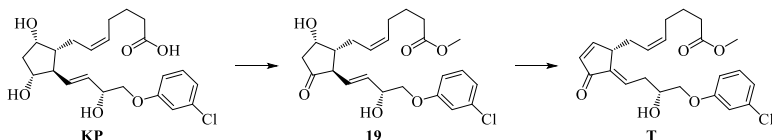


Рисунок 1. Предполагаемый путь осуществления превращения **КР** → **Т**

На первом этапе работы важно было заложить базу для будущих превращений. Так, как уже отмечалось выше, в модифицировании исходной структуры метилового эфира клопростенола **1** важным моментом является работа с тремя гидроксильными группами молекулы. На первый взгляд все три вторичных гидроксила представляются достаточно труднодифференцируемыми по химической активности, однако структурные особенности вносят свой вклад. Так, первоочередно, нами была осуществлена направленная защита спиртовой группы в 15 положении с помощью *tert*-бутилдифенилхлорсилана через промежуточное циклическое фенилборонатное производное **20**, которое позволило одновременно заблокировать два гидроксила в циклопентановом коре молекулы. Таким образом, нам удалось получить важный блок **22** для дальнейших превращений.

Теперь перед нами стояла задача дифференцировать спиртовые функции циклопентанового ядра молекулы. Ранее нами было обнаружено, что непосредственное взаимодействие метилового эфира клопростенола **1** с двумя эквивалентами *tert*-бутилдифенилхлорсилана приводило исключительно к единственному продукту дизамещения **2**. Это

натолкнуло нас на мысль о возможном стерическом контроле, когда гидроксильная группа в 9 положении является пространственно более затрудненной. Так, нами была испытана стандартная методика блокировки диола **22** в системе триметилхлорсилан-имидазол/хлористый метилен. Однако, реакция оказалась не селективной и привела преимущественно к продукту дизамещения **23**, поэтому решено было использовать более объемистые силилирующие агенты.

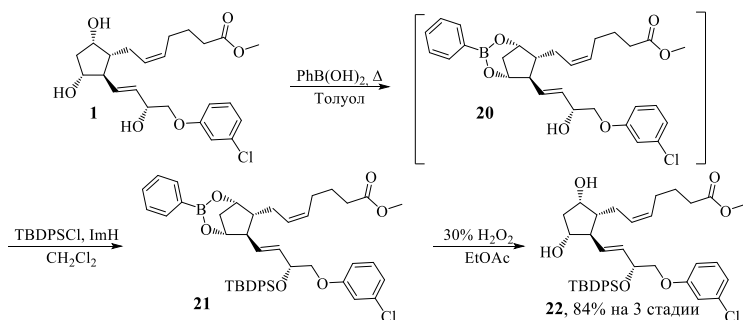


Схема 6. Селективная защита гидроксила в 15 положении

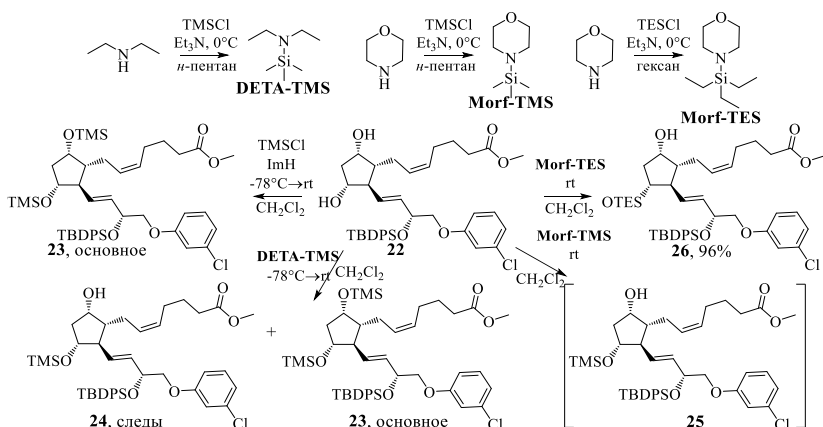


Схема 7. Подбор оптимальных условий для селективной защиты гидроксильной группы в 11 положении

Действительно, в литературе встречались прецеденты, когда осуществляли селективную защиту гидроксила в 11 положении при помощи диэтиламинотриметилсилана. Последний мы синтезировали

взаимодействием триметилхлорсилана с амином в среде триэтиламина. Однако, полученный реагент **DETA-TMS** не позволил осуществить запланированного превращения. Так, взаимодействие начинали при температурах -78°C , однако накопление продукта шло крайне медленно, а при повышении температуры до комнатной произошло образование преимущественно продукта дизамещения **23**, но необходимое 11-TMS производное **24** было также обнаружено. Из-за чего мы решили несколько модифицировать вариант защищающего реагента. Вместо диэтиламина нами был применен морфолин, имеющий циклическую структуру. Морфолилтриметилсилан **Morf-TMS** был нами получен по аналогичному с **DETA-TMS** методу. Использование нового защищающего реагента позволило осуществить селективную защиту необходимого гидроксила при комнатной температуре с получением промежуточного соединения **25** (Схема 7).

Полученный блок **25** был нами вовлечен в последовательность превращений, включающих в себя мезилирование свободного гидроксила в 11 положении, с получением полностью защищенного дифференцированного соединения **27**. Из последнего был получен блок **28** щелочным гидролизом K_2CO_3 в метаноле, который был окислен системой PCC-ацетат натрия в PGJ_2 производное **29**.

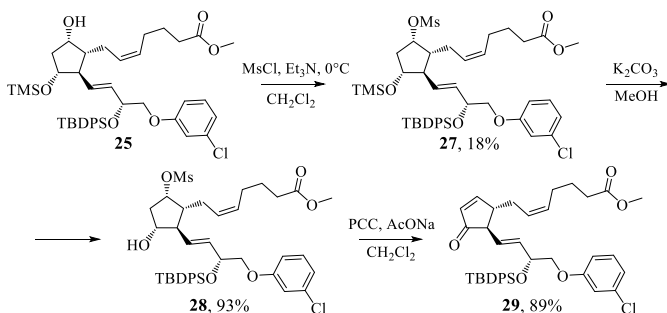


Схема 8. Синтез PGJ_2 аналога клопростенола из TMS производного **25**

Однако, выходы сразу на двух стадиях – мезилирования, с получением полностью защищенного соединения **27**, и окисления, с получением необходимого PGJ_2 производного **29**, – оказались очень низкими. Поэтому было принято решение оптимизировать данную цепочку превращений. Так, нами был синтезирован морфолилтриэтилсилан **Morf-TES** взаимодействие триметилхлорсилана с морфолином в среде триэтиламина. Полученный реагент также при комнатной температуре обеспечивал селективное блокирование гидроксила в 11 положение (Схема 7). Стоит отметить, что полученное

вещество **26** удалось выделить в индивидуальном состоянии. На его основе была повторена схема превращений, ведущая к PGJ₂ аналогу клопростенола **29**, при том на заключительной стадии окисление проводили с применением перйодинана Десс-Мартина (Схема 9). Таким образом, мы добились высоких выходов на стадиях мезилирования и окисления.

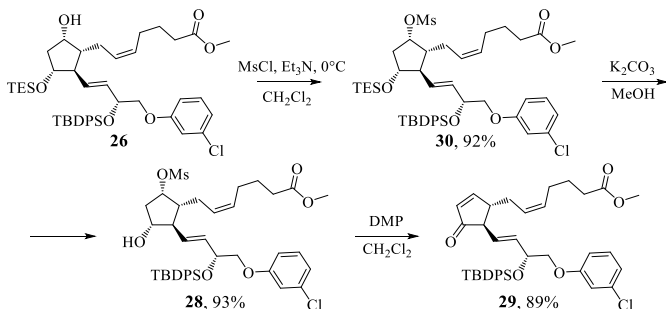


Схема 9. Синтез PGJ₂ аналога клопростенола из TES производного **26**

Далее, располагая граммовыми количествами PGJ₂ производного **29**, мы приступили к изучению реакции Δ^{12} -сдвига $\Delta^{13,14}$ -двойной связи. Как известно, сдвиг β,γ -двойной связи в сопряжение с кетогруппой может быть осуществлен действием солей металлов переходной валентности, основного и кислотного характера катализаторов, при действии света и др. Для изомеризации **29** в Δ^{12} -производное PGJ₂, были опробованы различные реагенты (Рисунок 4) (Таблица 2). В подборе условий вначале кратковременным нагреванием **29** в растворе бензола в присутствии 1 eq. DBU были получены два изомерных соединения **31** и **32**. В отношении структур характерны триплетные сигналы 13-Н, которые более слабопольны в случае **31** из-за сдвигающего эффекта C¹¹-карбонила (13-Н попадает в конус анизотропии карбонила), (**31**: $\delta_{13-H} = 6,63$ м.д.; **32**: $\delta_{13-H} = 6,36$ м.д.).

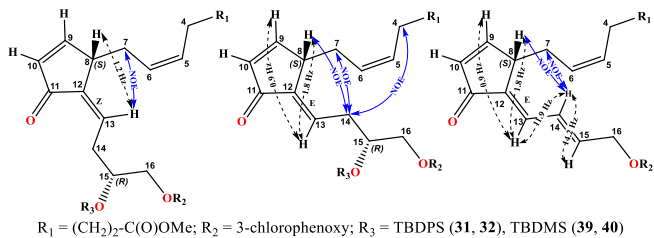


Рисунок 3. Спектральные отнесения продуктов изомеризации двойной связи

Конфигурация двойной связи в положении C12-C13 для выделенных в индивидуальной форме Z/E-изомерных соединений (**31** (E), **32** (Z) и **39** (E), **40** (Z)) по данным NOESY спектров установлены однозначно. Так, для Z-изомеров наблюдались взаимодействия NOESY между протоном двойной связи H-13 и метиленовыми протонами в положении C7 (Рисунок 3).

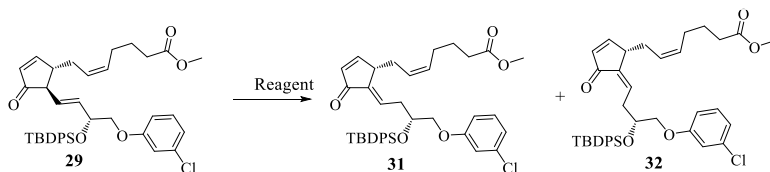


Рисунок 4. Исследование реакции изомеризации

Катализируемая $\text{RhCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ реакция изомеризации **29** в кипящем этиловом спирте в течении 6 часов протекала с образованием значительного количества побочных соединений. При этом выход **31** был лишь на уровне 9%. В аналогичной катализируемой $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ реакции **29** в кипящем бензоле (Таблица 2, №2), также, как и для $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$ (Таблица 2, №3), было выделено лишь неизменное исходное соединение **29**. Далее мы опробовали основной катализ для миграции двойной связи в веществе **29**. Так, было проведено взаимодействие исходного соединения с DBU в бензоле при непродолжительном кипячении (Таблица 2, №4). После обработки и разделения на колоночной хроматографии были выделены E-изомер **31** с выходом 15% и Z-изомер **32** с выходом 6%. Отметим, что при совместном применении DBU и $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$ в кипящем бензоле произошло стремительное потемнение реакционной массы (Таблица 2, №5). При этом выход **31** составил 21% и **32** – 2%. Наилучший результат был получен при проведении реакции **29** с DABCO в метиловом спирте при комнатной температуре, что привело к смеси **31** и **32** с выходами 43% и 37% соответственно. При хранении в среде апротонного растворителя ацетона, Z-изомер **32** переходит в **31** практически полностью. В итоге, переход **29** → **31** (Рисунок 4) нами удалось реализовать с общим выходом 80%.

Таблица 2. Реагенты и условия реакции изомеризации

#	Реагент, eq.	Условия (Solvent, T, t)	Продукты (выход %)
1	$\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2)	EtOH, Δ , 6h	31 (9)
2	$\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (0,3)	C_6H_6 , Δ	нет реакции
3	$\text{Fe}_2(\text{CO})_9$ (1)	C_6H_6 , Δ	нет реакции
4	DBU (1)	C_6H_6 , Δ , 10 h	31 (15)
5	DBU (0,5) + $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$ (0,5)	C_6H_6 , Δ	31 (2), 32 (2)

6	DABCO (1)	<i>i</i> -PrOH, RT, 24h	31 (39), 32 (31)
7	DABCO (1)	MeOH, RT, 6h	31 (43), 32 (37)
8	pTSA	CH ₂ Cl ₂	31 (79)

На завершающем этапе из защищенного Δ^{12} -PGJ₂ аналога клопростенола **31** к целевым структурам труднопроходимой оказалась стадия деблокировки TBDPS-защитной группы при C-15. Апробированные для этой цели системы Bu₄NF – THF, HF*Et₃N, HF вод, HF – MeCN, Amberlyst – MeOH с варьированием температур не приводили к желаемым результатам. Лишь в системе HF – MeCN при кипячении наблюдали образование незначительных количеств целевого Δ^{12} -PGJ₂ аналога.

Поэтому решено было заменить C-15 TBDPS-защитную группу на более легко гидролизуемую TBDMS-защиту. Здесь исходным послужил блок **34**, который был получен аналогично соединению **22** с заменой TBDPSCl на TBDMSCl.

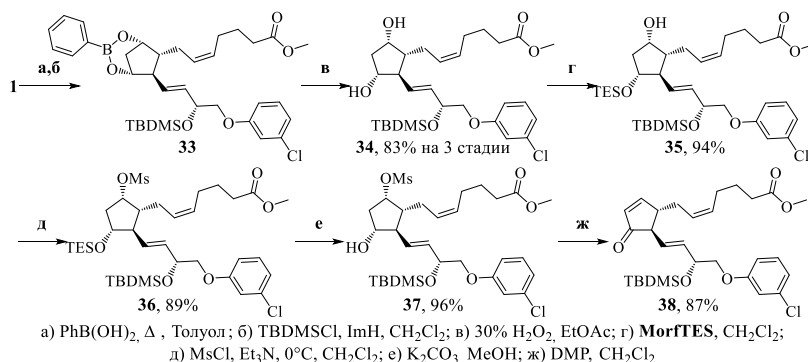


Схема 10. Синтез TBDMS защищенного PGJ₂ аналога клопростенола

При применении отработанной последовательности реакций, исходное соединение **34**, через 11-ТЭС производное **35** было преобразовано в полностью защищенное дифференцированное по гидроксильным группам вещество **36**. Из последнего щелочным гидролизом мы получили свободное по 11 гидроксилу соединение **37**, окисление которого Десс-Мартина периодианом дало нам необходимое соединение **38**.

Изомеризация 15-ТВДМСО Δ^{12} -PGJ₂ производного клопростенола **38** в ранее найденных для **29** оптимальных условиях (DABCO, MeOH, rt) протекала гладко с образованием 12,13 – *Z,E*-изомерных соединений **39** и **40** в соотношении 17 : 20 и общим выходом 74%. В этом случае не было

затруднений со снятием TBDMS-защитной группы и спирты **41** и **42** были получены с хорошими выходами при использовании $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Переход из защищенного Δ^{12} -PGJ₂ производного клопростенола **39** к $\Delta^{12,14}$ -производному PGJ₂ **44** удалось осуществить в системе THF – 3N HCl (3:1). Также соединение **44** образуется в ходе дегидратации Δ^{12} -PGJ₂ производного клопростенола **41** реагентом Бёрджесса.

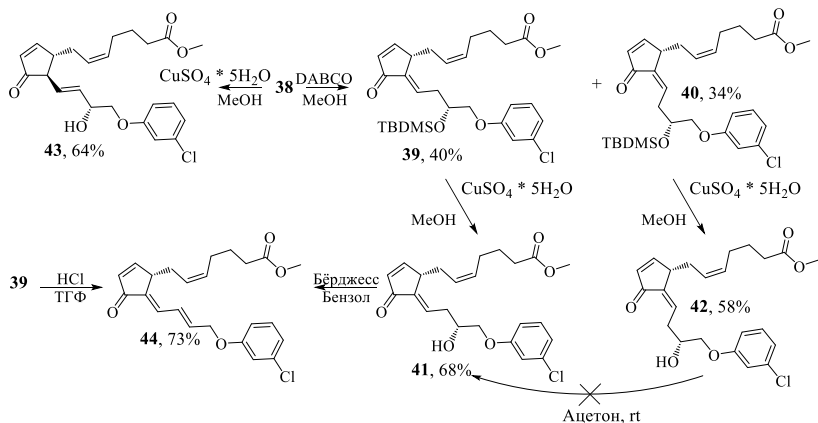


Схема 11. Синтез целевых кросс-сопряженных аналогов клопростенола

Как уже было отмечено 12Z, 15-OTBDPS производное **32** в растворе ацетона гладко переходит в 12E изомер **31**. Однако 12Z, 15-OTBDMS производное **40** в этих же условиях не претерпевало изменений. Благодаря этому нам удалось выделить индивидуальные соединения с неприродной конфигурацией Δ^{12} -двойной связи **40** и **42**.

Таблица 3. Данные цитотоксичности кросс-сопряженных аналогов клопростенола

№	IC50, μM					
	Hek293	SH-SY5Y	HepG2	Jurkat	MCF-7	A549
31	29.61 ± 0.38	21.22 ± 0.28	67.32 ± 2.81	10.65 ± 2.66	63.05 ± 0.35	54.68 ± 2.11
41	7.17 ± 0.12	4.30 ± 0.00	6.60 ± 0.18	1.74 ± 0.25	7.04 ± 0.11	3.32 ± 0.43
42	13.90 ± 0.36	9.29 ± 0.41	19.58 ± 1.42	3.27 ± 1.67	6.20 ± 0.58	20.84 ± 0.85
43	2.78 ± 0.26	4.42 ± 0.11	8.39 ± 0.38	7.13 ± 0.41	6.27 ± 1.15	6.81 ± 1.76
44	1.48 ± 0.16	0.85 ± 0.10	4.41 ± 0.08	0.87 ± 0.21	2.61 ± 0.36	2.41 ± 0.84

Наибольшую активность на исследованных 5 линиях раковых клеток показало соединение **44** – аналог природного 15-дезоксидельта^{12,14}-PGJ₂. Видно, что соединение **43** обладает более высокой токсичностью по отношению к нераковой линии *Hek293*, чем соединение **41** (в 2,6 раз). Соединение **41** проявляет сопоставимую с **43** активность, а в случае линий *Jurkat* и *A549* более активно (в 4,1 и 2 раза соответственно). Конфигурация Δ^{12} -двойной связи однозначно влияет на цитотоксичность, она выше у аналога природной конфигурации **41** в сравнении с *Z*-изомером **42**. Отметим, что соединение **42** в 2 раза менее токсично, чем **41**, по отношению к нераковой линии *Hek293*, а по активности против линии MCF-7 незначительно превосходит соединение **41**. При том цитотоксичность соединения **42** против раковых линий *Jurkat* и MCF-7 выше, чем против нераковой *Hek293*, в 4,25 и 2,25 раз соответственно. Наличие объемистого силанового заместителя при C-15 в **31** приводит к сильному снижению цитотоксичности.

Отметим, в случае природной конфигурации хиральных соединений **41-44** цитотоксичность ожидаемо будет в 2-5 раз выше, чем у приведенных здесь рацематов.

ПРОДУКТ ТСУДЖИ-ТРОСТА

Наличие в структуре клопростенола аллиловой спиртовой функции натолкнуло нас на мысль возможного дифференцирования её от двух вторичных спиртовых функций. В связи с этим мы запланировали изучение реакций аллилового замещения полученного из клопростенола блока **2** п-толуолсульфонат анионом.

Для этого клопростенон выдерживанием в среде Ac₂O – Py превратили в смешанный ангидрид и далее его *in situ* водной обработкой получили триацетоксикислоту **49**. Полученная кислота была вовлечена в реакцию этерификации с PMBOH при активации DCC – DMAP в CH₂Cl₂. При этом наблюдали образование устойчивых комплексов клопростенола с DCC, что привело к значительному снижению выхода целевого соединения **50**.

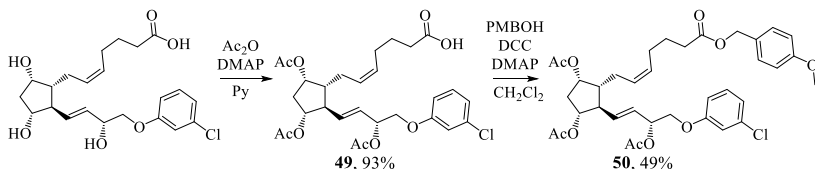


Схема 12. Получение триацетокси производного клопростенола **50**

Для проведения реакции замещения аллилового ацетата на TsO-группу в **50** были выбраны условия межфазного катализа, так как в данном случае возможно применение жесткого неорганического основания,

находящегося в водной фазе. Так, после растворения вещества **50** (50 мг) в хлористом метилене (10 мл), были добавлены $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,1 экв.) толуолсульфокислота (3 экв.), катализатор межфазного переноса $\text{Et}_3\text{BzN}^+\text{Cl}^-$ (0,1 экв.) и добавлен 1М раствор едкого натра (10 мл). В ходе реакции наблюдалось образование менее полярного продукта, накопление которого прекратилось спустя 12 часов реакции (Рисунок 2.16). После выделения и идентификации полученного соединения было установлено, что это продукт элиминирования ацетатной группы в 15 положении, при том вновь образованная двойная связь имела цис- конфигурацию. Однако конверсия составляла лишь 11%, причем выход на прореагировавшее вещество был равен 91% (Таблица 2.5). Наилучшие результаты показала система $\text{Et}_3\text{BzN}^+\text{Br}^-$ - 1М NaOH – TsOH (общий выход 51%), незначительно опередив комбинацию $\text{Et}_3\text{BzN}^+\text{Br}^-$ - 1М NaOH – MsOH (общий выход = 43%).

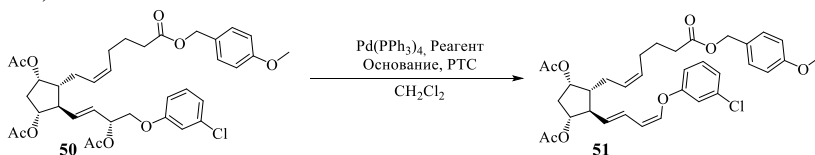


Рисунок 22. Исследованная реакция аллилового отщепления

Таблица 9. Реагенты и условия проведения реакции Тсуджи-Троста

№	Катализатор межфазного переноса (PTC)	Основание	Реагент	Выход	Конверсия
1	$\text{Et}_3\text{BnN}^+\text{Cl}^-$	1М NaOH	TsOH	91%	11%
2	$\text{Et}_3\text{BnN}^+\text{Br}^-$	1М NaOH	TsOH	96%	53%
3	$\text{Et}_4\text{N}^+\text{I}^-$	1М NaOH	TsOH	87%	3%
4	$\text{Et}_3\text{BnN}^+\text{Br}^-$	конц. NaOH	TsOH	следы	100%*
5	$\text{Et}_3\text{BnN}^+\text{Br}^-$	1М NaOH	MsOH	93%	46%

*- происходил гидролиз ацетатных групп

Полной конверсии исходного соединения добиться в данном случае не удалось. Поэтому было решено проверить течение данной реакции в стандартных условиях в среде апротонного полярного растворителя ТГФ. Для этого нами был синтезирован метиловый эфир триацетата клопростенола **52**, который был вовлечен в реакцию с *p*TSA – NaH в ТГФ при катализе $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Эта реакция позволила осуществить превращение с практически количественной конверсией. Полученное соединение **53** также содержало в своей структуре вновь образованную нехарактерную цис- двойную связь.

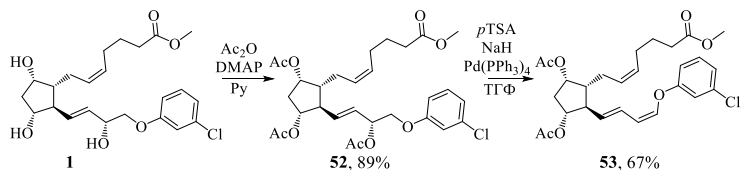


Схема 41. Получение триацетокси производного клопростенола **53**

Последнюю реакцию мы также провели, заменив нуклеофил на PhSH, в результате чего удалось получить продукт замещения ацетатной группы при С-15 на тиофенольную группу.

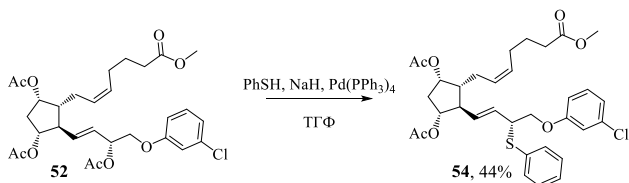
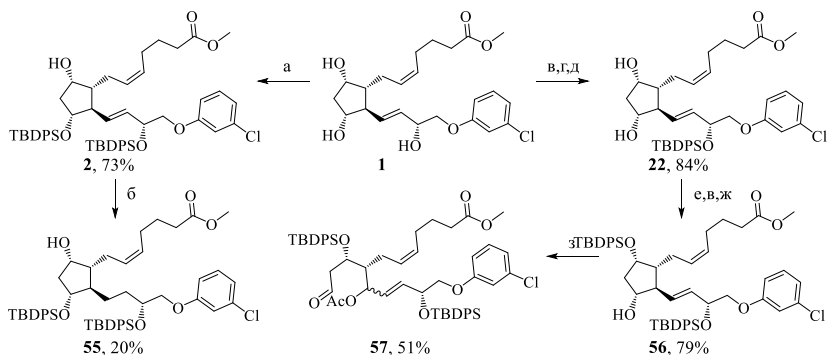


Схема 42. Получение тиофенокси производного клопростенола **54**

НЕКОТОРЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ КЛОПРОСТЕНОЛА

На основе молекулы клопростенола также изучили возможности восстановления двойных связей и разрыва циклопентанового ядра молекулы.



а) 2 экв. TBDPSCl, ImH, CH₂Cl₂; б) NH₂NH₂, H₂O₂, EtOH; в) Ph(OH)₂, Δ, Толуол; г) TBDPSCl, ImH, CH₂Cl₂; д) H₂O₂, ЭА; е) MorFES, CH₂Cl₂; ж) K₂CO₃, MeOH; з) Ph(OAc)₄, Бензол;

Схема 43. Некоторые превращения молекулы клопростенола

Так, полученная ранее молекула **2** была вовлечена в реакцию имидного восстановления под действием системы гидразин гидрат –

перекись водорода. В результате обнаружили, что происходит селективное восстановление *транс*- двойной связи, приводящее к продукту восстановления **55**.

Исходя же из продукта монозащиты **22**, с помощью реакции селективного блокирования гидроксильной группы при C-11 можно получить дисилилированное производное **56**, которое под действием тетраацетата свинца дает диастереомерную смесь соединений с разомкнутым циклопентановым фрагментом **57**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертационной работы на примере аналога природного простагландина PGF_{2α} клопростенола разработаны имеющие общий характер в ряду простагландинов превращения PG F-типа в соответствующие E- и J- PG (F/J,E – переходы). Осуществлены синтезы 9β-фтор аналогов клопростенола, выделены аномальные продукты C8 α,β-фторирования диэтиламинотрифторидом. В 16-(*m*-хлорфенокси)-PGJ₂ исследована реакция сдвига 13,14-двойной связи. Установлено образование нежелательного 12*Z*-изомера вместе с целевым 12*E*-изомером 16-(*m*-хлорфенокси)-Δ¹²-PGJ₂. Проведена оптимизация реакции стереоселективного генерирования системы диеновых связей в переходе от PGJ₂ к 15-дезоксид-Δ^{12,14}-PGJ₂ типа аналогу клопростенола. В подходах к целевым молекулам разработаны методы селективной защиты и дифференцирования гидроксильных групп в 9,11 и 15 положениях клопростенола, выполнен подбор условий мягкого гидролиза сложноэфирной группы в метиловом эфире E-типа аналога клопростенола.

В итоге из клопростенола получено 3 новых фторзамещенных аналога – 8α-, 8β- и 9β-фтор производные, 3 новых кросс-сопряженных циклопентеноновых аналога, метиловый эфир 16-(*m*-хлорфенокси)-PGE₂, который проявил более высокие утеротонические свойства. Таким образом, среди полученных 16-(*m*-хлорфенокси)-PG есть перспективные для применения в терапии глаукомы (F-замещенные PG), использования в гинекологии (PGE) и потенциальные противораковые соединения (15-дезоксид-Δ^{12,14}-PGJ₂).

ВЫВОДЫ

1. На примере известного аналога простагландина PGF_{2α} клопростенола проведены синтетические изыскания по модифицированию (введение атома F) и имеющие общий характер в ряду простагландинов переходы от F-типа PG к J- и E-типа простагландинам.
2. Разработаны практические варианты селективной блокировки гидроксильных групп в базисной тригидроксикислоте – клопростеноле. Контролируемым силилированием метилового эфира клопростенола в системе TBDPSCl/ImH/CH₂Cl₂ получено ключевое в

- синтезе E-типа PG 11,15-бис-ОТВДПС производное метилового эфира клопростенола. Исходя из циклического 9,11-фенилборонатного эфира метилового эфира клопростенола, через стадии 15-ОТВДМС производного, селективного превращения последнего в 11-ОТЭС эфир действием триэтилсиллилморфолина, мезилирования свободной 9-ОН группы и селективного гидролиза 11-ОТЭС защитной группы синтезирован использованный в подходах к PGJ блок – метиловый эфир 11 α -гидрокси-9 α -мезилокси-15 α -трет-бутилдиметилсилокси-16-(м-хлорфенокси)-проста-5Z,13E-простадиеновой кислоты.
3. При изучении реакции 11,15-бис-ОТВДПС производного метилового эфира клопростенола с диэтиламиносульфотрифторидом выделены и охарактеризованы ожидаемый 9 β -F и аномальные стереоизомерные при четвертичном атоме углерода 8 α , β -F простагландины, предложен возможный путь образования последних через $\Delta^{8,9}$ -производное клопростенола.
 4. Метиловый эфир клопростенола в 5 стадий через 11,15-бис-ОТВДПС производное трансформирован в соответствующие E-типа представители, проявившие утеротоническую активность. Результаты исследований однозначно свидетельствуют о влиянии структурных изменений в клопростеноле (окисление гидроксильной группы при C-9 до карбонильной – F/E-переход) на утеротоническую активность.
 5. Изучены условия “сдвига” Δ 13-двойной связи в PGJ₂ типа 15-ОТВДПС производном метилового эфира клопростенола в сопряжение с C11 кетогруппой. Показано, что в системе рТСА/CH₂Cl₂ селективно образуется соответствующее 13E-производное клопростенола, а система DABCO/MeOH приводит к 12,13-E,Z-изомерной смеси.
 6. В синтезе 15-дезоксид- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ производного клопростенола использовали соответствующее J-типа 15-ОТВДМС производное клопростенола, которое после снятия силановой защитной группы и отщепления гидроксильной функции при C15 по Бёрджессу (Burgess) превращали в целевую молекулу.
 7. Исследованиями на цитотоксичность синтезированных кросс-сопряженных циклопентеноновых простагландинов выявлены наиболее активные соединения - Δ^{12} -PGJ₂ и 15-дезоксид- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ типа производные метилового эфира клопростенола.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Востриков, Н.С. Новый 11,13-диеноновый аналог клопростенола / Н.С. Востриков, **В.В. Загитов**, М.С. Мифтахов // Журнал органической химии. – 2019. – Т. 55, №10. – С. 1506-1509.

2. Fluorine containing analogues of cloprostenol / N.S. Vostrikov, **V.V. Zagitov**, S.P. Ivanov [et.al.] // Journal of Fluorine Chemistry. – 2020. – V.235. – P. 109552.
3. Chemical F/J-Interconversion in the Prostaglandin Family: From Cloprostenol to Its Δ^{12} -J₂ and 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -J₂ Derivatives / N.S. Vostrikov, **V.V. Zagitov**, A.N. Lobov [et.al.] // ChemistrySelect. – 2021. – V. 6, N 40. – P.11022-11028.
4. **Загитов, В.В.** Синтез метилового эфира (\pm)-16-(*m*-хлорфенокси)-17,18,19,20-тетранор простагландина E₂ / **В.В. Загитов**, Н.С. Востриков // Башкирский химический журнал. – 2022. – Т. 29, №3. – С. 33-36.
5. Трансформация клопростенола в производные E-типа и сравнительное изучение их утеротонической активности / **В.В. Загитов**, Н.С. Востриков, Т.А. Сапожникова, М.С. Мифтахов // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – Т.57, №1. – С. 19-23.

Материалы конференций:

1. **Загитов В.В.**, Востриков Н.С., Мифтахов М.С. Фторсодержащие аналоги клопростенола // Тезисы докладов V Всероссийской (заочной) молодежной конференции «Достижения молодых ученых: химические науки:» / г. Уфа, 21–22 мая 2020 г. / стр. 76-77.
2. **Загитов В.В.**, Востриков Н.С. Направленный F/J-переход в ряду простагландинов на примере клопростенола // Тезисы докладов VI Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» / г. Нижний Новгород, 27-30 сентября 2020 г. / стр. 31
3. **Загитов В.В.**, Востриков Н.С. Дифференцирование гидроксильных групп для F/E,D – перехода в ряду простагландинов на примере клопростенола // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021» / г. Москва, 12-23 апреля 2021 г. / секция «Химия» стр. 100
4. **Загитов В.В.**, Востриков Н.С. Направленный F/E переход в ряду простагландинов на примере клопростенола // Тезисы докладов VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» / г. Москва, 12-14 сентября 2021 г. / стр. 84
5. Мифтахов М.С., **Загитов В.В.**, Макаев З.Р., Гимазетдинов А.М., Востриков Н.С. Некоторые аспекты химического F/J,D,E-перехода, биоизостеризм и цитотоксичность в ряду кросс-сопряженных циклопентеноновых простагландинов // Тезисы докладов 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» / г. Волгоград, 16-19 мая 2022 г. / стр. 57