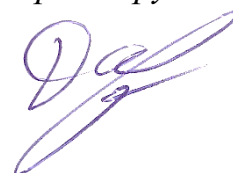


Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)
Институт нефтехимии и катализа – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
(ИНК УФИЦ РАН)

На правах рукописи



Давлетшин Эльдар Валерьевич

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ
«МИТОКАНОВ» НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТОВ ТРИТЕРПЕНОВЫХ КИСЛОТ
С МИТОХОНДРИОТРОПНЫМ СОЕДИНЕНИЕМ F16**

Направление 04.06.01 Химические науки
Органическая химия

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
(АВТОРЕФЕРАТ)**

Уфа-2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук (в лаборатории органического синтеза Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИНК УФИЦ РАН))

Научный руководитель

Спивак Анна Юльевна

кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории органического синтеза Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Рецензенты:

Раскильдина Гульнара Зинуровна

доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией нефтехимических реагентов, масел и материалов для теплоэнергетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет»

Ахметова Внира Рахимовна

доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией гетероатомных соединений Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Защита научно-квалификационной работы (диссертации) состоится «12» сентября 2023 года в 10⁰⁰ часов на заседании аттестационной комиссии в Уфимском институте химии – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современной фармакотерапии онкологических заболеваний используется широкий спектр противоопухолевых препаратов, включая природные соединения растительного происхождения, действие которых направлено на повреждение генома или аппарата деления опухолевых клеток. Однако такие лекарственные средства из-за низкой избирательности антипролиферативного действия дают тяжелые побочные эффекты и приводят к развитию множественной лекарственной устойчивости опухолей к химиотерапии. Таргетные противоопухолевые препараты нового поколения обладают высокой избирательностью действия и низкой системной токсичностью, но они не решают проблему резистентности опухоли к терапии, поскольку раковые клетки обладают высокой мутацией генетического аппарата клетки. Поэтому маловероятно, что опухоли будут эффективно лечиться агентами, нацеленными на один ген или на один путь передачи сигнала.

В связи с этим, в последнее время в области биомедицины и медицинской химии большое внимание уделяется созданию таргетных противоопухолевых лекарственных средств нового поколения, действующих на внутриклеточные органеллы, функционирование которых жизненно необходимо для существования клеток. Среди клеточных органелл наиболее изученными и чрезвычайно важными для функционирования клеток являются митохондрии, они контролируют множественные механизмы, как в здоровых, так и в злокачественных клетках. При разработке митохондриально направленных молекул ориентируются на физико-химические особенности митохондрий. Так, митохондрии, имеют двухслойную мембрану и характеризуются наличием трансмембранного потенциала, который значительно превышает клеточный мембранный потенциал и потенциал других органелл. Что особенно важно, для многих типов раковых клеток митохондриальный трансмембранный потенциал выше, чем трансмембранный потенциал здоровых клеток. Это отличие позволяет надеяться на возможность получения «терапевтического окна». В связи с этим в настоящее время в биомедицине и медицинской химии активно развивается новое направление «Митохондриальная противоопухолевая терапия» и используются новые термины, например, для противоопухолевых лекарств, нацеленных на митохондрии, термин «Митоканы» (акроним слов митохондрия и рак, *mito+cancer*).

Один из подходов, который используется для разработки митоканов, основан на химическом связывании цитотоксических соединений с малыми катионными липофильными молекулами, среди которых наиболее широко изученным является трифенилфосфониевый катион. Известно, что катионные липофильные молекулы способны локализоваться в митохондриях и служить средством селективной доставки биологически активных соединений в раковые клетки. В 2002 году в результате скрининга библиотеки из 16000 соединений была открыта митохондриально направленная полигетероциклическая катионная молекула известная как F16 ((E)-4(1H-индол-3-илвинил)-N-метилпиридиний йодид). Было показано, что эта молекула почти полностью аккумулируется в митохондриальном матриксе и приводит к апоптотической смерти опухолевых клеточных линий разного типа. По своим митохондриотропным свойствам молекула F16 является многообещающим делокализованным липофильным катионом. Катион F16 является не только митохондриально-тропным катионным соединением, но еще и обладает хорошими флуоресцентными свойствами, что позволяет напрямую визуализировать вещества в клетке. Такие митохондриально-направленные молекулы, как F16, которые позволяют

одновременно наблюдать и запускать митохондриальные дисфункции раковых клеток, очень привлекательны для диагностики и лечения рака. Вместе с тем в качестве средства доставки цитотоксических соединений в опухолевые клетки катион F16 исследован всего в нескольких работах.

Степень разработанности темы исследования. В нашей исследовательской группе на протяжении почти 10 лет в качестве молекулярной платформы для разработки новых противоопухолевых агентов митоканов исследуются пентациклические тритерпеновые кислоты лупановой, урсановой и олеановой структуры, которые входят в состав многих лекарственных растений и присутствуют в различных фруктах, ягодах и овощах.

Эти вторичные растительные метаболиты обладают большим разнообразием биологической активности, которая удачно сочетается с низкой системной токсичностью. Наибольший интерес к тритерпеновым кислотам вызван их противоопухолевыми свойствами, показанными *in vitro* и *in vivo* для различных типов опухолевых клеток. Эти фитохимические вещества действуют на митохондрии опухолевых клеток, путем инициирования активных форм кислорода и вызывают гибель раковых клеток по пути митохондриального апоптоза. Однако ограниченное проникновение тритерпеновых кислот через клеточные мембраны, связанное с высокой гидрофобностью, не позволяет им достичь мишени и проявить необходимый терапевтический эффект на животных моделях. Для решения этой проблемы в последние несколько десятилетий проводятся многочисленные исследования по химической модификации тритерпеновых кислот, которые, к сожалению, не всегда могут привести к ожидаемому эффекту. Например, исчезает противоопухолевая активность, характерная для этих вторичных растительных метаболитов, или резко увеличивается их токсичность для нормальных клеток. Недавно нами и другими научными коллективами было показано, что успешно решить проблему биодоступности и усиления противоопухолевого действия тритерпеноидов можно путем трансформации тритерпеновых кислот в катионные производные, содержащие в С-3 и/или С-28 боковых цепях фрагмент делокализованного липофильного трифенилфосфониевого катиона. Конъюгаты лупановых и урсановых тритерпеноидов с катионом трифенилфосфония многократно превосходили *in vitro* по противоопухолевой активности свои прототипы, природные тритерпеновые кислоты. Перспективность этой стратегии была показана также в работах, в которых авторы использовали митохондриальнотропный катион родамина В. Комбинация тритерпеновых кислот с пиперазиновыми производными родамина В дала увеличение цитотоксического действия гибридных молекул вплоть до низких наномолярных концентраций. Полученные конъюгаты показали высокую селективность между опухолевыми и здоровыми клетками. При этом цитотоксические эффекты, лежащие в основе механизмов действия этих гибридных соединений, были связаны с их митохондриально-направленным характером. Указанные выше результаты определили цель и задачи настоящего исследования, которое направлено на поиск новых противоопухолевых лекарственных агентов путем синтеза ранее неизвестных конъюгатов доступных фитохимических веществ тритерпеновой структуры с катионным соединением F16.

Цель исследования. Разработка рациональных методов синтеза и изучение противоопухолевого действия конъюгатов пентациклических тритерпеноидов с катионным липофильным митохондриально-нацеленным соединением F16.

Задачи исследования. В рамках диссертационной работы были определены следующие наиболее важные задачи:

– осуществить синтез конъюгатов тритерпеновых кислот лупанового, урсанового и олеанового ряда с катионным фрагментом F16, связанным различными линкерами в различных положениях молекулы тритерпеноидов;

– на основе доступных тритерпеновых кислот синтезировать полигидроксिलированные тритерпеноиды (полигидроксिलированный аналог бетулиновой кислоты, маслиновую и коросолевою кислоты) и осуществить их конъюгацию с молекулой F16;

– исследовать цитотоксическую активность конъюгатов тритерпеновых кислот с молекулой F16 на опухолевых клеточных линиях разного типа и провести анализ влияния структуры конъюгатов на цитотоксическое действие и селективность в отношении опухолевых и здоровых клеток;

– провести анализ внутриклеточного распределения F16-конъюгатов тритерпеновых кислот в сравнении с их структурными трифенилфосфониевыми аналогами методом конфокальной микроскопии.

Научная новизна. Синтезированы ранее неизвестные конъюгаты природных тритерпеновых кислот, содержащие в своем составе фрагмент липофильного катионного соединения F16, использованного в качестве митохондриально-тропного транспортного средства, усиливающего трансмембранный перенос тритерпеноидов, а также перспективного для использования в качестве флуоресцентного зонда.

Систематически исследовано влияние структуры тритерпенового ядра и типа линкера на цитотоксический потенциал F16-гибридных молекул тритерпеноидов в отношении опухолевых линий лейкозных клеток и карцином. В результате выявлены соединения лидеры, многократно превысившие цитотоксическую активность исходных тритерпеновых кислот и показавшие, наряду с высоким противоопухолевым эффектом, приемлемое терапевтическое окно между опухолевыми лейкозными клетками и здоровыми клетками фибробластами человека.

Разработан новый подход к синтезу BODIPY-меченных проб производных бетулиновой кислоты, несущих в С-28 боковой цепи концевые митохондриально-направленные трифенилфосфониевые группы. Разработанный подход ковалентного связывания флуорофора BODIPY с бетулиновой кислотой, позволяющий сохранить в тритерпеновом ядре нативные 3-ОН и 28-COOH функции, может найти применение в синтезе других флуоресцентных BODIPY-меченных тритерпеноидов.

Методом конфокальной микроскопии, выполненной на эндотелиальных клетках мыши, исследовано внутриклеточное распределение F16-производных тритерпеновых кислот. В результате показана значительная локализация испытуемых гибридных соединений в митохондриях клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы. Впервые изучено влияние введения катионного фрагмента F16 в структуру пентациклических тритерпеновых кислот на проявляемые ими цитотоксические эффекты с целью установления перспектив применения полученных гибридных соединений в качестве потенциальных митохондриально-направленных противоопухолевых лекарственных средств. На нескольких лейкозных опухолевых клеточных линиях и на линиях карцином молочной железы и немелкоклеточного рака легких показано, что конъюгация F16 с тритерпеноидами синергетически усиливает их цитотоксичность, что приводит к значительному снижению активных концентраций, до субмикромольных величин. Среди исследованных конъюгатов выявлены соединения-лидеры, которые наряду с высоким противоопухолевым эффектом

продемонстрировали селективность между опухолевыми лейкозными клетками и здоровыми фибробластами. Прямая визуализация распределения F16 – производных тритерпеноидов во внутриклеточных органеллах, выполненная методом конфокальной микроскопии на эндотелиальных клетках мыши, показала значительную степень локализации гибридных соединений в митохондриях клеток. Полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности развиваемого подхода и возможности использования F16-производных тритерпеновых кислот в качестве новых митохондриально-направленных противоопухолевых агентов. Однако необходима дополнительная модификация структуры этих гибридных молекул для придания им селективных свойств и снижения цитотоксичности в отношении здоровых клеток.

Методология и методы исследования. В работе использовались современные методы органической химии, включая широко востребованные в органическом синтезе реакции с применением металлокомплексного катализа. Выделение и очистка продуктов проводились методами колоночной хроматографии и перекристаллизации. Для установления структуры синтезированных соединений использовались современные инструментальные методы исследования: одномерная (^1H и ^{13}C), гомо- (COSY, NOESY) и гетероядерная (HSQC, HMBC) спектроскопия ЯМР, масс-спектрометрия (Maldi TOF/TOF). Исследования цитотоксической активности конъюгатов выполнялись стандартным МТТ-тестом и методом проточной цитофлуориметрии. Исследования митохондриальной локализации выполнялись с использованием конфокальной микроскопии. Биологические испытания проводились в Институте теоретической и экспериментальной биофизики, г. Пущино и на кафедре биохимии, клеточной биологии и микробиологии Марийского государственного университета.

Положения, выносимые на защиту.

1. Методы синтеза новых конъюгатов тритерпеноидов лупанового, олеанового и урсанового ряда с катионным фрагментом F16 и исследование их цитотоксической активности.
2. Синтез полигидроксилированных аналогов бетулиновой, урсоловой и олеаноловой кислот, их трансформация в F16-производные и цитотоксическая активность.
3. Анализ влияния структуры конъюгатов на цитотоксическое действие и селективность в отношении опухолевых и здоровых клеток.
4. Новый подход к синтезу BODIPY-меченных проб производных бетулиновой кислоты, несущих в C-28 боковой цепи концевые трифенилфосфониевые группы.
5. Внутриклеточное распределение F16-конъюгатов тритерпеновых кислот в сравнении с их структурными трифенилфосфониевыми аналогами методом конфокальной микроскопии.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов проведенных исследований основана на значительном объеме экспериментальных данных, полученных с применением современных физико-химических методов установления структур органических соединений. Строение всех впервые полученных соединений доказано методами ^1H , ^{13}C ЯМР, ИК спектроскопии, в том числе с привлечением двумерных гомо- и гетероядерных экспериментов (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBS) и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Апробация результатов. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на V и VII Всероссийских молодежных конференциях «Достижения молодых учёных: химические науки» (г. Уфа, 2020; г. Уфа, 2022); IV и VI Всероссийских молодежных

конференциях «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений» (г. Уфа, 2020; г. Уфа, 2022); Первой всероссийской школе для молодых ученых по медицинской химии «MEDCHEM SCHOOL 2021» (г. Новосибирск, 2021); 24-ой и 25-ой Международных электронных конференциях по синтетической органической химии (2020; 2021); 1-ой Междисциплинарной всероссийской молодежной научной школе-конференции с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (г. Казань, 2023).

Личный вклад автора. Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем. Личный вклад автора состоит в поиске, анализе и обобщении научной литературы по теме диссертации. Лично автором осуществлены все химические эксперименты, выделение, очистка и подготовка соединений к физико-химическим методам анализа и интерпретация полученных результатов. Подготовка материалов к публикации в научных журналах, апробация полученных результатов на конференциях.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 17 научных трудов, из них 9 статей в журналах, включенных в список ВАК и индексируемых в системах Scopus и Web of Science, а также тезисы 8 докладов на российских и международных конференциях. Получен 1 патент РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, трех глав обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Объем диссертации составляет 148 страниц, включая 28 рисунков, 18 схем, 3 таблицы и 208 ссылок на литературу.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность д.б.н., профессору Белослудцеву К.Н. и к.б.н., доц. Дубинину М.В. (*Марийский государственный университет, г. Йошкар-Ола, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пуццоно*) за проведение биологических исследований полученных соединений на всех этапах выполнения этой работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность, поставлена цель и определены задачи исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Первая глава (литературный обзор) содержит анализ современного состояния исследований синтеза и избирательного воздействия на митохондрии раковых клеток конъюгатов биологически активных веществ с липофильными митохондриально-направленными катионными соединениями. **Вторая глава** (обсуждение результатов) состоит из трех разделов, в которых обсуждаются результаты синтеза новых конъюгатов лупановых, олеановых и урсановых структур с катионным фрагментом F16 и исследование их цитотоксической активности, синтеза полигидроксильированных тритерпеноидов, их конъюгации с молекулой F16 и исследование их цитотоксической активности, исследование внутриклеточного распределения F16-конъюгатов с аналогичными по структуре трифенилфосфониевыми конъюгатами. **Третья глава** (экспериментальная часть) содержит перечень приборов и используемых в работе реактивов, методики синтеза и результаты физико-химического анализа полученных соединений.

1. Синтез и исследование цитотоксической активности новых конъюгатов лупановой, олеановой и урсановой структур с катионным фрагментом F16

В последние годы доступные природные пентациклические тритерпеноиды, такие как бетулин, бетулиновая, урсоловая, олеаноловая и глицирретовая кислоты, рассматриваются как многообещающая основа для разработки новых противоопухолевых агентов, нацеленных на митохондрии. Однако из-за низкой биодоступности тритерпенов, обусловленной их плохой растворимостью в воде, они не могут достигать мишени *in vivo* и оказывать желаемое терапевтическое действие (Рисунок 1).

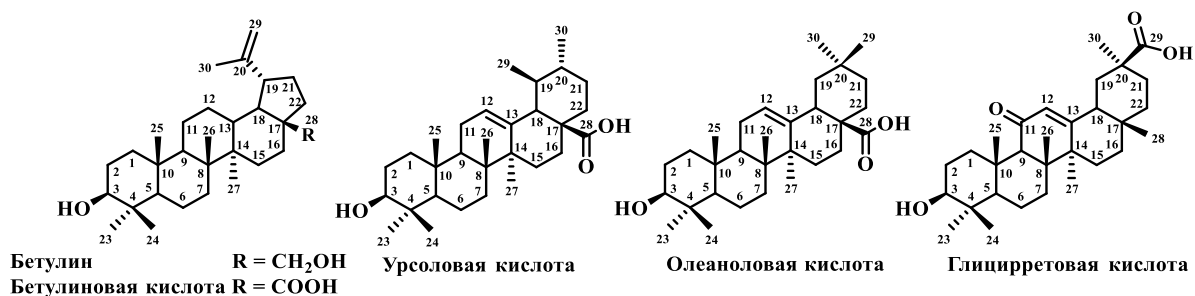


Рисунок 1. Структуры природных пентациклических тритерпеновых кислот.

Из литературы известно, что функциональные группы при С-3 и С-28 позиции тритерпенового ядра оказывают значительное влияние на биологическую активность пентациклических тритерпеновых кислот. Поэтому для повышения биодоступности и цитотоксической активности активно исследуются различные модификации тритерпенового скелета. Так, производные бетулина, бетулиновой и урсоловой кислот, ковалентно связанные с трифенилфосфониевым фрагментом, более чем в 50 раз превзошли свои прототипы по противоопухолевой активности. Превосходная цитотоксическая активность была также обнаружена для катионных производных пентациклических тритерпеноидов, содержащих катионный остаток родамина В.

Продолжая поиск новых мало токсичных митохондриально-направленных противоопухолевых агентов на основе тритерпеновых кислот, мы обратились к дизайну и синтезу конъюгатов пентациклических тритерпеноидов, в котором использовали относительно недавно открытое катионное соединение F16 [E-4-(1H-индол-3-илвинил)-N-метилпиридиния йодид], токсичное для митохондрий и способное избирательно накапливаться в митохондриальном матриксе различных опухолевых клеток. Соединение F16 синтезируют конденсацией грамина с пиридинкарбоксальдегидом в присутствии третбутилфосфина. Далее, используя метилиодид, получают делокализованный липофильный катион F16 (Схема 1).

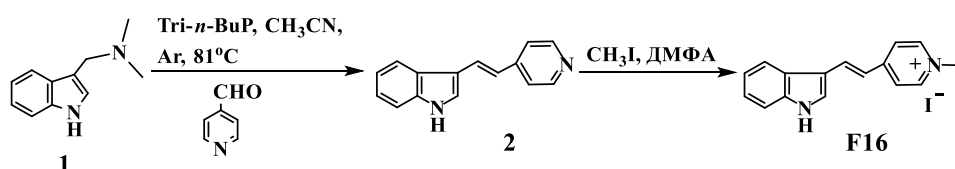


Схема 1. Синтез катионного соединения F16 [E-4-(1H-индол-3-илвинил)-N-метилпиридиния йодида].

Нами была реализована схема синтеза конъюгатов бетулина и бетулиновой кислоты в которой катион F16 связан с молекулой терпеноидов по С-30 положению. Для этого предварительно полученные, с использованием NBS в четыреххлористом углеводе, бромиды **3** и **5** были введены в реакцию с пиридин(винил)индольным предшественником F16 в ДМФА при 85°C (**4**, **6**) (схема 2).

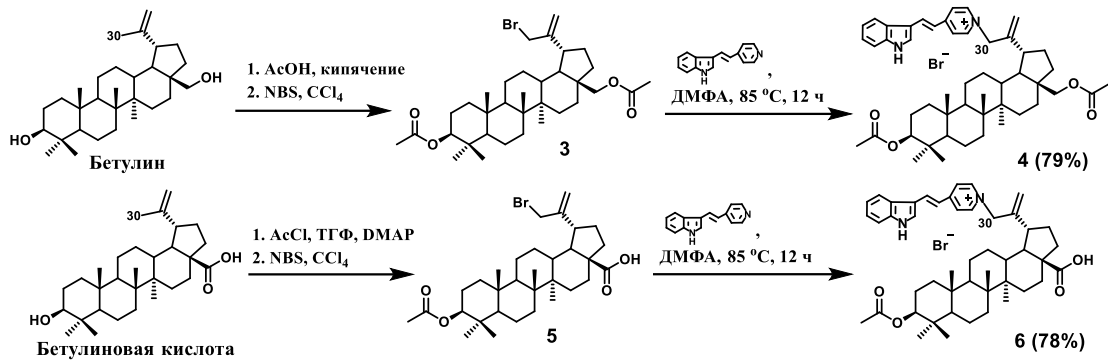


Схема 2. Синтез конъюгатов бетулина и бетулиновой кислоты с молекулой F16 по С-30 позиции.

В следующей серии конъюгатов катионный фрагмент F16 был связан с молекулой тритерпеноидов лупанового ряда при 3-ОН и 28-СООН функциях сравнительно легко гидролизуемой сложноэфирной связью. Карбодимидным методом с использованием 5-бромвалериановой кислоты в присутствии N,N' -дициклогексилкарбодимид (DCC) и DMAP были получены моно- и дибромиды бетулина (7, 9). Взаимодействием бетулиновой кислоты с четырёхкратным мольным избытком 1,4-дибромбутана или 1,4-дибромтриэтиленгликоля в ДМФА были синтезированы соответствующие бромиды с углеводородным и триэтиленгликолевый линкерами (11, 15). Ацилированием бетулиновой кислоты по С-3 положению бромуксусной кислотой в ТГФ в присутствии пиридина и DMAP, с последующей реакцией полученного бромида с четырёхкратным мольным избытком 1,4-дибромбутана был получен дибромид бетулиновой кислоты 17. Полученные бромиды были вовлечены во взаимодействие с нейтральным предшественником F16 с получением соответствующих моно- и диконъюгатов 8, 10, 13, 14, 16, 18 с высоким выходом (Схема 3).

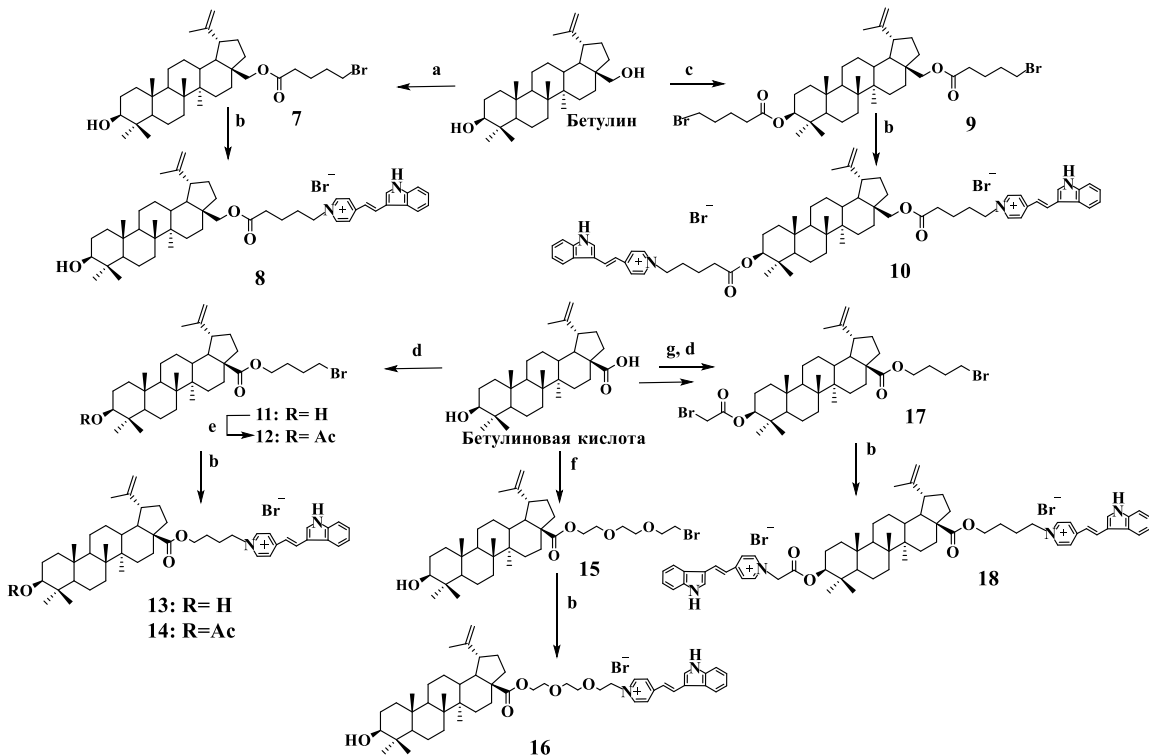


Схема 3. Синтез моно- и диконъюгатов бетулина и бетулиновой кислоты с молекулой F16 по С-3 и/или С-28 позиции. (а) 5-бромвалериановая кислота (1 экв.), DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , 20°C, Ar; (б) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, 85°C, Ar, 12 ч.; (в) 5-бромвалериановая кислота (2 экв.), DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , 20°C, Ar; (д) 1,4-дибромбутан, K_2CO_3 , ДМФА, CH_3CN , 50°C, Ar; (е) AcCl, ТГФ, пиридин, DMAP, 20°C, Ar; (ф) дибромид триэтиленгликоля, K_2CO_3 , ДМФА, 50°C, Ar; (г) бромуксусная кислота, ТГФ, пиридин, DMAP, 20°C, Ar.

С целью расширения ряда F16-производных тритерпеноидов и дальнейшего исследования влияния молекулярной структуры тритерпенового ядра на цитотоксическую активность гибридных молекул, нами осуществлен синтез конъюгатов урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот с катионным соединением F16 **21**, **22**, **25**, **26**, **29** и **30**. Гибридные соединения синтезировали из предварительно полученных бромидов **19**, **20**, **23**, **24**, **27** и **28** в условиях, приведенных на схеме (Схема 4).

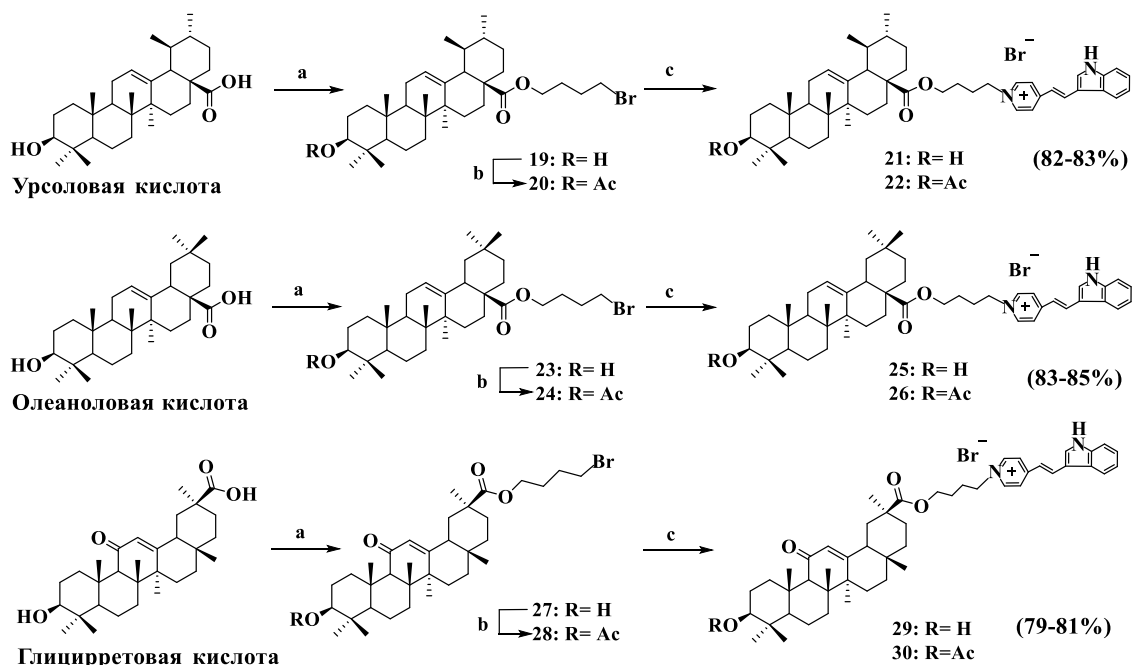


Схема 4. Синтез конъюгатов урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот с молекулой F16.
(a) 1,4-дибромбутан, K_2CO_3 , ДМФА, CH_3CN , $50^\circ C$, Ar; **(b)** $AcCl$, ТГФ, пиридин, DMAP, $20^\circ C$, Ar; **(c)** (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, $85^\circ C$, Ar, 12 ч.

Другой подход к синтезу аддуктов “тритерпеноид – F16” заключался в связывании атома азота индольного кольца F16 через фенилэтинильный мостик с кольцом А тритерпеновой кислоты при С-2 позиции тритерпеноида. Разработка методики синтеза такого типа конъюгатов проведена на примере бетулиновой кислоты. Исходным терпеноидом послужил С-2 пропирил замещенный метилбетулонат **32**, полученный по ранее разработанному нами методу из метилового эфира бетулоновой кислоты **31**. Для реализации синтеза пиридин-винил индольное производное **2** было первоначально вовлечено в CuI -катализируемую реакцию сочетания по Ульману-Голдбергу с 1-бром-4-йодбензолом. Полученный прекурсор с бромфенильным заместителем в индольном фрагменте **33** был использован в реакции кросс-сочетания по Соногашира с пропаргильным производным **32**. Однако в этом случае реакция протекала только по пути ацетиленовой гомодимеризации тритерпеноида **32** с образованием в качестве единственного продукта димера тритерпеноида **34**. В связи с чем было синтезировано йодфенильное производное **35** с использованием которого мы получили нужный продукт кросс-сочетания. Далее кватернизацией пиридинового кольца под действием CH_3I был получен конъюгат **36**, в котором терпеновое ядро по С-2 положению связано с катионным соединением F16 фенилэтинильным мостиком (Схема 5).

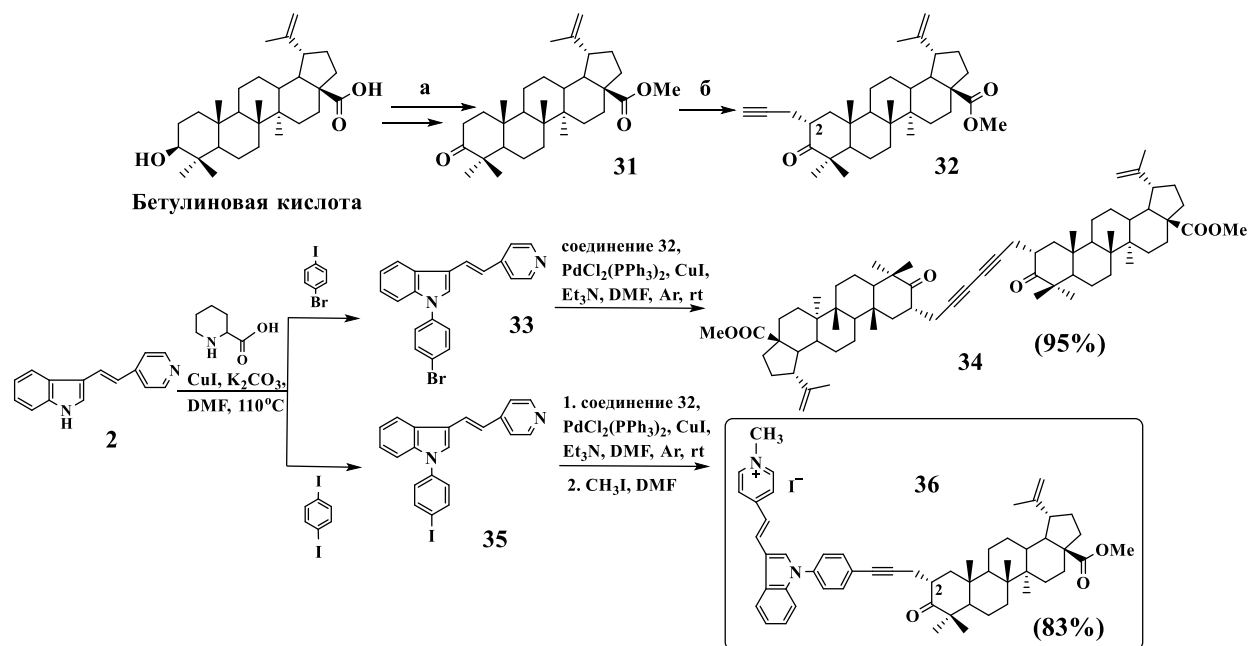


Схема 5. Синтез конъюгата метилового эфира бетулоновой кислоты и молекулы F16, связанных по С-2 положению через фенилэтинильный мостик. (а) 1. CrO_3 , H_2SO_4 , ацетон, 2 ч.; 2. CH_2N_2 , Et_2O , 0°C ; (б) $\text{KN}(\text{SiMe}_3)_2$, Et_3B , $\text{C}_3\text{H}_5\text{Br}$, 1,2-диметоксиэтан, Ar, 2 ч.

Таким образом, нами был синтезирован ряд принципиально новых конъюгатов тритерпеноидов лупанового, урсанового и олеанового ряда в которых липофильный делокализованный катион F16 связан с молекулой терпеноида в различных положениях через углеродную или сложноэфирную типы связей (Рисунок 2).

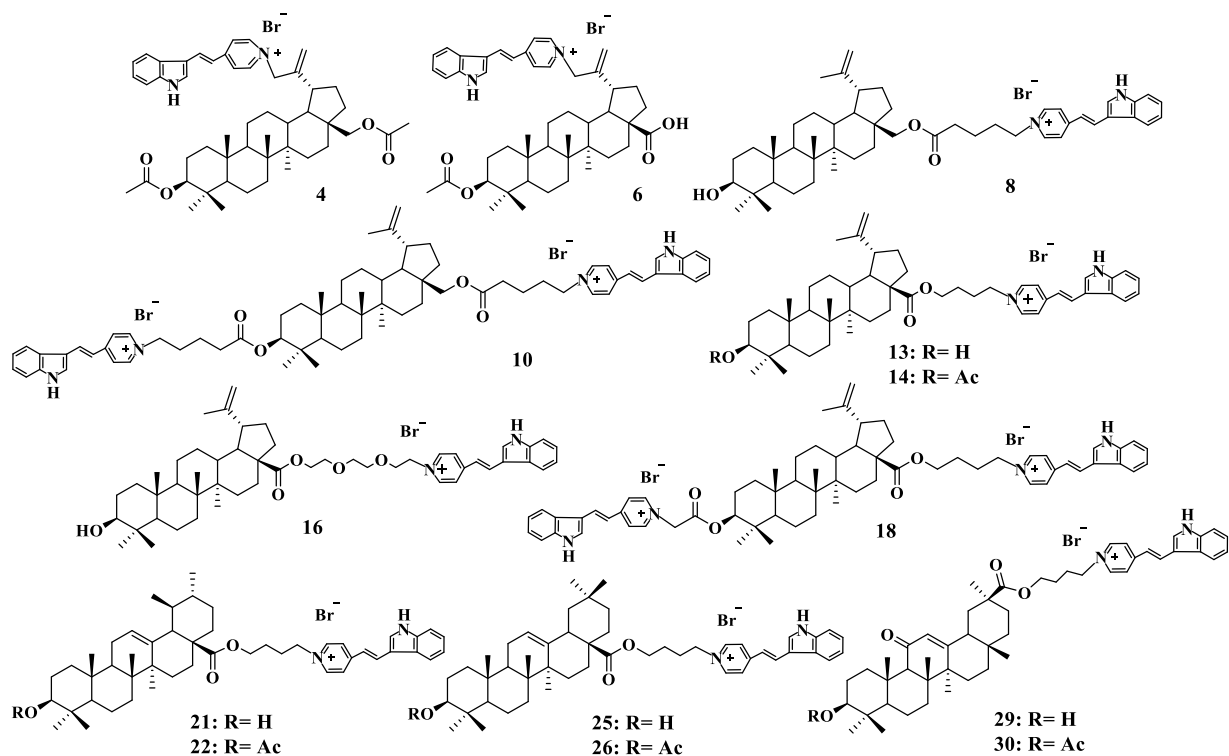


Рисунок 2. Библиотека полученных конъюгатов

Полученные конъюгаты тритерпеновых кислот с F16, были протестированы *in vitro* на трёх линиях лейкозных опухолевых клеток и на клетках незлокачественных фибробластов

человека. Большинство конъюгатов показали высокую цитотоксическую активность против всех протестированных линий раковых клеток и превзошли бетулиновую кислоту в 100-200 раз (таблица 1).

Таблица 1.

Цитотоксическое действие веществ (IC_{50} , μM^a) на опухолевые клеточные линии U937, Jurkat, K562 и фибробласты ($X \pm SE$)^b.

Соединение	U937	Jurkat	K562	Фибробласты
<i>Конъюгаты с бетулином</i>				
4	3.040±0.094 ^b	3.260±0.091 ^b	3.190±0.089 ^b	11.400±1.030 ^b
8	0.906±0.037 ^b	0.937±0.032 ^b	0.904±0.033 ^b	8.200±0.630 ^b
10	2.060±0.079 ^b	1.680±0.054 ^b	1.620±0.051 ^b	10.800±0.980 ^b
<i>Конъюгаты с бетулиновой кислотой</i>				
6	>125 ^b	>125 ^b	>125 ^b	>125 ^b
13	0.616±0.028 ^b	0.844±0.034 ^b	0.812±0.032 ^b	6.100±0.220 ^b
14	2.167±0.073 ^b	0.584±0.027 ^b	0.559±0.025 ^b	4.360±0.990 ^b
16	0.573±0.024 ^b	1.260±0.042 ^b	1.210±0.041 ^b	5.500±0.340 ^b
18	4.190±0.117 ^b	4.360±0.122 ^b	4.010±0.109 ^b	10.400±1.230 ^b
<i>Конъюгаты с урсоловой кислотой</i>				
21	2.461±0.085 ^b	0.623±0.031 ^b	0.588±0.032 ^b	6.230±0.850 ^b
22	2.228±0.076 ^b	0.561±0.029 ^b	0.554±0.028 ^b	5.180±0.450 ^b
<i>Конъюгаты с олеаноловой кислотой</i>				
25	0.607±0.027 ^b	0.687±0.034 ^b	0.671±0.035 ^b	3.490±0.560 ^b
26	2.234±0.081 ^b	0.578±0.027 ^b	0.516±0.029 ^b	4.280±0.840 ^b
<i>Конъюгаты с глицирретовой кислотой</i>				
29	2.425±0.083 ^b	0.559±0.024 ^b	0.511±0.022 ^b	8.300±1.190 ^b
30	2.304±0.078 ^b	0.568±0.026 ^b	0.534±0.026 ^b	7.010±0.320 ^b
F16	>500 ^b	>500 ^b	>500 ^b	>500 ^b
БК	149.290±4.170 ^b	81.680±1.820 ^b	78.540±1.760 ^b	236.400±3.600 ^b
F16:БК/1:1	122.170±3.460 ^b	91.580±1.950 ^b	89.150±1.890 ^b	280.100±3.440 ^b

^a IC_{50} (μM) - концентрация, вызывающая полумаксимальную ингибицию жизнеспособных клеток.

^b X -среднее значение экспериментальных данных, SE-стандартная ошибка. Каждый IC_{50} ($X \pm SE$) был получен из трех экспериментов в двух экземплярах.

Анализ влияния структуры на цитотоксическую активность показал, что F16-конъюгаты с лупановыми тритерпеноидами (**8**, **13**, **16**) проявили наиболее высокую цитотоксичность в отношении раковых клеток с хорошим индексом селективности между опухолевыми и здоровыми клетками. Введение второго фрагмента в молекулу тритерпеноида (**10**, **18**), а также конъюгация бетулиновой кислоты с F16 в положении С-30 незначительно повышала противоопухолевое действие (**4**, **6**). Само соединение F16 не проявило цитотоксического действия в исследуемых концентрациях, а механическая смесь бетулиновой кислоты и F16 (1:1 весовые соотношения) не показала синергетического

эффекта. Структура линкера незначительно влияла на цитотоксическую активность и селективность.

В продолжение работы проведено сравнительное исследование цитотоксичности соединения **16**, одного из наиболее активных гибридов бетулиновой кислоты и F16, в отношении аденокарциномы молочной железы MCF-7 и здоровых клеток фибробластов HF. Как уже наблюдалось нами ранее на лейкозных клетках, цитотоксический эффект конъюгата **16** на карциномном раке также превысил цитотоксический эффект бетулиновой кислоты в 50 раз. Все это свидетельствовало о том, что проникающий катион F16 значительно усиливает цитотоксическое действие бетулиновой кислоты. Для сравнения, известный препарат доксорубицин оказывал сравнимое с конъюгатом цитотоксическое действие на обе клеточные линии (**16**, $IC_{50} = 2.1 \mu M$; доксорубицин, $IC_{50} = 0.6 \mu M$).

Чтобы определить причину явно выраженной цитотоксичности мы исследовали влияние соединения **16** на пролиферацию раковых клеток MCF-7 и здоровых клеток фибробластов. Из диаграмм видно, что инкубация клеток фибробластов и MCF-7 с конъюгатом **16** (BA-F16) приводит к аресту клеточного цикла в фазе G0/G1 (Рисунок 3).

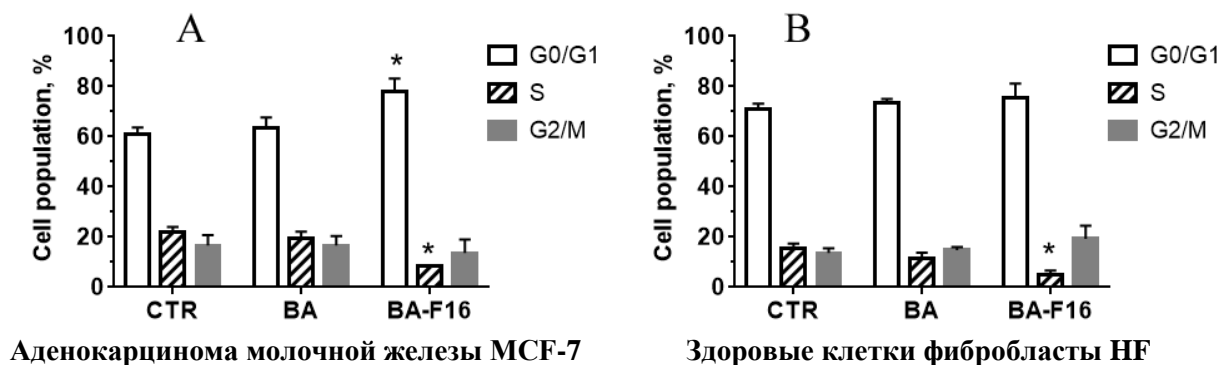


Рисунок 3. Анализ клеточного цикла MCF-7 (A) и HF (B) после 24-часовой инкубации с бетулиновой кислотой (BA) (5 μM) и BA-F16 (1 μM). Данные представляют собой среднее стандартное отклонение трех независимых экспериментов. (* указывает на $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

Эти результаты показывают, что конъюгат BA-F16 является цитостатиком и ингибирует пролиферацию клеток. Однако, к сожалению, исследуемый конъюгат не обладал значительной селективностью, по крайней мере, по отношению к раковым клеткам MCF-7 в сравнении с фибробластами. Поэтому было необходимо проведение дальнейших исследований по модификации структуры конъюгатов для придания им селективных свойств и снижения цитотоксичности для здоровых клеток.

2. Синтез и исследование цитотоксической активности конъюгатов полигидроксилированных тритерпеноидов с катионным фрагментом F16

Очевидно, что цитотоксичность и селективность действия разрабатываемых катионных производных тритерпеновых кислот может в значительной степени зависеть от молекулярной структуры тритерпенового каркаса, линкера и типа катионного фрагмента. Имеющиеся на сегодняшний день сведения о противоопухолевых эффектах природных оксигенированных тритерпеноидов, включая маслиновую, коросолевою и азиатиковую кислоты, свидетельствуют о том, что конфигурация и количество гидроксильных групп в кольце A тритерпенового ядра может оказать влияние на биологическую активность производных полигидроксилированных тритерпеноидов, по сравнению с их неоксигенированными аналогами (Рисунок 4).



Рисунок 4. Природные полигидроксилированные тритерпеновые кислоты

Молекулярная структура олеаноловой и маслиновой кислот или урсоловой и коросолевой кислот отличается наличием дополнительной гидроксильной группы в положении 2- α в маслиновой и коросолевой кислотах. В связи с этим, мы синтезировали новые F16-конъюгаты с маслиновой и коросолевой кислотами и исследовали их цитотоксическое действие в сравнении с цитотоксическим эффектом F16-производных урсоловой и олеаноловой кислот. Выделение маслиновой и коросолевой кислот из растительного сырья представляет собой сложную и дорогостоящую процедуру. Так маслиновую кислоту можно выделить из жмыха оливок, но при этом из 10 кг оливок получают всего 10 г маслиновой кислоты. На сегодняшний день в литературе разработаны две альтернативные полусинтетические схемы получения маслиновой и коросолевой кислот, принципиальное отличие которых заключается в первоначальной ключевой стадии синтеза. По первому методу проводится окисление метиленовых протонов при С-2 атоме кольца А бензильного эфира урсоловой или олеаноловой кислот под действием м-хлорнадбензойной кислоты в присутствии каталитических количеств серной кислоты. Второй метод основан на реакции бромирования С-Н связи при С-2 углеродном атоме с применением пиридиний трибромида или, как мы выяснили, можно использовать дибромид кислоты Мельдрума, с последующим нуклеофильным замещением атома брома на гидроксильную группу. Мы провели синтез маслиновой и коросолевой кислот по первой и по второй схеме и в результате пришли к выводу, что первый вариант синтеза более эффективен, потому что на стадии нуклеофильного замещения атома брома на гидроксильную группу реакция сопровождается образованием большого количества побочных продуктов (Схема 6).

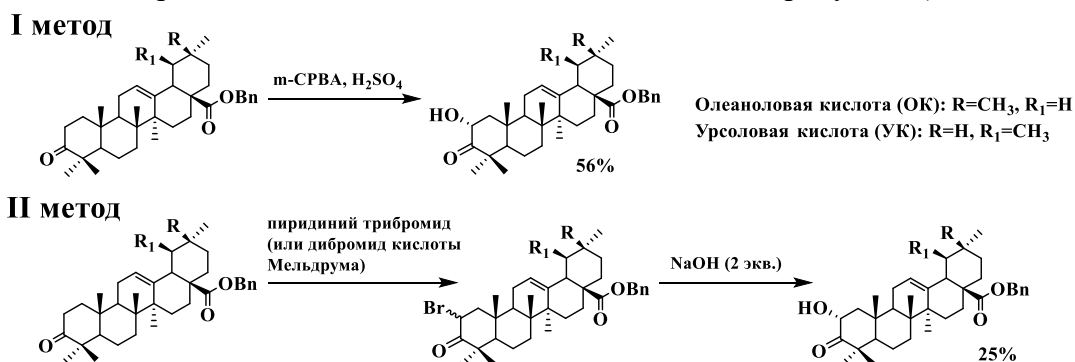


Схема 6. Сравнение методов синтеза 2 α -гидроксикетонов олеаноловой/урсоловой кислот.

Выполненный нами по первому методу пяти-стадийный синтез маслиновой и коросолевой кислот включал следующие последовательные стадии: бензильная защита карбоксильной функции в олеаноловой или урсоловой кислотах и окисление реагентом Джонса 3-ОН группы в кольце А дала тритерпеноиды **37** или **38**. Обработка полученных 3-кето тритерпеноидов м-хлорнадбензойной кислотой в присутствии каталитических количеств серной кислоты привела в качестве единственных продуктов к соответственным 2 α -гидрокси кетонам **39** или **40**. Наблюдаемая при этом высокая стереоселективность электрофильной атаки м-хлорнадбензойной кислотой на С-2 атом образовавшегося промежуточного енола объясняется жестким стереохимическим контролем со стороны β -

ориентированной метильной ангулярной группы при С-10 атоме углерода тритерпенового каркаса. Восстановление 3-кето функции NaBH_4 в 2 α -гидрокси-кетонах дало смесь диастереоизомерных 2,3-дигидроксилированных тритерпеноидов **41-44** с преимущественным образованием 3 β -эпимера (2 α ,3 β :2 α ,3 α =80%:20%). Содержание в смеси целевого 3 β -эпимера было нами увеличено до 95%, при проведении восстановления NaBH_4 в присутствии солей лантанидов ($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Последующее хроматографическое разделение вицинальных диолов на колонке с SiO_2 дало целевые бензильные эфиры маслиновой и коросолевой кислот **41** и **42** в аналитически чистой форме. Синтез маслиновой и коросолевой кислот был завершён снятием бензильной защиты с карбоксильной функции тритерпенов. Полученные маслиновую и коросолеву кислот трансформировали в бромалкиловые эфиры **45** и **46** взаимодействием с избытком дибромбутана в присутствии поташа и конъюгировали с соединением F16 в ДМФА при 85 $^\circ\text{C}$. В результате получили конъюгаты МК-F16 и КК-F16 **47** и **48** (Схема 7).

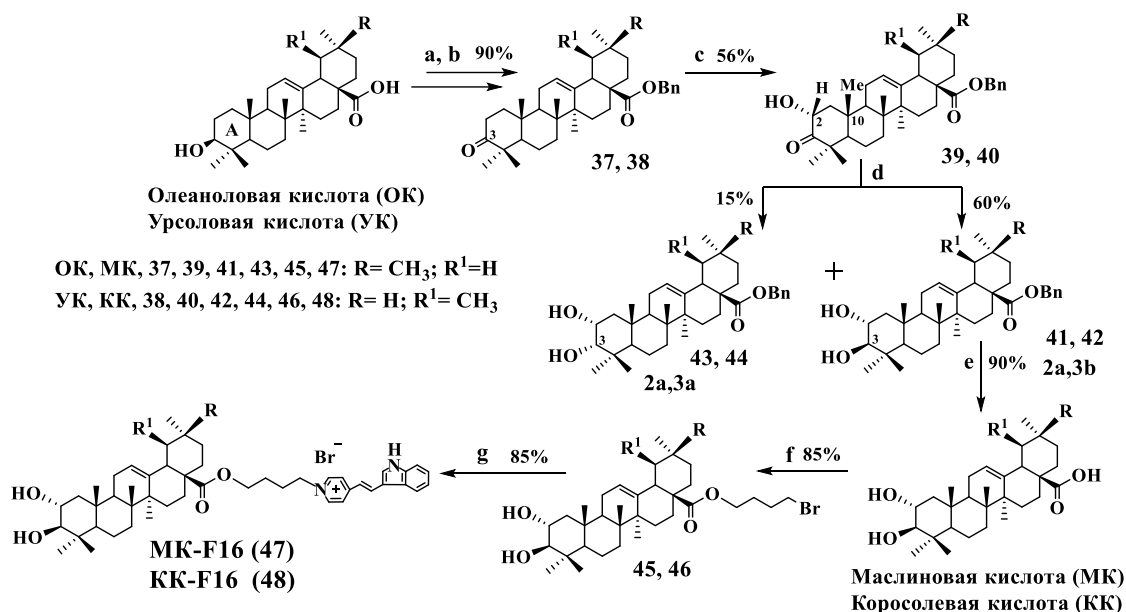


Схема 7. Синтез конъюгатов маслиновой/коросолевой кислот с молекулой F16. (a) BnCl , K_2CO_3 , ДМФА, 55 $^\circ\text{C}$, Ag, 2 ч.; (b) CrO_3 , H_2SO_4 , ацетон, 0 $^\circ\text{C}$; (c) *m*-CPBA, H_2SO_4 , $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 0 $^\circ\text{C}$, Ag; (d) NaBH_4 , $\text{MeOH}-\text{TГФ}$, 20 $^\circ\text{C}$, Ag; (e) Pd-C/10%, H_2 , $\text{MeOH}-\text{TГФ}$, 20 $^\circ\text{C}$; (f) 1,4-дибромбутан, K_2CO_3 , CH_3CN , ДМФА, 50 $^\circ\text{C}$, Ag; (g) 4-(1H-индол-3-илвинил)пиридин, ДМФА, 85 $^\circ\text{C}$, Ag, 12 ч.

Конъюгаты F16–азиатиновая кислота **51** и **51a** получали из коммерчески доступной азиатиновой кислоты, которую трансформировали в ацетат **49** под действием AcCl в ТГФ в присутствии пиридина и 4-диметиламинопиридина (DMAP). Затем азиатиновую кислоту и триацетат **49** трансформировали в бромалкиловые эфиры **50** и **50a**. Синтез гибридных соединений **51** и **51a** завершили взаимодействием эфиров **50** и **50a** с нейтральным предшественником F16 в ДМФА при 85 $^\circ\text{C}$ с выходом 81-82% (Схема 8).

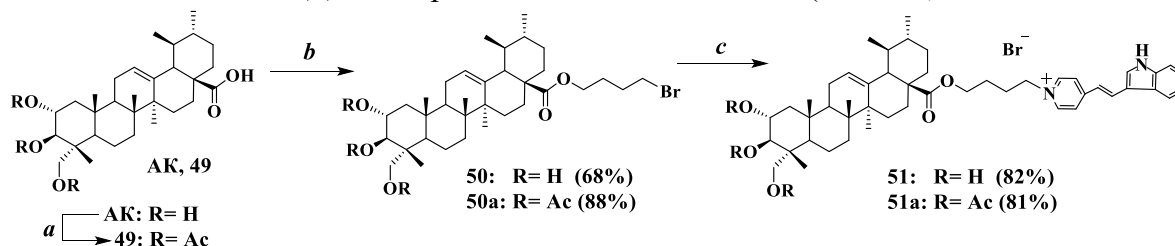


Схема 8. Синтез конъюгатов F16–азиатиновая кислота **51** и **51a**. (a) AcCl , ТГФ, пиридин, DMAP, 20 $^\circ\text{C}$, Ag; (b) 1,4-дибромбутан, K_2CO_3 , CH_3CN , ДМФА, 50 $^\circ\text{C}$, Ag, 2 ч.; (c) (E)-4-(1H-индол-3-илвинил)пиридин, ДМФА, 85 $^\circ\text{C}$, Ag, 12 ч.

Нами также осуществлен синтез конъюгатов F16 с полигидроксилированными аналогами бетулиновой и урсоловой кислот. Стереоселективный синтез ранее неизвестного $1\alpha,2\beta,3\beta$ -оксигенированного аналога бетулиновой кислоты включал в себя следующие основные стадии: бензилирование С-28 карбоксильной функции, формирование енонового фрагмента в кольце А терпеноида под действием PhSeCl и *m*-хлорнадбензойной кислоты дало соединение **52**. Эпоксидование двойной связи с использованием 30% H_2O_2 в щелочной среде привело к $1\alpha,2\alpha$ -эпоксикетону **53** с высокой стереоселективностью за счет стереохимического контроля со стороны β -ориентированной метильной ангулярной группы при С-10 атоме. Восстановление 3-кето группы в кольце А с использованием NaBH_4 в смеси растворителей MeOH–ТГФ дало смесь диастереоизомеров **54** (3β -ОН) и **54a** (3α -ОН), которые были разделены методом колоночной хроматографии на SiO_2 . Хроматографически выделенный основной диастереоизомер **54** был трансформирован в соответствующий ацетат **55**. Последующее стереоселективное раскрытие эпоксидного кольца в соединении **55**, катализируемое HClO_4 , и последующее ацетилирование полученного оксигенированного тритерпеноида без его предварительного выделения дали с высокой стереоселективностью бензиловый эфир $1\alpha,2\beta,3\beta$ -триацетоксидигидробетулиновой кислоты **56** с выходом 66% после очистки методом колоночной хроматографии на SiO_2 . Синтез целевой гибридной молекулы **58** был завершён снятием бензильной защиты в соединении **56**, получением бромалкилового эфира **57** и конъюгацией последнего с предварительно синтезированным (Е)-4-(1Н-индол-3-илвинил)-пиридином при 85°C в ДМФА. Аналогичным образом было получено гибридное соединение с F16 из урсоловой кислоты **62**. (Схема 9).

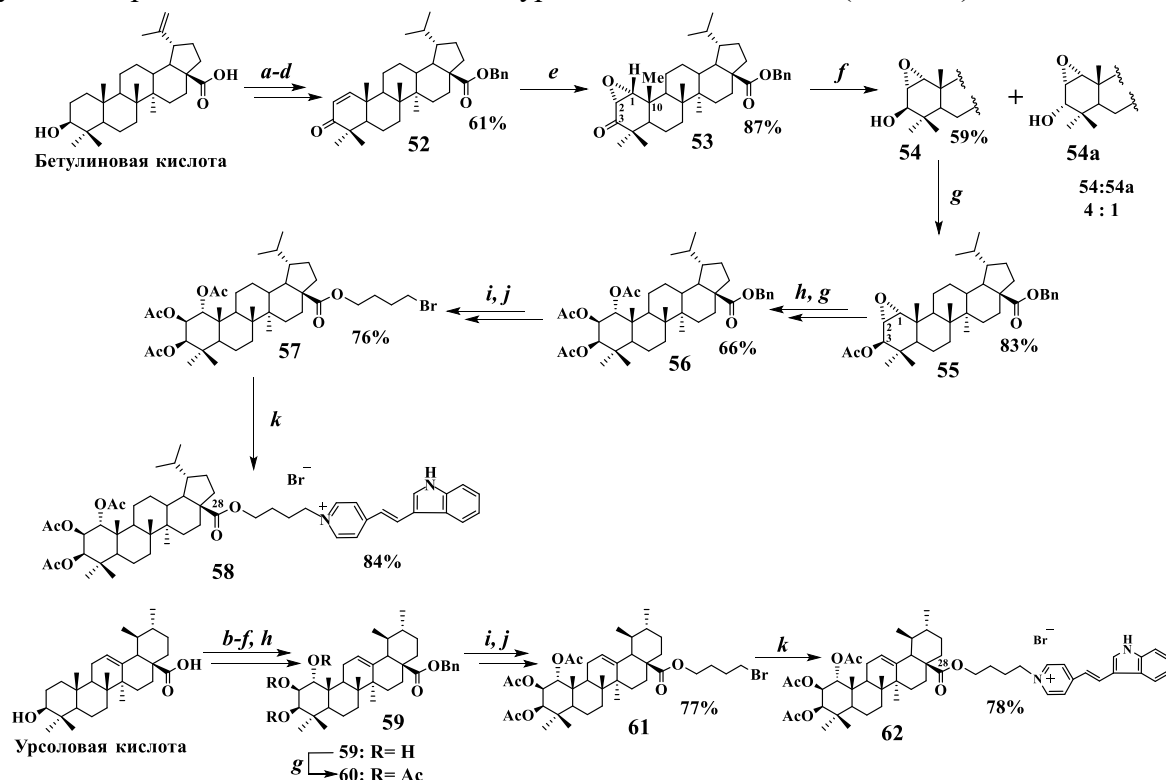


Схема 9. Синтез конъюгатов F16 с полигидроксилированными аналогами бетулиновой и урсоловой кислот. (a) Pd-C/10%, H_2 , MeOH–ТГФ, 20°C , 12ч.; (b) CrO_3 , H_2SO_4 , ацетон, 0°C ; (c) BnCl, K_2CO_3 , ДМФА, 55°C , Ar, 2ч.; (d) PhSeCl, EtOAc, *m*-CPBA, пиридин, 20°C , Ar; (e) 30% H_2O_2 , 10% NaOH, MeOH, 20°C ; (f) NaBH_4 , MeOH–ТГФ, 0°C → 20°C , Ar; (g) AcCl, ТГФ, пиридин, DMAP, 20°C , Ar; (h) HClO_4 , H_2O , ацетон, 20°C ; (i) Pd-C/10%, H_2 , MeOH–ТГФ, 20°C , 2ч.; (j) 1,4-дибромбутан, K_2CO_3 , CH_3CN , ДМФА, 50°C , Ar, 2ч.; (k) (Е)-4-(1Н-индол-3-илвинил)пиридин, ДМФА, 85°C , Ar, 12ч.

Структура полученных соединений была доказана с использованием двумерных спектров ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBS. Так, в кетоэпоксиде **53** сигналы метиновых протонов при C-1 и C-2 атомах кольца А проявляются в виде двух дублетов в области $\delta_{\text{H}} - 3.57$ м.д. и 3.36 с КССВ = 4 Гц. NOE-корреляция, наблюдаемая между H-25 β , H-1 и H-2, свидетельствует о том, что эти протоны находятся в β -ориентации и следовательно эпоксидное кольцо α -ориентировано.

В соединениях **54** и **55** протоны при C-1, C-2 и C-3 атомах были отнесены в соответствии с их спектрами HSQC, HMBC и COSY. Относительная конфигурация 3β -ОН и 3β -ОАс групп была установлена на основании спектров NOESY, в которых наблюдалась сильная корреляция между протонами H-1, H-2 и H-25 β . Отсутствие корреляции NOE между H-3 и H-25 β свидетельствовало о том, что H-3 находится в α -ориентации и что гидроксильная группа имеет β -ориентацию. 3β -ОАс конфигурация была также подтверждена сильной NOE-корреляцией, наблюдаемой между H-23 α , H-5 и H-3, свидетельствующей о том, что эти протоны находятся в α -ориентации. В соединениях **57**, **58** относительная конфигурация 1α -ОАс группы была установлена на основании спектров NOESY, в которых наблюдалась сильная корреляция между протонами H-1 и H-25 β , а 2β -ОАс конфигурация была подтверждена NOE-корреляцией, наблюдаемой между H-2 и H-3.

Полученные конъюгаты F16 с маслиновой и коросолевой кислотами были проверены *in vitro* на их цитотоксическую активность на четырех раковых клетках карциномы рака легких человека, карциномы молочной железы и на здоровых клетках человеческих фибробластов (HF). Чтобы оценить эффект гидроксильной группы в положении C-2 кольца А в F16-производных маслиновой и коросолевой кислот на противоопухолевую активность, мы также оценили цитотоксичность конъюгатов урсоловой и олеаноловой кислот **21** и **25**. Исходные соединения – урсоловую и олеаноловую кислоты использовали как стандарт (таблица 2).

Таблица 2.

Цитотоксическая активность (IC_{50} , μM) конъюгатов **21**, **25**, **47** и **48**, олеаноловой (ОК) и урсоловой (УК) кислот в отношении линий карциномы легких и молочной железы.

Соединение	Карцинома легких человека		Карцинома молочной железы		Здоровые клетки
	H1299	A549	MCF7	BT474	
ОК-F16 (25)	0.93 ± 0.07	0.74 ± 0.09	1.52 ± 0.16	4.34 ± 0.28	2.05 ± 0.58
МК-F16 (47)	10.50 ± 2.44	13.52 ± 2.02	7.44 ± 0.78	11.05 ± 2.51	9.30 ± 2.56
УК-F16 (21)	2.80 ± 0.25	2.40 ± 0.30	1.36 ± 0.74	5.18 ± 0.15	4.98 ± 0.9
КК-F16 (48)	4.01 ± 1.69	1.87 ± 0.14	1.89 ± 0.27	6.70 ± 0.35	1.15 ± 0.38
ОК	139.33 ± 6.85	233.55 ± 22.05	113.5 ± 12.58	149.9 ± 25.12	156.3 ± 10.43
УК	97.60 ± 5.63	68.93 ± 19.63	40.6 ± 12.50	109.6 ± 19.08	59.07 ± 7.73

Все полученные соединения показали значительное синергетическое усиление противоопухолевого эффекта по сравнению с исходными природными тритерпеновыми кислотами. В частности, конъюгат F16 с олеаноловой кислотой ОК-F16 превзошел по противоопухолевой активности исходную природную олеаноловую кислоту в отношении исследуемых раковых клеток максимально в 318 раз. Цитотоксичность конъюгата коросолевой кислоты КК-F16 против линии A549 была в 36 раз выше, чем у урсоловой. Количественная оценка синергизма, рассчитанная по методу Чжоу-Талалая, показала

величины 0,03 и 0,05 для конъюгатов ОК-F16 и УК-F16, соответственно, что свидетельствует об очень сильном синергетическом эффекте. Однако, вопреки нашим ожиданиям, наличие дополнительной гидроксильной функции в положении С-2 в терпеновом ядре в F16-конъюгатах маслиновой и коросолевой кислот привело к заметному снижению цитотоксичности по сравнению с их структурными аналогами. Среди исследованных соединений конъюгат УК-F16 показал наибольшую разницу в индексе селективности между опухолевыми клетками и фибробластами в диапазоне от 2 до 4. В результате, конъюгаты ОК-F16, как наиболее цитотоксичный, и УК-F16, как наиболее селективный, были рекомендованы нами для дальнейших исследований.

3. Сравнительный анализ внутриклеточного распределения F16-конъюгатов тритерпеновых кислот и их структурных трифенилфосфониевых аналогов

Как известно, катион F16 является не только митохондриально-тропным катионным соединением, но еще и обладает хорошими флуоресцентными свойствами, что позволяет напрямую визуализировать F16-производные в клетке. Такие митохондриально-направленные молекулы, как F16, которые позволяют одновременно наблюдать и запускать митохондриальные дисфункции раковых клеток, очень привлекательны для диагностики и лечения рака. Мы решили исследовать проникновение наших конъюгатов с F16 в клетку и их внутриклеточное распределение с применением метода конфокальной флуоресцентной спектроскопии. Результаты, полученные нами на эндотелиальных клетках мыши, показали, что конъюгаты с F16 проникали в клетку и преимущественно локализовались в митохондриях (Рисунок 5: А-С).

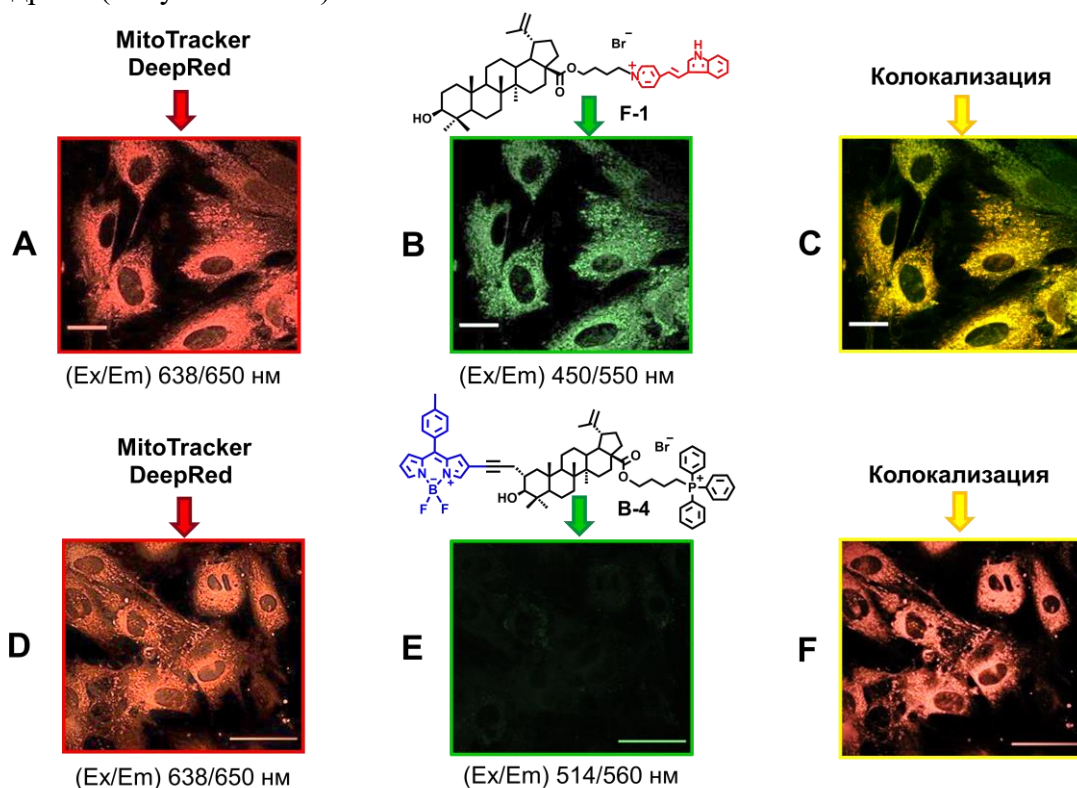


Рисунок 5. Внутриклеточная локализация F16- или TPP⁺-производных тритерпеноидов в митохондриях эпителиальных клеток мыши показана на примере конъюгатов **15** (F-1) и **72** (B-4)

Кроме того, мы попытались сравнить их внутриклеточное распределение с аналогичными по структуре трифенилфосфониевыми конъюгатами. Но поскольку

трифенилфосфониевый катион в отличие от F16 лишен флуоресцентных свойств, перед нами встала задача введения флуоресцентного красителя, в данном случае боро-дифторо-дипирометена (BODIPY), в молекулу конъюгата бетулиновой кислоты с трифенилфосфониевым катионом.

В качестве ключевой стадии синтеза была использована реакция кросс-сочетания между С-2-пропинильными производными бетулиновой кислоты **68** и галоидными производными флуоресцентного красителя, содержащего йодную функцию при С-2 или С-8 позициях BODIPY-платформы **64** или **67**. Разработанная нами процедура ковалентного связывания флуорофора BODIPY с тритерпеновым ядром бетулиновой кислотой, позволила сохранить в тритерпеноиде 3-ОН и 28-СООН функции, которые могут быть трансформированы в трифенилфосфониевые группы.

На первом этапе были синтезированы дипиррометаны **63** и **65** с использованием редко востребованного в этом синтезе кислотного катализатора InCl_3 . Этот катализатор позволил значительно уменьшить образование побочных продуктов олигомеризации пиррола и получить целевые дипиррометаны с хорошим выходом. Трансформацию дипиррометанов **63** и **65** в боро-дифторо-дипирометены **64** и **66** выполнили “one-pot” методом в две стадии с применением в качестве окислителя 2,3-дихлор-5,6-дициано-*p*-бензохинона (DDQ) и с последующим одновременным добавлением $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ и Et_3N . Соединение **64**, содержащее атом йода в фенильном кольце, связали непосредственно с пропинильным производным бетулиновой кислоты **68**, а соединение **66** с метильной группой в фенильном кольце подвергли йодированию по пиррольному кольцу с использованием эквимолярного количества ICl в смеси растворителей $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Реакция протекала с высокой хемоселективностью и дала после очистки методом колоночной хроматографии на силикагеле целевой моно-йодид **67** (Схема 10).

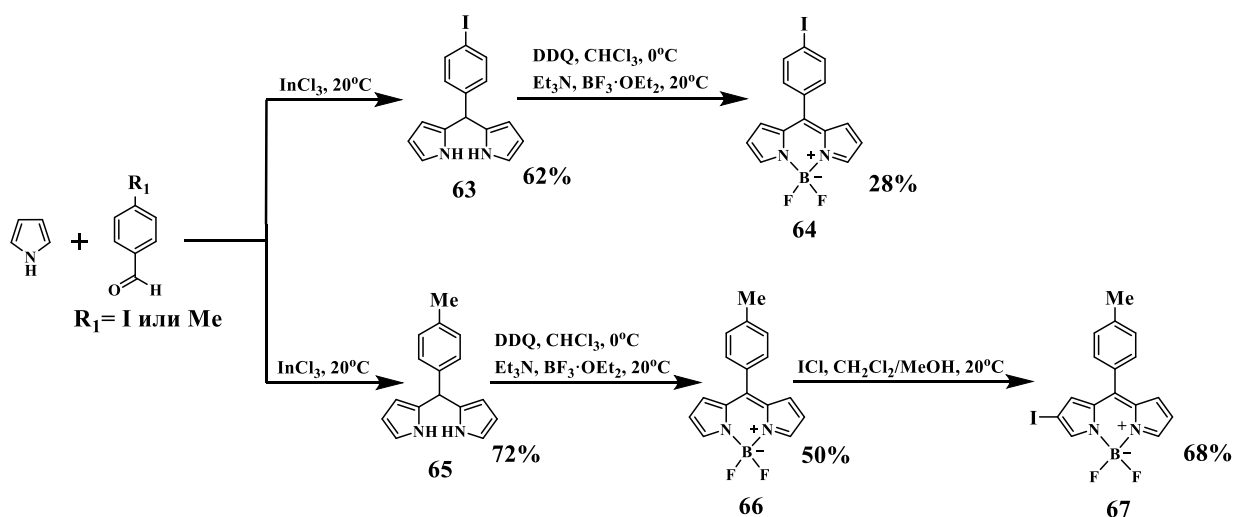


Схема 10. Синтез йод-производных BODIPY.

Тритерпеновый компонент в реакции Соногашира, С-2 пропинильное производное бромалкилового эфира бетулиновой кислоты **68**, получали в 5 стадий по разработанному нами ранее методу. Реакцию Соногашира проводили в типовых условиях. Последующее взаимодействие тритерпеноидов **69** и **70** с трифенилфосфином при кипячении в CH_3CN дало трифенилфосфониевые соли **71** и **72** (В-3 и В-4 соответственно) (Схема 11).

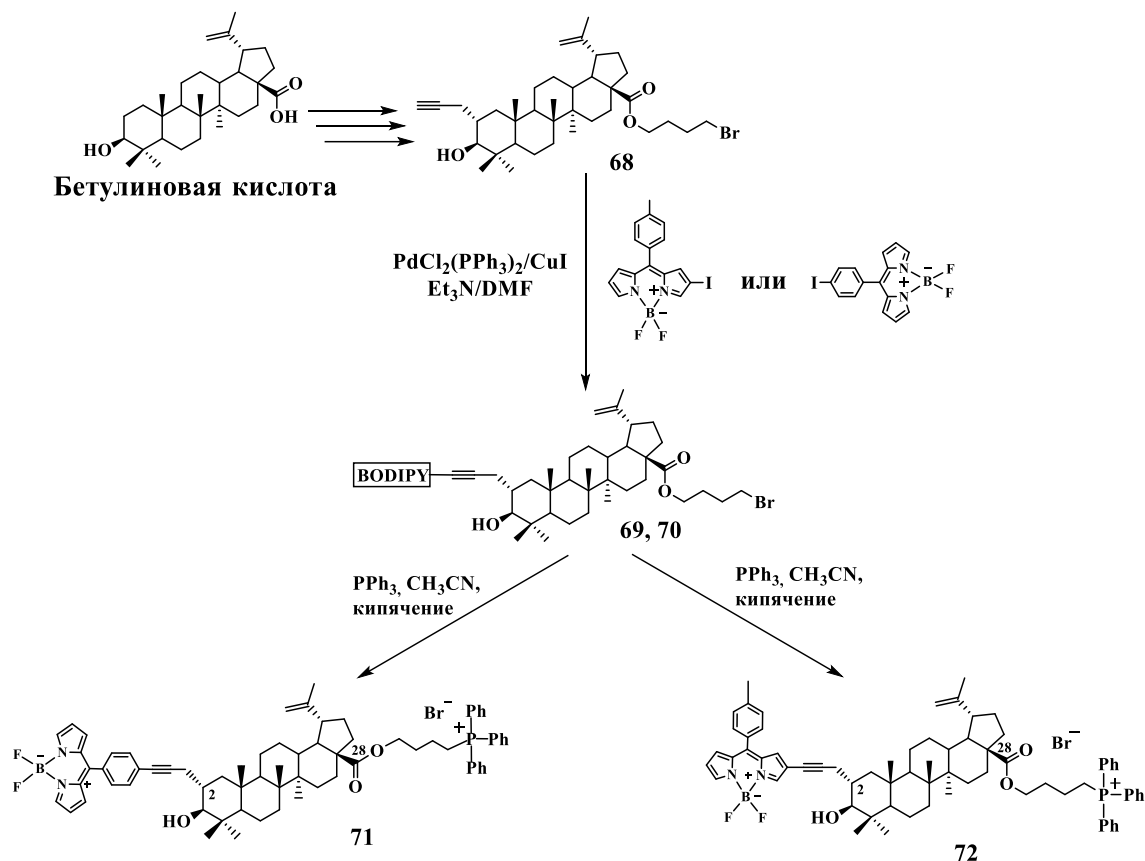


Схема 11. Синтез BODIPY-меченых трифенилфосфониевых солей.

Однако, полученные соединения с трифенилфосфониевым катионом, в которых в качестве флуоресцентной метки был BODIPY, не проявили флуоресцентных свойств. По-видимому, в отличие от конъюгатов с F16, соединения 71 и 72 не преодолевали внутриклеточные мембраны и не проникали в клетку (Рисунок 5, D-F).

Заключение

Получен новый тип катионных производных природных тритерпеновых кислот в качестве потенциальных митохондриально-направленных флуоресцентных противоопухолевых кандидатов в лекарства. В основе разработки лежит идея соединения в одной молекуле цитотоксического тритерпенового фрагмента, проявляющего противоопухолевое действие, и фрагмента митохондриально-тропного флуоресцентного соединения **F16** (4-(1H-индол-3-ил-винил)пиридиния), отвечающего за транспорт молекулы лекарства через мембраны клеток и одновременно выполняющего роль флуоресцентного зонда. Новые гибридные молекулы продемонстрировали многократное усиление противоопухолевой активности по сравнению со своими прототипами, природными тритерпеновыми кислотами. Методом конфокальной спектроскопии подтверждена их локализация в митохондриях эндотелиальных клеток мыши. Полученные в диссертационной работе результаты показали, что F16 производные природных тритерпеновых кислот представляют собой потенциальные противоопухолевые агенты митоканы, перспективные для дальнейших биологических исследований.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработаны рациональные методы синтеза и реализован синтез серии ранее неизвестных конъюгатов природных тритерпеновых кислот с митохондриально-тропным катионным соединением F16. Липофильный катион F16 использован для усиления биодоступности, облегченного трансмембранного переноса и селективного накопления цитотоксических тритерпеновых кислот в митохондриях опухолевых клеток. Для ковалентного связывания катионной молекулы и тритерпеноида через различные линкеры при С-2, С-3, С-28 и С-30 позициях тритерпенового ядра использовали классические реакции этерификации кислот в щелочных условиях, этерификацию по Стеглиху или реакцию кросс-сочетания по Соногашира арилгалогенидов с терминальными алкинами тритерпеновой структуры. На основе доступных бетулиновой, урсоловой и олеаноловой кислот реализован многостадийный стереоселективный синтез оксигенированных тритерпеноидов с последующей их трансформацией в гибридные соединения с F16.

2. Исследован цитотоксический потенциал синтезированных соединений в отношении линий опухолевых клеток человека различного происхождения (опухолевые линии лейкозных клеток, карциномы и нормальные клетки фибробласты). Все синтезированные соединения проявили высокий противоопухолевый эффект на лейкозных клетках в субмикромольных концентрациях с приемлемым “терапевтическим окном” ($IS = 10$). Гибридные молекулы превзошли свои прототипы, природные тритерпеновые кислоты, в 100-300 раз. Высокий синергетический эффект подтвердился также на исследованных линиях карцином.

3. Проведен анализ влияния структуры на противоопухолевую активность гибридов, который показал, что в ряду исследуемых конъюгатов лупановой, урсановой и олеановой структуры F16-производные лупановых тритерпеноидов были наиболее цитотоксичными и селективными соединениями. Введение второго катионного фрагмента F16 в молекулу тритерпеноида, конъюгация бетулиновой кислоты с F16 при С-30 позиции или увеличение количества гидроксильных групп в кольце А тритерпеновых кислот не дало положительного заметного изменения цитотоксической активности.

4. Разработан новый метод синтеза BODIPY-меченных проб производных бетулиновой кислоты, несущих в С-28 боковой цепи концевые митохондриально-направленные трифенилфосфониевые группы. В качестве ключевой стадии синтеза использована реакция кросс-сочетания между С-2-пропинильным производным бетулиновой кислоты и галоидными производными флуоресцентного красителя, содержащего йодную функцию при С-2 или С-8 позициях BODIPY-платформы. Разработанная процедура ковалентного связывания флуорофора BODIPY с бетулиновой кислотой, позволяющая сохранить в тритерпеновом ядре нативные 3-ОН и 28-СООН функции, может найти применение в синтезе других флуоресцентных BODIPY-меченных тритерпеновых кислот.

5. С использованием метода конфокальной флуоресцентной спектроскопии проведена прямая визуализация внутриклеточного распределения F16-конъюгатов тритерпеновых кислот в эндотелиальных клетках мышцы. Результаты анализа показали, что гибридные молекулы поглощаются клетками и основным местом их накопления являются митохондрии

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОПУБЛИКОВАНО В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

1. Gubaidullin, R.R. Design, Synthesis, and Photophysical Properties of BODIPY-Labeled Lupane Triterpenoids / R.R. Gubaidullin, D.A. Nedopekina, A.A. Tukhbatullin, **E.V. Davletshin**, A.Yu. Spivak // Chem. Proc. – 2021. – V. 3. – P. 11.
2. Spivak, A.Yu. Pentacyclic triterpene acid conjugated with mitochondria-targeting cation F16: Synthesis and evaluation of cytotoxic activities / A.Yu. Spivak, D.A. Nedopekina, R.R. Gubaidullin, **E.V. Davletshin**, A.A. Tukhbatullin, V.A. D'yakonov, M.M. Yunusbaeva, L.U. Dzhemileva, U.M. Dzhemilev // Medicinal Chemistry Research. – 2021. – V. 30. – P. 940–951.
3. Dubinin, M.V. Mitochondria-targeted prooxidant effects of betulinic acid conjugated with delocalized lipophilic cation F16 / M.V. Dubinin, A.A. Semenova, A.I. Ilzorkina, N.V. Penkov, D.A. Nedopekina, V.A. Sharapov, E.I. Khoroshavina, **E.V. Davletshin**, N.V. Belosludtseva, A.Yu. Spivak, K.N. Belosludtsev // Free Radical Biology and Medicine. – 2021. – V. 168 – P. 55–69.
4. Dubinin, M.V. Mitochondrial dysfunction induced by F16-betulin conjugate and its role in cell death initiation / M.V. Dubinin, A.A. Semenova, D.A. Nedopekina, **E.V. Davletshin**, A.Yu. Spivak, K.N. Belosludtsev // Membranes. – 2021. – V. 11. – P. 352.
5. Nedopekina, D.A. Effective Synthesis of a Novel Betulinic Acid Conjugate with Mitochondria-Targeting Cation F16 / D.A. Nedopekina, **E.V. Davletshin**, A.Yu. Spivak // Chem. Proc. – 2022. – V. 8. – P. 97.
6. Spivak, A.Yu. Synthesis of BODIPY-labeled fluorescent betulinic acid derivatives with a terminal triphenylphosphonium group on side-chain C-28 / A.Yu. Spivak, **E.V. Davletshin**, R.R. Gubaidullin, A.A. Tukhbatullin, D.A. Nedopekina // Chem Nat Compd. – 2022. – V. 58, № 6. – P. 1062–1068.
7. Belosludtsev, K.N. Comparative Study of Cytotoxic and Membranotropic Properties of Betulinic Acid-F16 Conjugate on Breast Adenocarcinoma Cells (MCF-7) and Primary Human Fibroblasts / K.N. Belosludtsev, A.I. Ilzorkina, N.V. Belosludtseva, V.A. Sharapov, N.V. Penkov, D.A. Serov, M.N. Karagyaur, D.A. Nedopekina, **E.V. Davletshin**, M.E. Solovieva, A.Yu. Spivak, U.S. Kuzmina, Yu.V. Vakhitova, V.S. Akatov and M.V. Dubinin // Biomedicines. – 2022. – V. 10. – P. 2903.
8. Dubinin, M.V. Conjugation of Triterpenic Acids of Ursane and Oleanane Types with Mitochondria-Targeting Cation F16 Synergistically Enhanced Their Cytotoxicity against Tumor Cells / M.V. Dubinin, D.A. Nedopekina, A.I. Ilzorkina, A.A. Semenova, V.A. Sharapov, **E.V. Davletshin**, N.V. Mikina, Y.P. Belsky, A.Y. Spivak, V.S. Akatov, N.V. Belosludtseva, J. Liu, K.N. Belosludtsev // Membranes. – 2023. – V. 13. – P. 563.
9. Spivak, A.Yu. Synthesis and cytotoxic activity of the oxygenated analogue of betulinic acid conjugate with a delocalized lipophilic cationic compound F16 / A.Yu. Spivak, **E.V. Davletshin**, D.A. Nedopekina, R.R. Khalitova, Yu.P. Belsky, O.Yu. Shuvalov // Chem Nat Compd. – 2023. – V.5. – P. 730.
10. Спивак А.Ю., Недопёкина Д.А., **Давлетшин Э.В.**, Джемилева Л.У., Дьяконов В.А., Джемилев У.М. Конъюгаты тритерпеновых кислот и (Е)-4-(1Н-индол-3-илвинил)-пиридиний бромида с противоопухолевой активностью. Патент РФ. № 2786134. Опубликовано 19.12.2022. Бюл. № 35.
11. Anna Spivak, Rinat Gubaidullin, Darya Nedopekina, Adis Tukhbatullin, **Eldar Davletshin**. Design, synthesis and photophysical properties of BODIPY-labeled lupane triterpenoids // The 24th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry – 15

November – 15 December 2020, Session B. Bioorganic, Medicinal and Natural Products Chemistry. DOI: 10.3390/ecsoc-24-08102.

12. Anna Spivak, Darya Nedopekina, **Eldar Davletshin**. Effective Synthesis of a Novel Betulinic Acid Conjugate with Mitochondria - Targeting Cation F16 // The 25th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry – 15 – 30 November 2021, Session B. Bioorganic, Medicinal and Natural Products Chemistry. DOI: 10.3390/ecsoc-25-11638.

13. **Давлетшин, Э.В.** Конъюгация бетулиновой кислоты с митохондриально-направленным липофильным катионом F-16: синтез и исследование противораковой активности / **Э.В. Давлетшин**, Д.А. Недопёкина, А.Ю. Спивак // V Всероссийская молодежная конференция «Достижения молодых учёных: химические науки»: сб. тезисов докладов. – Уфа, 2020. – С. 71–73.

14. **Давлетшин, Э.В.** Синтез конъюгата бетулиновой кислоты с митохондрио-тропным катионом F16 в качестве нового противоопухолевого агента / **Э.В. Давлетшин**, Д.А. Недопёкина, А.Ю. Спивак // IV Всероссийская молодежная конференция «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений» сб. тезисов докладов. – Уфа, 2020. – С. 26–28.

15. **Давлетшин, Э.В.** Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16 / **Э.В. Давлетшин**, Д.А. Недопёкина // Первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021: сб. тезисов докладов. – Новосибирск, 2021. – С. 70.

16. **Давлетшин, Э.В.** Синтез конъюгатов полигидроксильированных тритерпеноидов с катионным соединением F16 / **Э.В. Давлетшин**, Д.А. Недопёкина, А.Ю. Спивак // VII Всероссийская (заочная) молодежная конференция «Достижения молодых учёных: химические науки»: сб. тезисов докладов. – Уфа, 2022. – С. 59–60.

17. **Давлетшин, Э.В.** Синтез BODIPY-меченых флуоресцентных производных бетулиновой кислоты с концевой трифенилфосфониевой группой в C-28 боковой цепи / **Э.В. Давлетшин**, Д.А. Недопёкина, А.Ю. Спивак // VI Всероссийская молодежная конференция «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений»: сб. тезисов докладов. – Уфа, 2022. – С. 26–27.

18. Микина, Н.В. Митохондриально-направленные эффекты конъюгата маслиновой кислоты и липофильного катиона F16 / Н.В. Микина, А.А. Семенова, В.А. Шарапов, Д.А. Недопёкина, А.Ю. Спивак, **Э.В. Давлетшин**, Р.Р. Халитова, М.В. Дубинин // 76-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление»: сб. тезисов докладов. – Нижний Новгород, 2023. – С. 213.