

На правах рукописи



ДАВЛЕТШИН ЭЛЬДАР ВАЛЕРЬЕВИЧ

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

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Уфа – 2024

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

Официальные оппоненты: **Миронов Владимир Федорович**
доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией фосфорсодержащих аналогов природных соединений Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (ИОФХ ФИЦ КазНЦ РАН)

Ямансаров Эмиль Юлаевич
кандидат химических наук, доцент, заведующий лабораторией молекулярных гибридов и конъюгатов Института фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (БГМУ)

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск)**

Защита диссертации состоится «05» июня 2024 г. в 14. 00 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, 69 (УФИХ УФИЦ РАН, зал заседаний). Тел./факс: (347) 2356066. E-mail: dissovetioh@gmail.com.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 450075, Республика Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, 141.

С текстом диссертации можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук и на официальном сайте Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ufaras.ru) по адресу:

http://ufaras.ru/wp-content/uploads/2024/03/DavletshinEV_Dissertaciya.pdf

Автореферат разослан «____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.02,
доктор химических наук, профессор



Шарипов Г.Л.

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 способностью к мутации 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 органической 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». Для соединений, противоопухолевые эффекты которых связаны с митохондриальными дисфункциями, часто используется термин «Митоканы» (акроним слов «митохондрия» и «рак», *mito+cancer*). В представленной диссертационной работе в качестве перспективной молекулярной платформы для разработки новых противоопухолевых агентов митоканов исследуются доступные природные пентациклические тритерпеновые кислоты лупановой, урсановой и олеановой структуры. Эти вторичные растительные метаболиты входят в состав многих лекарственных растений, фруктов, ягод и овощей. Наибольший интерес к этим соединениям вызван их цитотоксическими свойствами, показанными *in vitro* и *in vivo* для различных типов опухолевых клеток. 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 тритерпеноидов, 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. В связи с этим разработка новых эффективных подходов и синтетических методов для получения полусинтетических производных природных тритерпеновых кислот, проявляющих высокую избирательность по отношению к биомишеням и обладающих приемлемой биодоступностью и способностью прохождения через клеточные мембраны, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования. 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. 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 превзошли *in vitro* по противоопухолевой активности свои прототипы, природные тритерпеновые кислоты. Перспективность этой стратегии была показана также в работах, в которых авторы использовали митохондриально-тропный катион родамина В. Комбинация тритерпеновых кислот с пиперазиновыми производными родамина В дала увеличение цитотоксического действия гибридных молекул вплоть до низких наномолярных концентраций. 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.

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 эффективных синтетических подходов, рациональных методов синтеза и биологический скрининг «библиотеки» конъюгатов пентациклических тритерпеноидов лупанового, урсанового и олеанового ряда с делокализованным катионным соединением F16 в качестве противоопухолевых митохондриально-тропных лекарственных агентов.

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 алкил/алкоксиалкил линкерами в различных положениях молекулы тритерпеноидов;

– выбрать методы получения и синтезировать полигидроксилированные тритерпеноиды (полигидроксилированный аналог бетулиновой кислоты, маслиновую и коросолевою кислоты) на основе доступных тритерпеновых кислот, 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 с целью выявления соединений-лидеров;

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

Научная новизна. Разработаны эффективные методы синтеза и 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 C-28 боковой цепи концевые митохондриально-направленные трифенилфосфониевые группы. Разработанный подход ковалентного связывания флуорофора BODIPY с бетулиновой кислотой, позволяющий сохранить в тритерпеновом ядре нативные 3-OH и 28-COOH функции, может найти применение в синтезе других флуоресцентных BODIPY-меченных тритерпеноидов.

Методом конфокальной микроскопии, выполненной на эндотелиальных клетках мыши, установлена значительная локализация испытуемых гибридных соединений в митохондриях клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы. Синтезированы новые биологически активные катионные производные природных тритерпеновых кислот, представляющие интерес для практического использования. 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. Разработанные подходы и методы синтеза могут найти применение в синтезе аналогичных гибридных производных моно-, дитерпеноидов и стероидов.

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 С-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 следует из 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 «MEDCHEMSCHOOL2021» (г. Новосибирск, 2021); 24-ой и 25-ой Международных электронных конференциях по синтетической органической химии (2020; 2021); 76-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (г. Нижний Новгород, 2023); 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 18 научных трудов, из них 9 статей в журналах, включенных в список ВАК и индексируемых в системах Scopus и Web of Science, а также тезисы 9 докладов на российских и международных конференциях. Получен 1 патент РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Объем диссертации составляет 179 страниц, включая 31 рисунок, 18 схем, 3 таблицы и 190 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. Пуццино*) за проведение биологических исследований полученных соединений на всех этапах выполнения этой работы.

Автор выражает глубокую благодарность д.м.н., с.н.с. Джемилевой Л.У. за исследование противоопухолевой активности полученных соединений на лейкозных клетках.

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 по синтезу и избирательному воздействию 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 и исследования цитотоксической активности конъюгатов тритерпеноидов лупановой, олеановой и урсановой структуры с катионным фрагментом F16, дается анализ внутриклеточного распределения F16-конъюгатов тритерпеновых кислот в сравнении с их структурными трифенилфосфониевыми аналогами методом конфокальной микроскопии. **Третья глава** (экспериментальная часть) содержит перечень приборов и используемых в работе реактивов, методики синтеза, результаты физико-химического анализа и биологического скрининга полученных соединений. **В приложении** приведены данные одномерной ^1H и ^{13}C ЯМР- спектроскопии конъюгатов «тритерпеноид – F16».

1. Синтез и исследование цитотоксической активности конъюгатов бетулина, бетулиновой, урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот с липофильным катионным соединением 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 (Рисунок 1).

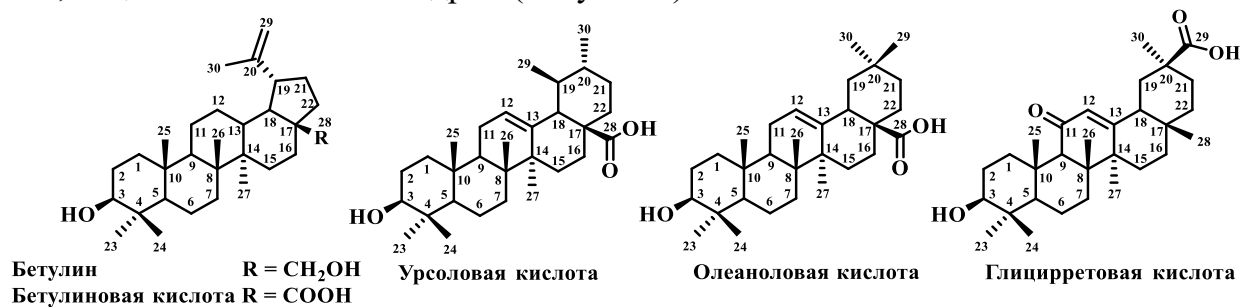
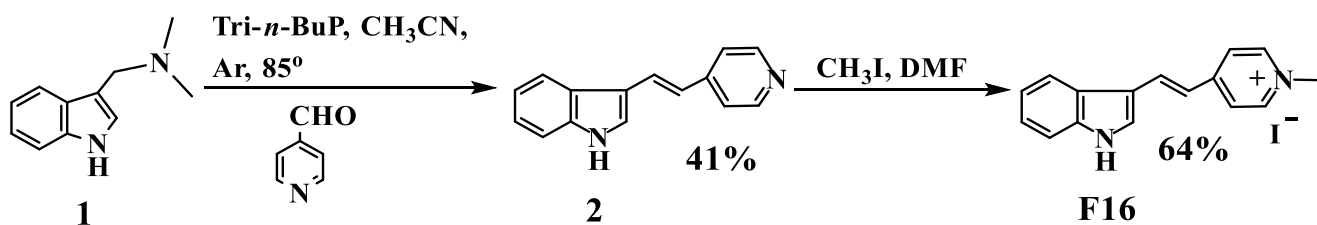


Рисунок 1 – Природные пентациклические тритерпеноиды

Нами и другими исследовательскими группами было показано, что производные бетулина, бетулиновой и урсоловой кислот, ковалентно связанные с трифенилфосфониевым фрагментом, более чем в 50 раз превзошли свои прототипы по противоопухолевой активности.

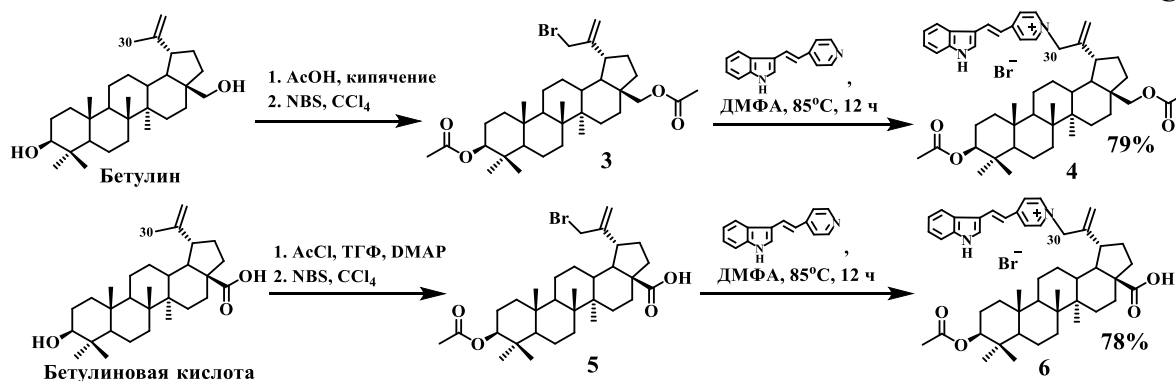
Продолжая поиск новых малотоксичных митохондриально-направленных противоопухолевых агентов на основе тритерпеновых кислот, мы обратились к дизайну и синтезу конъюгатов пентациклических тритерпеноидов, в котором использовали относительно недавно открытое катионное соединение F16 [E-4-(1H-индол-3-илвинил)-N-метилпиридиния йодид], способное избирательно накапливаться в митохондриальной матрице различных опухолевых клеток. F16 синтезируют конденсацией грамина (1) с пиридинкарбоксальдегидом в присутствии трибутилфосфина с последующей обработкой полученного соединения 2 метилиодидом (Схема 1). В синтезе описанных в работе конъюгатов «тритерпеноид-F16» мы использовали нейтральный предшественник F16 – соединение 2.

Схема 1

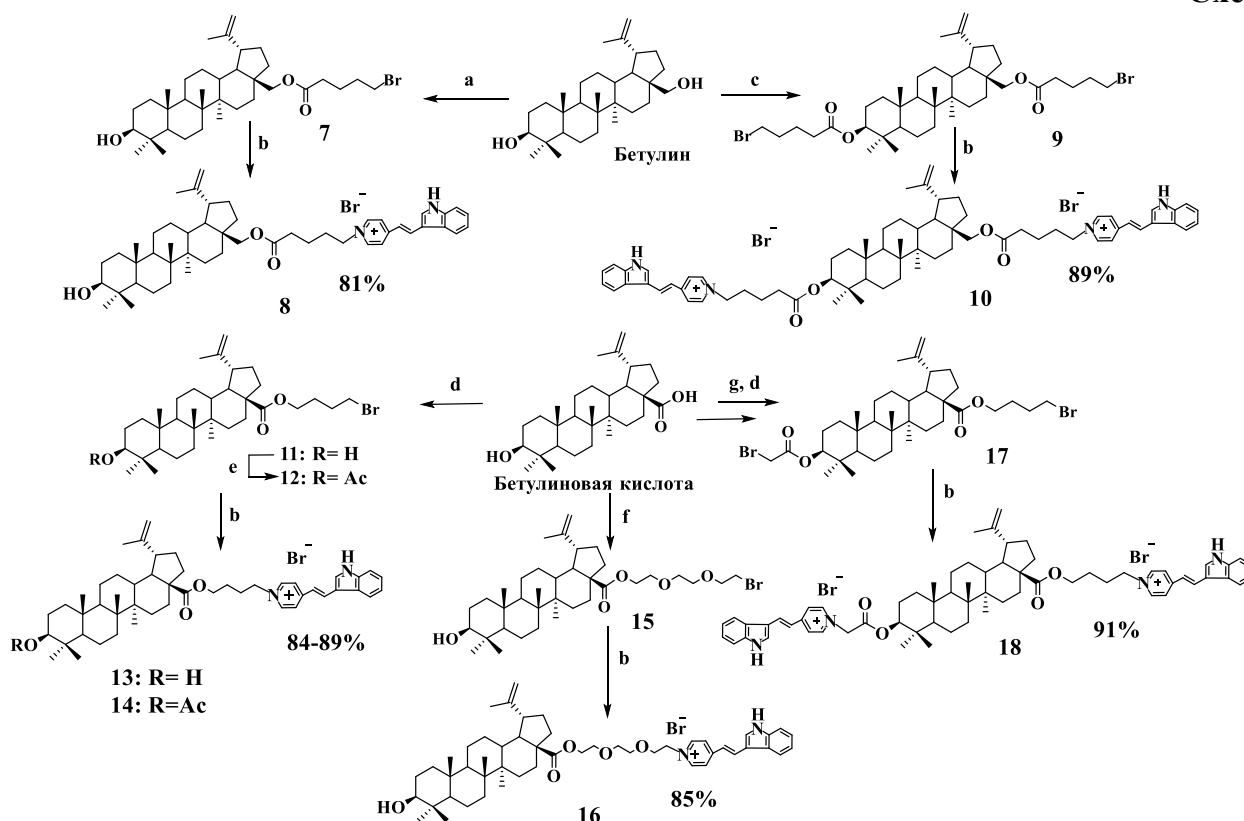


В первой серии конъюгатов лупановых тритерпеноидов с катионным фрагментом F16 было задействовано фармакологически нейтральное С-30 положение тритерпенового каркаса. Конъюгаты 4 и 6 синтезировали из доступных ацетильных производных бетулина и бетулиновой кислоты. Диацетат бетулина получали напрямую из бересты (коры березы) кипячением в уксусной кислоте, а ацетат бетулиновой кислоты синтезировали взаимодействием бетулиновой кислоты с ацетилхлоридом в ТГФ в присутствии пиридина и 4-диметиламинопиридина (DMAP). Полученные ацетаты были трансформированы в соответствующие аллильные бромиды 3 и 5 с использованием N-бромсукцинимидом (NBS) в четыреххлористом углероде, а затем были введены в реакцию с соединением 2 в ДМФА при 85°C с образованием конъюгатов 4 и 6 (Схема 2).

Известно, что 3-ОН и 28-СООН функциональные группы тритерпенового ядра обладают выраженными фармакофорными свойствами, и их модификация способна повлиять на противоопухолевую активность производных тритерпеноидов.



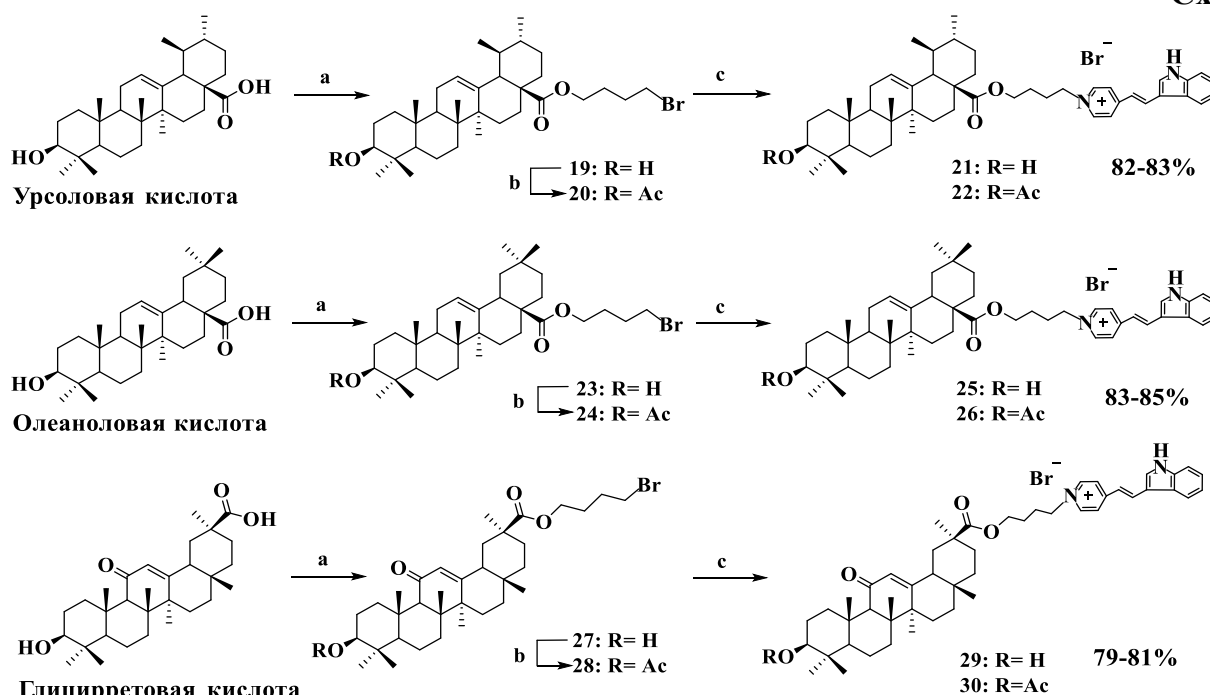
В связи с этим в следующей серии конъюгатов катионный фрагмент F16 был связан с молекулой тритерпеноидов лупанового ряда при 3-ОН и 28-СООН функциях сравнительно легко гидролизуемой сложноэфирной связью.Mono- и дибромалкиловые эфиры бетулина **7** и **9** получены карбодимидным методом с использованием 5-бромвалериановой кислоты в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодимида (DCC) и DMAP. Взаимодействием бетулиновой кислоты с четырёхкратным молярным избытком 1,4-дибромбутана или α,ω -дибромтриэтиленгликоля в ДМФА синтезированы соответствующие эфиры **11** и **15**. Дибромалкиловый эфир бетулиновой кислоты **17** синтезирован ацилированием 3-ОН группы бетулиновой кислоты под действием бромуксусной кислоты с последующей реакцией промежуточного ацильного производного с 1,4-дибромбутаном. Взаимодействие полученных эфиров с нейтральным предшественником F16 дало соответствующие моно- и диконъюгаты **8**, **10**, **13**, **14**, **16** и **18** с высоким выходом (Схема 3).



(a) 5-бромвалериановая кислота (1 экв.), DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 20 °C, Ar; (b) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, 85 °C, Ar, 12 ч.; (c) 5-бромвалериановая кислота (2 экв.), DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 20 °C, Ar; (d) 1,4-дибромбутан, K₂CO₃, ДМФА, CH₃CN, 50 °C, Ar; (e) AcCl, ТГФ, пиридин, DMAP, 20 °C, Ar; (f) α,ω -дибромтриэтиленгликоль, K₂CO₃, ДМФА, 50 °C, Ar; (g) бромуксусная кислота, ТГФ, пиридин, DMAP, 20 °C, Ar.

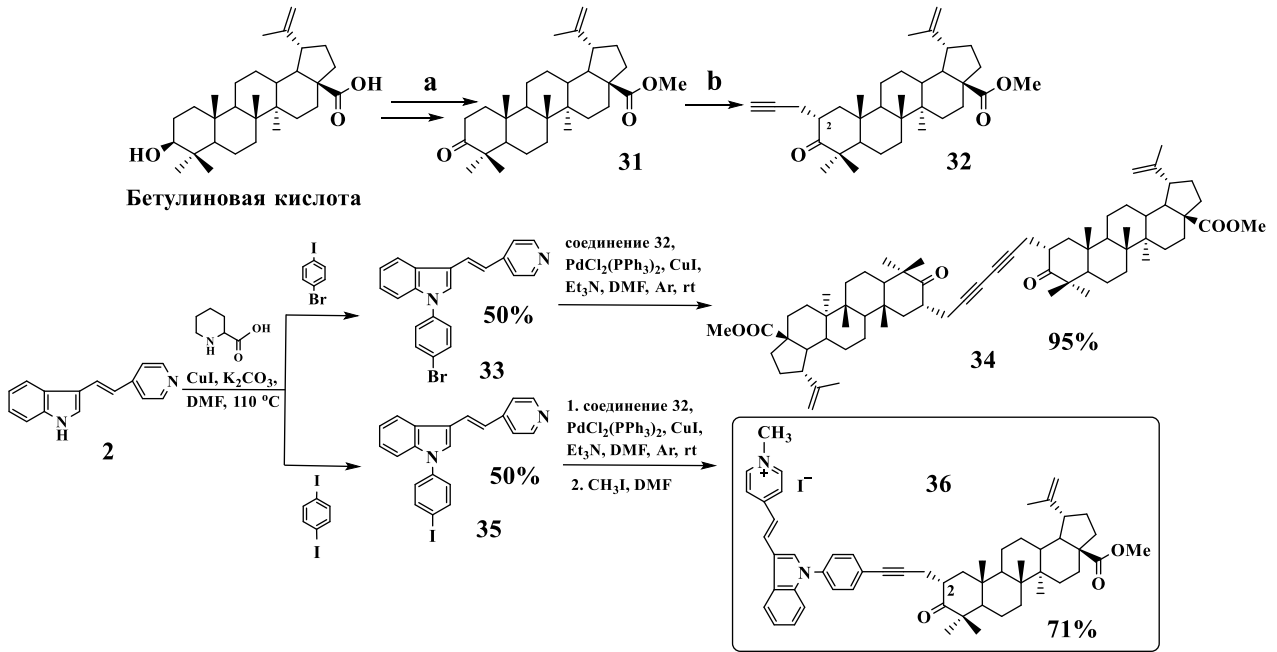
С целью расширения ряда F16-производных тритерпеноидов и дальнейшего исследования влияния молекулярной структуры тритерпенового ядра на цитотоксическую активность гибридных молекул, осуществлен синтез конъюгатов урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот с катионным соединением F16 (**21**, **22**,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

Схема 4



(a) 1,4-дибромбутан, K_2CO_3 , ДМФА, CH_3CN , 50 °С, Ar; (b) $AcCl$, ТГФ, пиридин, DMAP, 20 °С, Ar; (c) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, 85 °С, Ar, 12 ч.

Примечательно, что фармакофорный фрагмент F16 в полученных конъюгатах связан с 3-ОН и/или 28-СООН группами тритерпенового ядра через сложноэфирную функцию, которая может быть неустойчива к действию ферментов в биохимических условиях. В связи с этим мы разработали эффективный подход к синтезу новой гибридной молекулы «тритерпеноид-F16», в которой атом азота индольного кольца F16 связан с кольцом А бетулиновой кислоты по С-2 положению через фенилэтинильный линкер. Исходным терпеноидом послужил С-2 пропилилзамещенный 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 более реакционноспособное 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).



(a) 1. CrO_3 , H_2SO_4 , ацетон, 2 ч.; 2. CH_2N_2 , Et_2O , 0°C ; (b) $\text{KN}(\text{SiMe}_3)_2$, Et_3B , $\text{C}_3\text{H}_7\text{Br}$, 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 углерод-углеродную или сложноэфирную типы связей (Рисунок 2).

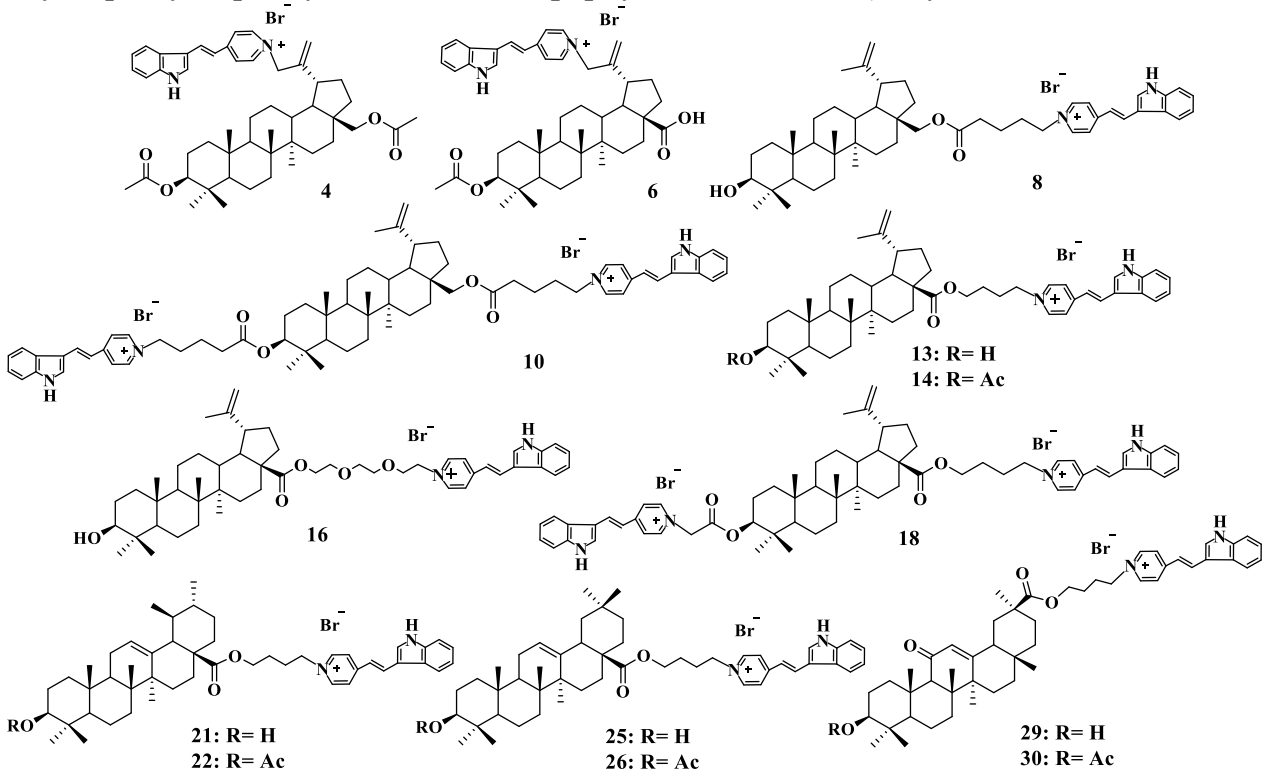


Рисунок 2 – Библиотека полученных конъюгатов

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 многократно превзошли бетулиновую кислоту (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 \pm 0.094 ^b	3.260 \pm 0.091 ^b	3.190 \pm 0.089 ^b	11.400 \pm 1.030 ^b
8	0.906 \pm 0.037 ^b	0.937 \pm 0.032 ^b	0.904 \pm 0.033 ^b	8.200 \pm 0.630 ^b
10	2.060 \pm 0.079 ^b	1.680 \pm 0.054 ^b	1.620 \pm 0.051 ^b	10.800 \pm 0.980 ^b
<i>Конъюгаты с бетулиновой кислотой</i>				
6	>125 ^b	>125 ^b	>125 ^b	>125 ^b
13	0.616 \pm 0.028 ^b	0.844 \pm 0.034 ^b	0.812 \pm 0.032 ^b	6.100 \pm 0.220 ^b
14	2.167 \pm 0.073 ^b	0.584 \pm 0.027 ^b	0.559 \pm 0.025 ^b	4.360 \pm 0.990 ^b
16	0.573 \pm 0.024 ^b	1.260 \pm 0.042 ^b	1.210 \pm 0.041 ^b	5.500 \pm 0.340 ^b
18	4.190 \pm 0.117 ^b	4.360 \pm 0.122 ^b	4.010 \pm 0.109 ^b	10.400 \pm 1.230 ^b
<i>Конъюгаты с урсоловой кислотой</i>				
21	2.461 \pm 0.085 ^b	0.623 \pm 0.031 ^b	0.588 \pm 0.032 ^b	6.230 \pm 0.850 ^b
22	2.228 \pm 0.076 ^b	0.561 \pm 0.029 ^b	0.554 \pm 0.028 ^b	5.180 \pm 0.450 ^b
<i>Конъюгаты с олеаноловой кислотой</i>				
25	0.607 \pm 0.027 ^b	0.687 \pm 0.034 ^b	0.671 \pm 0.035 ^b	3.490 \pm 0.560 ^b
26	2.234 \pm 0.081 ^b	0.578 \pm 0.027 ^b	0.516 \pm 0.029 ^b	4.280 \pm 0.840 ^b
<i>Конъюгаты с глицирретовой кислотой</i>				
29	2.425 \pm 0.083 ^b	0.559 \pm 0.024 ^b	0.511 \pm 0.022 ^b	8.300 \pm 1.190 ^b
30	2.304 \pm 0.078 ^b	0.568 \pm 0.026 ^b	0.534 \pm 0.026 ^b	7.010 \pm 0.320 ^b
F16	>500 ^b	>500 ^b	>500 ^b	>500 ^b
БК	149.290 \pm 4.170 ^b	81.680 \pm 1.820 ^b	78.540 \pm 1.760 ^b	236.400 \pm 3.600 ^b
F16:БК/1:1	122.170 \pm 3.460 ^b	91.580 \pm 1.950 ^b	89.150 \pm 1.890 ^b	280.100 \pm 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 C-30 незначительно повышали противоопухолевое действие (**4**, **6**). Само соединение F16 не проявило цитотоксического действия в исследуемых концентрациях, а эквимольная механическая смесь бетулиновой кислоты и F16 (1:1, моль/моль) не показала синергетического эффекта. Структура линкера незначительно влияла на цитотоксическую активность и селективность.

В продолжение работы проведено сравнительное исследование цитотоксичности соединения **16** (BA-F16), 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 доксорубин оказывал сравнимое с конъюгатом цитотоксическое действие на обе клеточные линии (**16**, $IC_{50} = 2.1 \mu M$; доксорубин, $IC_{50} = 0.6 \mu M$). Чтобы определить причину явно выраженной цитотоксичности, мы исследовали влияние бетулиновой кислоты и соединения **16** на пролиферацию раковых клеток MCF-7 и здоровых клеток фибробластов методом проточной цитометрии в концентрациях, приведенных на рисунке 3. Из диаграмм видно, что бетулиновая кислота не проявила антипролиферативного действия, в то время как инкубация клеток фибробластов и MCF-7 с конъюгатом **16** приводила к аресту клеточного цикла в фазе G0/G1 (Рисунок 3).

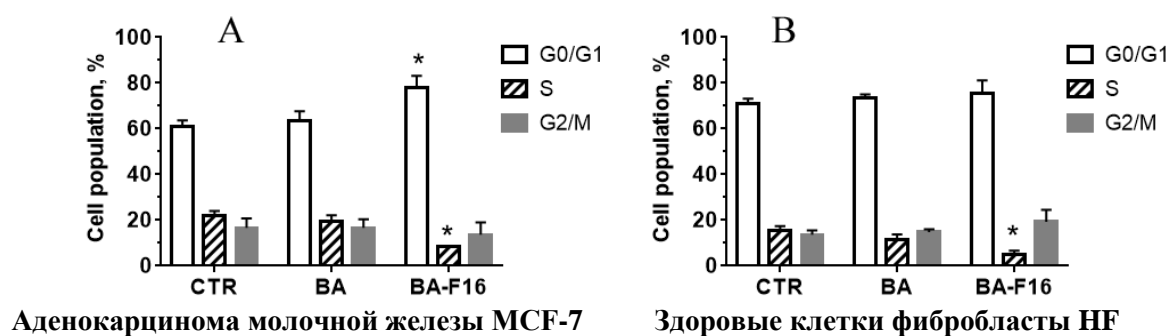


Рисунок 3 – Анализ клеточного цикла MCF-7 (A) и HF (B) после 24-часовой инкубации с бетулиновой кислотой (BA) (5 μM) и BA-F16 (1 μM), CTR (контроль) – не инкубированные клетки. Данные представляют собой среднее стандартное отклонение трех независимых экспериментов (* указывает на $p < 0.05$ по сравнению с контролем)

Таким образом, конъюгат **16** является цитостатиком и ингибирует пролиферацию клеток. Однако это гибридное соединение, показавшее ранее приемлемое терапевтическое окно при исследовании на лейкозных клеточных линиях, в данном случае не продемонстрировало селективности между раковыми клетками MCF-7 и фибробластами. Поэтому было необходимо проведение дальнейших исследований по модификации структуры конъюгатов для придания им селективных свойств и снижения цитотоксичности в отношении здоровых клеток.

2. Синтез и исследование цитотоксической активности конъюгатов полигидроксилированных тритерпеноидов лупановой, урсановой и олеановой структуры с катионным соединением 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 А тритерпенового ядра может оказать влияние на биологическую активность производных полигидроксилированных тритерпеноидов, по сравнению с их неоксигенированными аналогами (Рисунок 4).

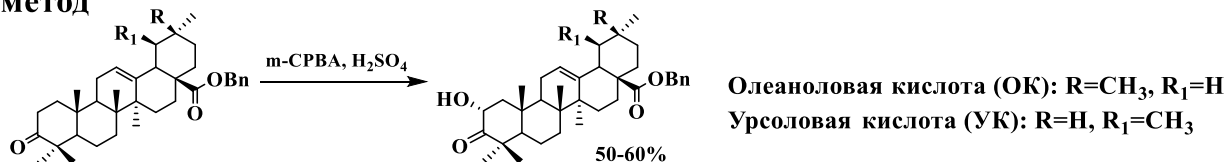


Рисунок 4 – Природные полигидроксилированные тритерпеновые кислоты

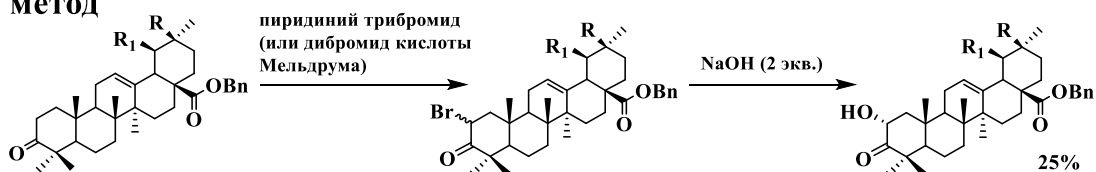
Молекулярная структура олеаноловой и маслиновой кислот или урсоловой и коросолевой кислот отличается наличием дополнительной гидроксильной группы в положении 2- α в маслиновой и коросолевой кислотах. В связи с этим, мы синтезировали новые F16-конъюгаты с маслиновой и коросолевой кислотами и исследовали 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 бензилового эфира урсоловой или олеаноновой 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

I метод

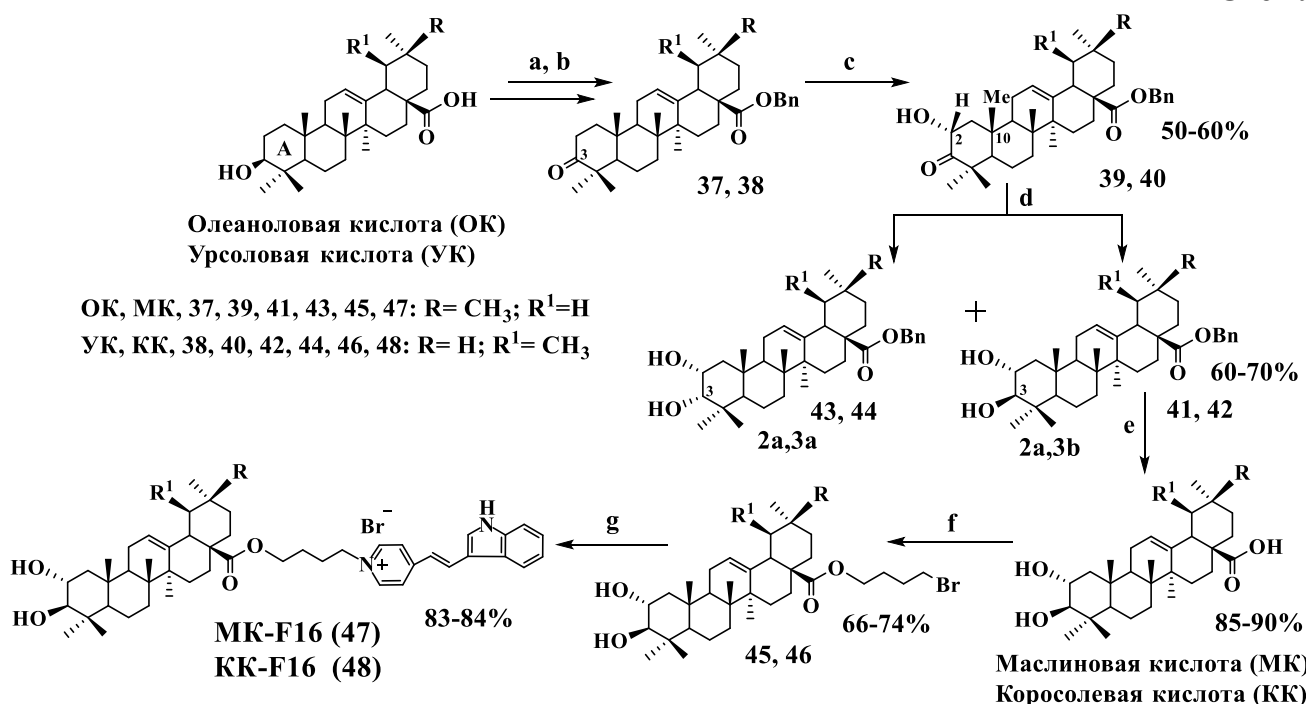


II метод



Выполненный нами по первому методу пятистадийный 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 *m*-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 стереоспецифичность электрофильной атаки *m*-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 NaBH₄ в 2 α -гидрокси-кетонах дало смесь диастереоизомерных 2,3-дигидроксилированных тритерпеноидов **41-44** с преимущественным образованием 3 β -эпимеров (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 NaBH₄ в присутствии соли лантанида (CeCl₃ · 7H₂O). Последующее хроматографическое разделение вицинальных диолов на колонке с SiO₂ 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 кислоты трансформировали в бромалкиловые эфиры **45** и **46** взаимодействием с избытком дибромбутана в присутствии поташа и конъюгировали с соединением F16 в ДМФА при 85 $^{\circ}$ C. В результате получили конъюгаты МК-F16 и КК-F16 **47** и **48** (Схема 7).

Схема 7

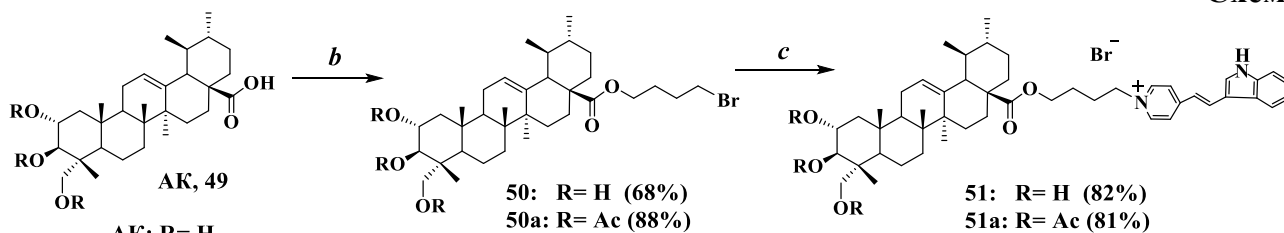


(a) BnCl, K₂CO₃, ДМФА, 55 $^{\circ}$ C, Ar, 2 ч.; (b) CrO₃, H₂SO₄, ацетон, 0 $^{\circ}$ C; (c) *m*-CPBA, H₂SO₄, MeOH–CH₂Cl₂, 0 $^{\circ}$ C, Ar; (d) NaBH₄ или NaBH₄ – CeCl₃ · 7H₂O, MeOH–ТГФ, -30 $^{\circ}$ C → 20 $^{\circ}$ C, Ar; (e) Pd/C/10%, H₂, MeOH–ТГФ, 20 $^{\circ}$ C; (f) 1,4-дибромбутан, K₂CO₃, CH₃CN, ДМФА, 50 $^{\circ}$ C, Ar; (g) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, 85 $^{\circ}$ C, Ar, 12 ч.

Конъюгаты F16–азиатиковая кислота **51** и **51a** получали из коммерчески доступной азиатиковой кислоты, которую трансформировали в ацетат **49** под действием AcCl в ТГФ в присутствии пиридина и 4-диметиламинопиридина (DMAP). Затем азиатиковую 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 °С с выходом 81-82% (Схема 8).

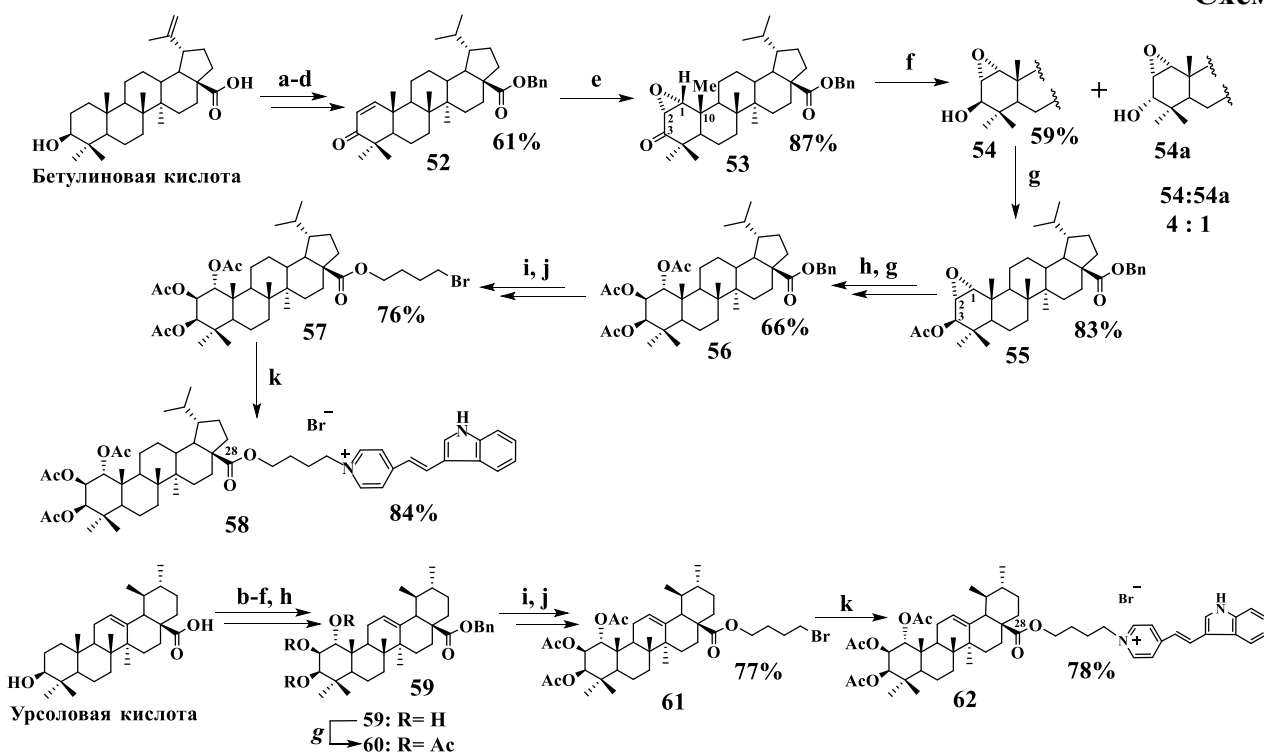
Схема 8



(a) AcCl, ТГФ, пиридин, DMAP, 20 °С, Ar; (b) 1,4-дибромбутан, K₂CO₃, CH₃CN, ДМФА, 50 °С, Ar, 2ч.; (c) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, 85 °С, Ar, 12 ч.

Нами также осуществлен синтез конъюгатов F16 с полигидроксилированными аналогами бетулиновой и урсоловой кислот (Схема 9).

Схема 9



(a) Pd-C/10%, H₂, MeOH-ТГФ, 20 °С, 12ч.; (b) CrO₃, H₂SO₄, ацетон, 0 °С; (c) BnCl, K₂CO₃, ДМФА, 55 °С, Ar, 2ч.; (d) PhSeCl, EtOAc, *m*-CPBA, пиридин, 20 °С, Ar; (e) 30% H₂O₂, 10% NaOH, MeOH, 20 °С; (f) NaBH₄, MeOH-ТГФ, 0 °С→20 °С, Ar; (g) AcCl, ТГФ, пиридин, DMAP, 20 °С, Ar; (h) HClO₄, H₂O, ацетон, 20 °С; (i) Pd-C/10%, H₂, MeOH-ТГФ, 20 °С, 2ч.; (j) 1,4-дибромбутан, K₂CO₃, CH₃CN, ДМФА, 50 °С, Ar, 2ч.; (k) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, 85 °С, Ar, 12ч.

Стереоселективный синтез ранее неизвестного 1 α ,2 β ,3 β -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**. Эпоксидирование двойной связи с использованием 30% H₂O₂ в щелочной среде привело к 1 α ,2 α -эпоксикетону **53** с высокой стереоспецифичностью 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-TГФ дало смесь диастереоизомеров **54** ($3\beta\text{-OH}$) и **54a** ($3\alpha\text{-OH}$), 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-(2-(1Н-индол-3-ил)винил)пиридином при $85\text{ }^\circ\text{C}$ в ДМФА. Аналогичным образом было получено гибридное соединение с F16 из урсоловой кислоты **62**.

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

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

Полученные конъюгаты F16 с маслиновой и коросолевой кислотами были исследованы *in vitro* на их цитотоксическую активность на четырех опухолевых линиях карциномы рака легких человека, карциномы молочной железы и на здоровых клетках человеческих фибробластов (HF). Чтобы оценить эффект гидроксильной группы в положении С-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	
25	0.93 ± 0.07	0.74 ± 0.09	1.52 ± 0.16	4.34 ± 0.28	2.05 ± 0.58
47	10.50 ± 2.44	13.52 ± 2.02	7.44 ± 0.78	11.05 ± 2.51	9.30 ± 2.56

Продолжение таблицы 2

21	2.80 ± 0.25	2.40 ± 0.30	1.36 ± 0.74	5.18 ± 0.15	4.98 ± 0.9
48	4.01 ± 1.69	1.87 ± 0.14	1.89 ± 0.27	6.70 ± 0.35	1.15 ± 0.38
OK	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 **25** превзошел по противоопухолевой активности исходную природную олеаноловую кислоту в отношении исследуемых раковых клеток максимально в 318 раз. Цитотоксичность конъюгата коросолевой кислоты **48** 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 **25** и **21**, 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 **21** показал наибольшую разницу в индексе селективности между опухолевыми клетками и фибробластами в диапазоне от 2 до 4. В результате, конъюгаты **25**, как наиболее цитотоксичный, и **21**, как наиболее селективный, были рекомендованы нами для дальнейших исследований.

3. Анализ внутриклеточного распределения F16-конъюгатов тритерпеновых кислот в сравнении с их структурными трифенилфосфониевыми аналогами

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).

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-дифтородипирометена (BODIPY), в молекулу конъюгата бетулиновой кислоты с трифенилфосфониевым катионом.

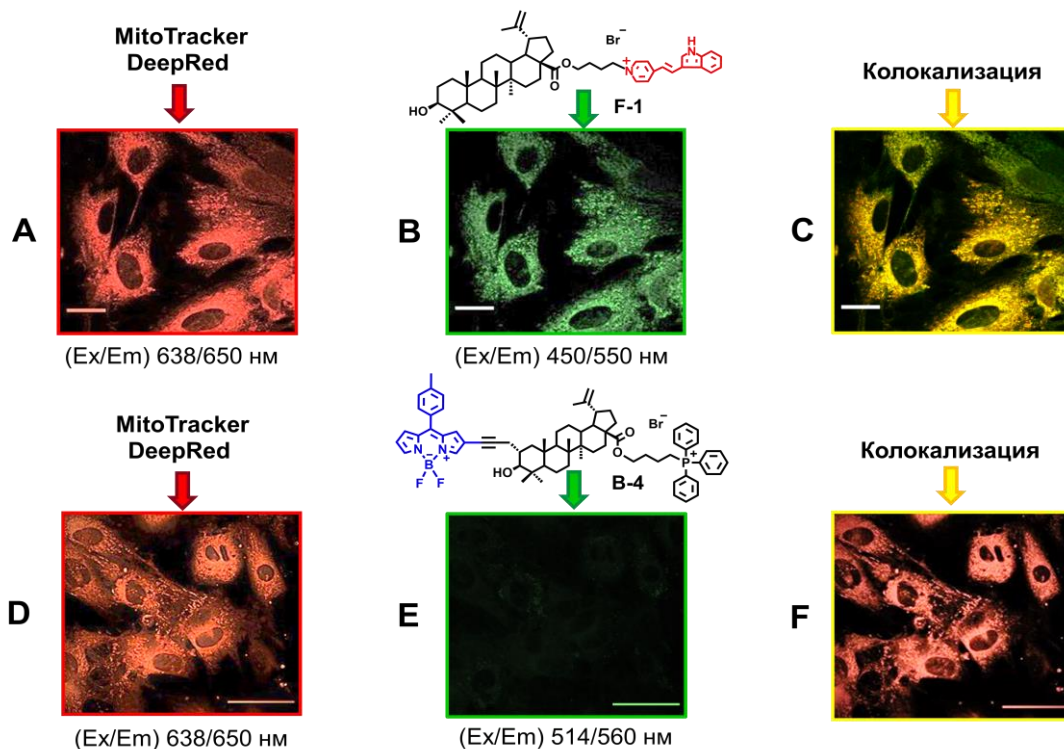
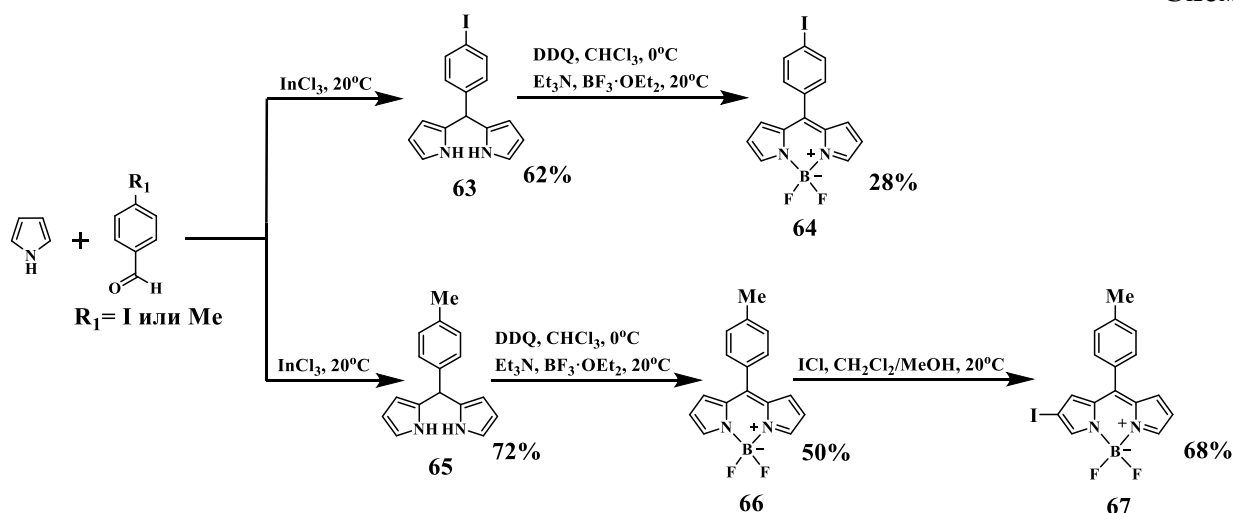


Рисунок 5 – Внутриклеточная локализация F16- и TPP⁺-производных тритерпеноидов в митохондриях эндотелиальных клеток мышцы показана на примере конъюгатов **15** (F-1) и **72** (B-4)

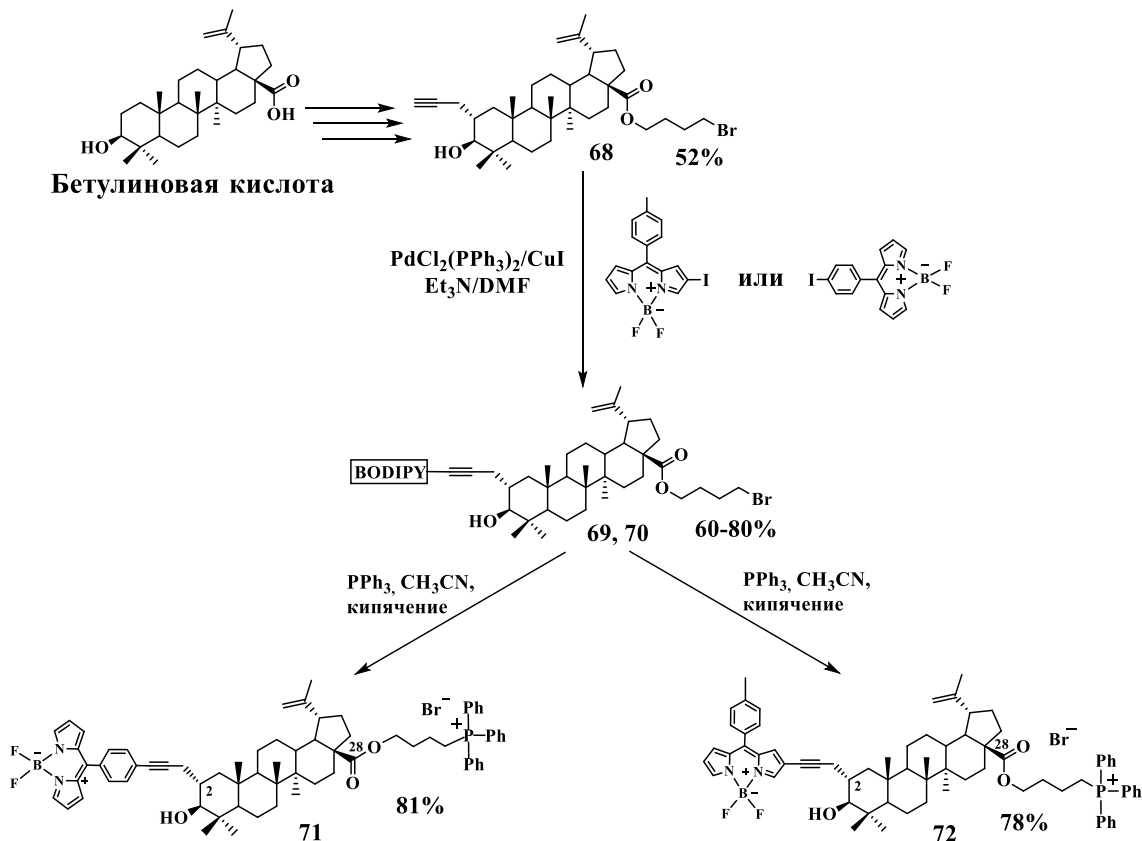
В качестве ключевой стадии синтеза была использована реакция кросс-сочетания между С-2-пропинильным производным бетулиновой кислоты **68** и галоидными производными флуоресцентного красителя, содержащего йодную функцию при С-2 или С-8 позициях BODIPY-платформы **67** или **64**. Разработанная нами процедура ковалентного связывания флуорофора BODIPY с тритерпеновым ядром бетулиновой кислоты 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-дипиррометены **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 SiO_2 целевой моно-йодид **67** (Схема 10).



Тритерпеновый компонент в реакции Соногашира, С-2 пропилильное производное бромалкилового эфира бетулиновой кислоты **68**, получали в несколько 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** (**B-3** и **B-4** соответственно) (Схема 11).

Схема 11



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 митохондриально-направленных цитотоксических катионных производных природных тритерпеновых кислот в качестве потенциальных кандидатов в лекарственные препараты. 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.

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 C-2, C-3, C-28 и C-30 позициях тритерпенового ядра использованы классические реакции этерификации кислот в щелочных условиях, этерификация по Стеглиху или реакция кросс-сочетания по Соногашира арилгалогенидов с терминальными алкинами тритерпеновой структуры.

2. Разработан стереоселективный синтез не описанного ранее оксигенированного аналога бетулиновой кислоты и его конъюгата с F16, содержащих $1\alpha,2\beta,3\beta$ -полигидроксилированное кольцо А. Синтез нового тритерпеноида лупановой структуры основан на стереоселективном эпоксидировании двойной связи в 1,2-еноновом фрагменте кольца А промежуточно полученного бензилбетулоната под действием H_2O_2 в щелочной среде и на стереоселективном кислотном раскрытии эпоксидного кольца под действием $HClO_4$.

3. На основе доступных урсоловой и олеаноловой кислот реализован многостадийный стереоселективный синтез маслиновой и коросолевой кислот. Полученные оксигенированные тритерпеноиды успешно вовлечены в конъюгацию с (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридином с получением новых гибридных катионных соединений тритерпеновой структуры.

4. Исследован цитотоксический потенциал синтезированных соединений в отношении линий опухолевых клеток человека различного происхождения (опухолевые линии лейкозных клеток, карциномы и здоровые 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.

5. 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 C-30 позиции или увеличение количества гидроксильных групп в кольце А тритерпеновых кислот не дало положительного заметного изменения цитотоксической активности.

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

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

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

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. – DOI 10.3390/ecsoc-24-08102 // Chemistry Proceedings. – 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. – DOI 10.1007/s00044-021-02702-z // 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. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.036 // 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. – DOI 10.3390/membranes11050352 // 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. – DOI 10.3390/ecsoc-25-11638 // Chemistry Proceedings. – 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. – DOI 10.1007/s10600-022-03869-6 // Chemistry of Natural Compounds. – 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. – DOI 10.3390/biomedicines10112903 // 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. – DOI 10.3390/membranes13060563 // 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. – DOI 10.1007/s10600-023-04137-x // Chemistry of Natural Compounds. – 2023. – V. 59, № 5. – P. 865-871.
10. Патент РФ. № 2786134. Конъюгаты тритерпеновых кислот и (E)-4-(1H-индол-3-илвинил)-пиридиний бромида с противоопухолевой активностью / А.Ю. Спивак, Д.А. Недопёкина, **Э.В. Давлетшин**, Л.У. Джемилева, В.А. Дьяконов, У.М. Джемилев // Заявл. 18.02.2020, опубл. 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 С-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.

19. **Давлетшин Э.В.** Конъюгация тритерпеновых кислот лупановой, урсановой и олеановой структуры с митохондриально-направленным катионным соединением F16 усиливает цитотоксическую активность против опухолевых клеток / **Э.В. Давлетшин**, Д.А. Недопёкина, А.Ю. Спивак // I Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты»: тезисы докладов. – Казань, 2023. – С. 68.