

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**

1.4.3. Органическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
Спивак Анна Юльевна

Уфа – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. КОНЬЮГАТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ЛИПОФИЛЬНЫМИ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫМИ КАТИОННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ДЛЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МИТОХОНДРИИ РАКОВЫХ КЛЕТОК	13
1.1 Средства избирательной доставки лекарств в митохондрии	15
1.2 Антиоксиданты и нацеливание на митохондрии.....	18
1.3 Митоканы.....	23
1.3.1 Митоканы на основе конъюгатов традиционных лекарств с ТРР	24
1.3.2 Митоканы на основе конъюгатов природных биологически активных веществ с ТРР	29
1.3.3 Митоканы на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с ТРР	33
1.3.4 Митоканы на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с родамином..	38
ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	44
2.1 Синтез и исследование цитотоксической активности новых конъюгатов лупановых, олеановых и урсановых структур с катионным фрагментом F16....	44
2.2 Синтез и исследование цитотоксической активности конъюгатов полигидроксилированных тритерпеноидов с катионным фрагментом F16	57
2.3 Сравнительный анализ внутриклеточного распределения F16-конъюгатов тритерпеновых кислот и их структурных трифенилфосфониевых аналогов	71
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	79
3.1 Синтез и исследование цитотоксической активности конъюгатов тритерпеноидов лупанового, олеанового и урсанового ряда с катионным соединением F16	81
3.2 Синтез конъюгатов полигидроксилированных тритерпеноидов лупановой, урсановой и олеановой структуры с катионным соединением F16	99

3.3 Синтез флуоресцентно-меченых конъюгатов бетулиновой кислоты с трифенилфосфониевым катионом.....	110
3.4 Биологические исследования конъюгатов «тритерпеноид-F16».....	118
Заключение	122
Выводы	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128
Приложение А	150

ВВЕДЕНИЕ

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 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. 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 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:

1. Осуществить синтез конъюгатов тритерпеновых кислот лупанового, урсанового и олеанового ряда с катионным фрагментом F16, связанным алкил/алкоксиалкил линкерами в различных положениях молекулы тритерпеноидов;
2. 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;
3. 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;
4. 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 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, 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 исследование их цитотоксической активности.
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); I Междисциплинарной всероссийской молодежной научной школе-конференции с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (г. Казань, 2023).

Личный вклад автора. Цели и задачи исследования были определены 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, трех глав 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.

Благодарность. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.х.н. с.н.с. Спивак Анне Юльевне за помощь при выборе направления, постановке цели и задач, интерпретации полученных результатов, за поддержку на всех этапах научной работы и при подготовке диссертации. Также автор благодарен коллегам Недопёкиной Дарье Александровне и Губайдуллину Ринату Равильевичу за конструктивную критику в ходе выполнения задач и неоценимую помощь в получении новых экспериментальных навыков. Автор

благодарен всему коллективу лаборатории органического синтеза ИНК УФИЦ РАН за плодотворное сотрудничество и поддержку.

Автор выражает огромную благодарность д.б.н., профессору Белослудцеву К.Н. и к.б.н., доценту Дубинину М.В. за выполнение биологических исследований на всём протяжении выполнения диссертационного исследования (Марийский государственный университет, г. Йошкар-Ола, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино).

Автор выражает благодарность заведующему лабораторией структурной химии д.х.н., профессору Халилову Л.М., а также сотрудникам группы ЯМР: к.х.н., н.с. Тулябаеву А.Р. и ст. лаборанту Мозговому О.С. за запись спектров ЯМР; м.н.с. масс-спектрометрии Яныбину В.М. за запись масс-спектров высокого разрешения. Автор выражает благодарность к.ф.-м.н., с.н.с. Тухбатуллину А.А. за проведение фотофизических исследований.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.
КОНЬЮГАТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С
ЛИПОФИЛЬНЫМИ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫМИ
КАТИОННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ДЛЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МИТОХОНДРИИ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Введение

Несмотря на огромные усилия, вкладываемые в течение последних нескольких десятилетий в лечение онкологических заболеваний, онкология по-прежнему остается одной из главных угроз для здоровья человечества и второй по значимости причиной смерти после сердечно-сосудистых болезней [1]. Трансформация здоровых клеток в злокачественную форму включает множественные генетические изменения или мутации, ведущие к гиперпролиферации, устойчивости к апоптозу и уклонению от защитной реакции иммунной системы хозяина. В современной фармакотерапии онкологических заболеваний используется широкий спектр противоопухолевых препаратов, включая природные соединения растительного происхождения (винкаалкалоиды, таксаны, подофиллотоксины, каптотецины), действие которых направлено на повреждение генома или аппарата деления опухолевых клеток (интеркаляция и репарация ДНК, микротубулярные разрушения). Однако эти 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 гетерогенностью и мутацией генетического аппарата клетки [2]. Даже опухоли одного и того же типа, возникшие у отдельных пациентов, могут отличаться рядом мутаций. Следовательно, маловероятно, что опухоли будут

эффективно лечиться агентами, нацеленными на один ген или на один путь передачи сигнала. В связи с этим в последнее время активно изучаются вопросы создания инновационных противоопухолевых лекарств, действующих на органеллы, среди которых наиболее изученными и имеющими огромное значение для выживания клеток являются митохондрии [3].

Митохондрии присутствуют в большинстве эукариотических клеток и составляют приблизительно 40% цитоплазмы. Эти органеллы играют ключевую роль во многих метаболических процессах, таких как цикл Кребса, цикл мочевины и окисление жирных кислот. Основная функция митохондрий, обеспечивающих клетки 80% энергии, заключается в синтезе АТФ. Митохондрии также являются основным местом производства внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), включая, прежде всего супероксид анион, перекись водорода, гидроксильный радикал и синглетный кислород. АФК в низких концентрациях обладают полезными физиологическими свойствами, представляя собой важный молекулярный компонент системы внутриклеточной и межклеточной регуляции. С другой стороны, высокие концентрации в клетках этих свободных радикалов вызывают значительное окислительное повреждение белков, липидов и ДНК, что приводит к развитию таких заболеваний, как рак, диабет, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные расстройства и старение [4, 5, 6]. Еще одна особенность митохондрий состоит в их способности контролировать запрограммированную гибель клеток (апоптоз), регулируя перенос проапоптотических белков из митохондриального промежуточного пространства в цитозоль. Апоптоз запускается серией митохондриальных событий, включая коллапс митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), набухание мембран митохондрий и открытие поры проницаемости внутренней мембраны митохондрий (mPTP) [7]. Поскольку митохондрии играют значительную роль в выживании и гибели клеток и митохондриальные дисфункции тесно связаны с онкогенезом, ведется активный поиск противоопухолевых лекарств, нацеленных на митохондрии. Разрабатываются стратегии доставки цитотоксических соединений в митохондрии, которые в основном заключаются в прямой

конъюгации терапевтической молекулы с митохондриально-направленным «вектором доставки» или в присоединении митохондриально-направленного фрагмента к наноносителю.

1.1 Средства избирательной доставки лекарств в митохондрии

Митохондриально-нацеленные агенты представляют собой соединения со специфическими физико-химическими свойствами и реакционной способностью. Это могут быть небольшие липофильные и положительно заряженные молекулы, пептидные носители или комплексы металлов, таких как рутений или иридий [8]. Хотя такие молекулы разнообразны по своей структуре, все они имеют одинаковую характеристику высокого сродства к митохондриям. Липофильные катионные молекулы с малым молекулярным весом легко проникают в митохондрии за счет бóльшей величины митохондриального трансмембранного потенциала по сравнению с мембранным потенциалом клеточной мембраны ($\Delta\Psi_{\text{mito}} = 150-180 \text{ mV}$, $\Delta\Psi_{\text{plasma}} = 30-60 \text{ mV}$) [9, 10]. Облегченный трансмембранный перенос таких катионных соединений объясняется большой гидрофобной поверхностью и большим ионным радиусом катиона. Зависимость прохождения липофильных катионов от $\Delta\Psi_m$ мембран митохондрий адекватно описывается уравнением Нернста, из которого следует, что увеличение $\Delta\Psi_m$ на 60 mV приводит к 100-1000 кратному увеличению (к увеличению на порядок) митохондриальной аккумуляции веществ (Рисунок 1) [11]. Выявленные различия функциональных особенностей митохондрий также показали, что различие для $\Delta\Psi_m$ в 60 mV между клетками разных солидных новообразований и нормальными клетками может привести к многократному увеличению селективной направленности катионного соединения в митохондрии раковых клеток по сравнению с нормальными клетками [9, 12-15]. Однако необходимо отметить, что для достижения такой селективности требуется тщательный подбор молекулярной структуры фармакофора, типа катионного соединения, линкера и концентрации терапевтического средства.

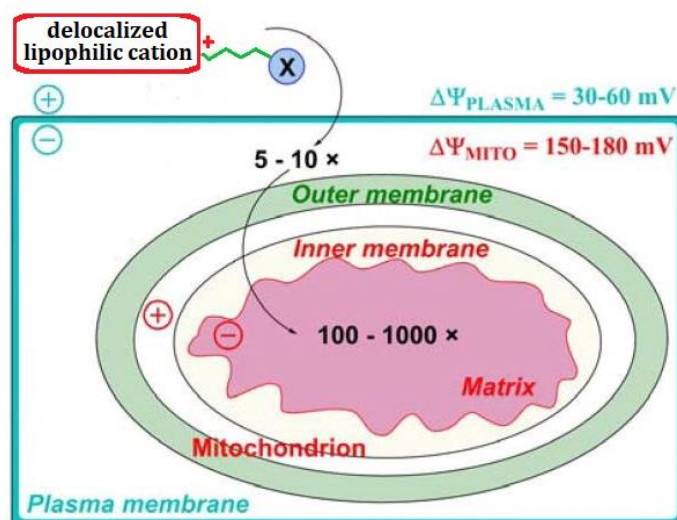


Рисунок 1 – Поглощение клетками делокализованного липофильного катионного соединения, обусловленное потенциалами клеточной и митохондриальной мембран

Первый митохондриально-направленный агент, катион метилтрифенилфосфония (МТРР), был разработан Либерманом и Скулачевым в 1969 г. Это соединение избирательно накапливалось в митохондриях клеток млекопитающих в ответ на более высокие мембранные потенциалы [5, 16, 17]. Позднее алкилированные катионы ТРР были использованы в качестве митохондриальных зондов для изучения взаимосвязи между митохондриальным мембранным потенциалом и окислительным фосфорилированием и для измерения митохондриального мембранного потенциала [5]. Murphy и Скулачев переработали и усовершенствовали использование биоактивных молекул, конъюгированных с ТРР, в митохондриальной биологии путем избирательной доставки лекарств в митохондрии в результате ковалентного связывания молекул лекарства с ТРР или с родамином через алкильные цепи или другие линкеры [18, 19]. Среди известных липофильных делокализованных катионов, нацеленных на митохондрии, можно назвать катион трифенилфосфония (ТРР), родамины, родацианин МКТ-077, соль деквалиния (DQA), полигетероциклическое катионное соединение F16, соли гуанидиния и проникающие в митохондрии катионные пептиды [20-29]. Липофильные митохондриально-тропные соединения показывают разные механизмы митохондриальной токсичности. Например,

хлорид деквалиния (DQA), состоящий из двух хинолиновых фрагментов, связанных 10-углеродной алкильной цепью, ингибирует НАДН-убихинон-редуктазу дыхательного комплекса митохондрий [14, 20], способствуя гиперпродукции АФК, а также индукции МРТ-поры [21]. Это соединение может ингибировать пролиферацию различных раковых клеточных линий *in vitro*, а также проявляет противоопухолевую активность *in vivo* [20, 22]. Молекулы DQA, представляют собой везикулоподобные агрегаты (DQAсомы) с размерами в диапазоне 70-700 нм в диаметре. Что еще более важно, DQAсомы обладают свойством накопления в митохондриях после проникновения в липидный бислой и, следовательно, они могут быть эффективными митохондриально-направленными наноносителями. Родамин 123 нарушает биоэнергетические функции митохондрий, ингибируя АТФ синтазу [23]. Соединение F16 индуцирует апоптоз клеток, обусловленный открытием кальций-зависимой МРТ-поры [24]. Эта гетероциклическая катионная молекула получила свое название в работах Fantin с коллегами, которые обнаружили, что F16 значительно ингибирует пролиферацию различных клеточных линий опухоли молочной железы мыши и опухоли молочной железы человека [25]. Молекула F16, нацеленная на митохондрии опухолевых клеток, вызывает их апоптоз и некроз даже в присутствии гиперэкспрессирующих антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Наиболее благоприятный фармакологический и токсикологический профиль из выше перечисленных липофильных катионных соединений показал родацианиновый аналог MKT-077, известный также как FJ-776. Это соединение вызывало общую дестабилизацию митохондриальной мембраны и приводило к неспецифичному ингибированию мембрано-связанных ферментов [26, 27]. Доклинические исследования митохондриальной токсичности MKT-077 в отношении митохондрий клеточной линии карциномы толстой кишки человека и митохондрий нормальных эндотелиальных клеток показали его приемлемый терапевтический индекс. Однако клинические испытания MKT-077 были остановлены уже в первой фазе клинической триады из-за рецидивирующей почечной токсичности этого соединения (Рисунок 2) [28, 29].

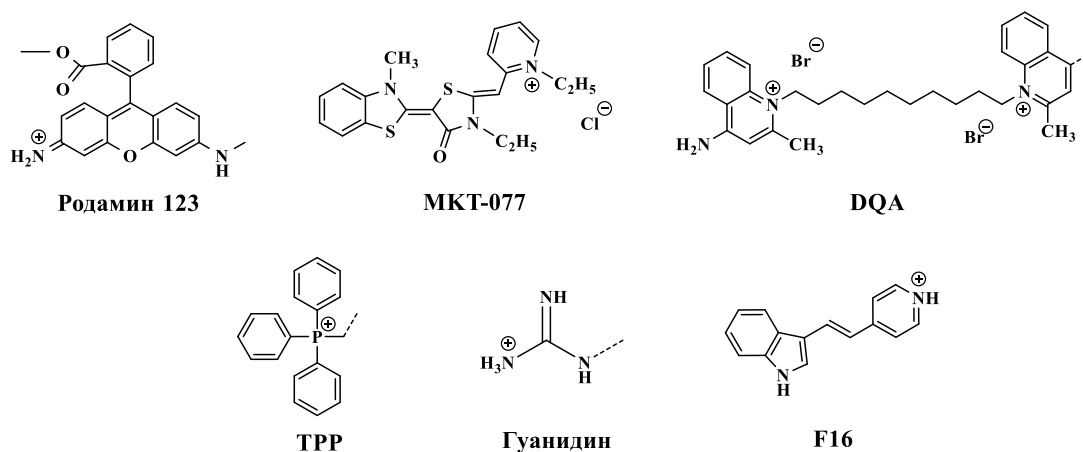


Рисунок 2 – Известные делокализованные митохондриально-нацеленные катионы

Среди известных липофильных делокализованных катионных соединений, катион трифенилфосфония является наиболее широко используемым липофильным лигандом, нацеленным на митохондрии. Его молекула состоит из положительно заряженного иона фосфора, связанного с тремя гидрофобными бензольными кольцами, которые делают соединение хорошо растворимым в липидах. Многие конъюгаты на основе TRP проявляют стабильность в биологических системах, легко синтезируются и имеют низкую химическую активность по отношению к клеточным компонентам. Эти конъюгаты не поглощают свет и не излучают флуоресценцию в видимой и инфракрасной областях спектра. Катионы TRP проявляют цитотоксичность только при очень высоких концентрациях. Это означает, что появление цитотоксичности в соединениях на основе TRP может быть связано с переносимыми лекарствами, а не с самим TRP. В настоящее время известные TRP-производные убихинона и пластохинона MitoQ и SkQ1 в испытаниях на животных не показали системной токсичности при использовании в фармакологически значимых дозах и в настоящее время проходят клинические испытания [30, 31].

1.2 Антиоксиданты и нацеливание на митохондрии

К антиоксидантам в химии относят вещества, способные обрывать разветвленное цепное окисление. Однако в биомедицине термин «антиоксидант»

не имеет четкого определения и может относиться к большому ряду соединений с широким диапазоном механизма действия [32]. Механизмы действия антиоксидантов лучше всего можно понять в контексте их химического и биохимического воздействия на АФК. Так, некоторые антиоксиданты могут нейтрализовать АФК путем окислительно-восстановительных реакций, прерыванием цепных реакций свободных радикалов или выделением ионов водорода для разрушения пероксида, образующегося при окислении. Некоторые антиоксиданты представляют собой хелатирующие агенты ионов металлов, которые могут снижать способность ионов металлов инициировать окисление. Известны антиоксиданты, например, ресвератрол или флавоноиды, для которых прямая антиоксидантная активность имеет второстепенное физиологическое значение. Этот класс природных веществ обеспечивает превентивную защиту от АФК путем индукции эндогенных антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза и каталаза [32]. Основная функция антиоксидантов заключается в снижении АФК в митохондриях. Однако широко известные природные антиоксиданты (аскорбиновая кислота, витамин Е, убихинон-10, ресвератрол) или синтетические антиоксиданты (2,6-дитретбутил-4-метилфенол, известный как ионол или ВНТ) обычно не дают удовлетворительных результатов в биомедицинских испытаниях на животных, возможно, потому что им трудно проникнуть в митохондрии, являющиеся основным местом продукции АФК, или достичь других участков окислительного стресса. В настоящее время большие надежды возлагаются на антиоксиданты, нацеленные на митохондрии в основном за счет липофильных катионов или низкомолекулярных пептидов. В дизайне таких митохондриально-направленных антиоксидантов в основном используется липофильный катион трифенилфосфония [33-35].

Первыми митохондриально-направленными антиоксидантами, связанными с ТРР, были производные убихинона и пластохинона, синтезированные и исследованные в работах Murphy и Скулачева (Рисунок 3) [36-40].

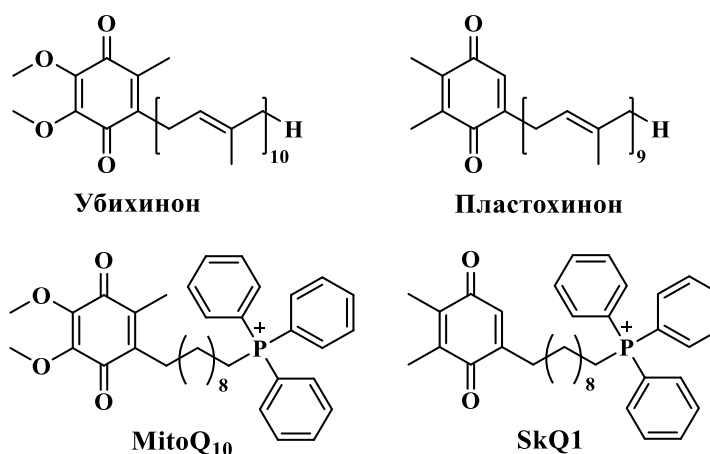


Рисунок 3 – Молекулярные структуры убихинона, пластохинона и их конъюгатов с TPP (MitoQ₁₀ и SkQ1)

Убихинон, также известный как коэнзим Q10, является компонентом митохондриальной дыхательной цепи и расположен в липидном слое внутренней митохондриальной мембраны, где он принимает два электрона от комплексов I или II, восстанавливаясь до убихинола, который затем отдает электроны комплексу III [36]. Пластохинон, который также представляет собой функциональный аналог коэнзима Q10, расположен в пластидах и хлоропластах. Короткая и эффективная схема синтеза этих соединений основана на стадии алкилирования хинонов пероксидами бромалкановых кислот (Схема 1). Так SkQ1 был получен взаимодействием 2,3-диметил-1,4-бензохинона **1** с 11-бромундекановой кислотой в присутствии нитрата серебра и персульфата аммония с последующим вовлечением промежуточного продукта **2** в реакцию с трифенилфосфином в бензоле или спирте [37]. В исследованиях на клеточных культурах MitoQ и SkQ1 предотвращали перекисное окисление липидов и защищали митохондрии от окислительного повреждения. После детоксикации АФК, убихиноловая часть в этих соединениях регенерировалась митохондриальной дыхательной цепью, что позволяло рециркулировать их антиоксидантную активность. На сегодняшний день на основе SkQ1 разработано лекарство для глаз Визомитин и мазь – средство от ран и ожогов [41].

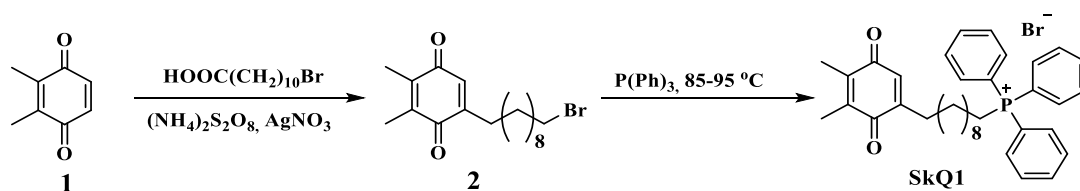


Схема 1 – Метод синтеза катионного производного SkQ1

Соединение MitoQ проходит стадии клинических испытаний в качестве лекарства для лечения гепатита С, синдрома ишемии – реперфузии и болезни Паркинсона. Однако использовать MitoQ и SkQ1 в качестве антиоксидантов следует с осторожностью. В зависимости от времени и дозы эти соединения могут играть роль прооксидантов и проапоптотических агентов, поскольку их хиноновое ядро может участвовать в окислительно-восстановительном митохондриальном цикле и в продукции супероксида [42].

Другие типы антиоксидантов, связанных с ТРР, основаны на витаминах, митохондриально-направленных спиновых ловушках, содержащих в своей структуре нитроксильные радикалы или имитаторах митохондриально-направленных ферментов, таких как пероксидаза и супероксиддисмутаза (Рисунок 4) [34, 43-52].

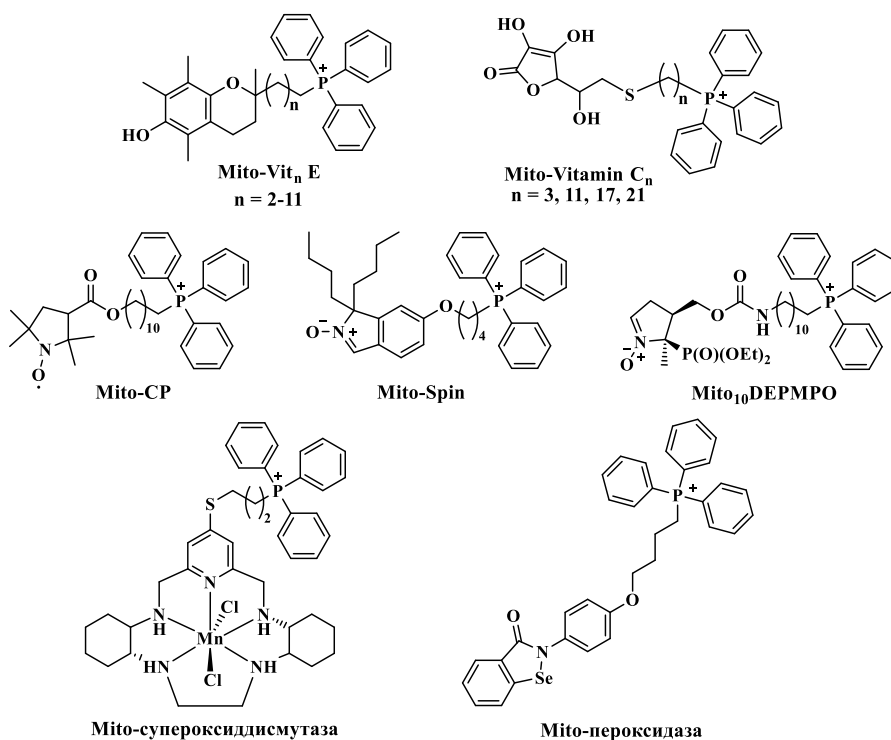


Рисунок 4 – Молекулярные структуры митохондриально-направленных антиоксидантов

Среди митохондриально-направленных витаминов, наиболее хорошо изучены TPP-производные витамина С и витамина Е: MitoVitC и MitoVit10 E. Впервые MitoVit E, в котором редокс-активное хромановое ядро витамина Е было связано с катионом трифенилфосфония С-2 алкановым линкером описан в работе [44]. Позднее был синтезирован ряд аналогов α -токоферола с алкильными линкерами длиной от 2 до 11 атомов углерода. В испытаниях на изолированных митохондриях печени крыс и в испытаниях *in vivo* на животных MitoVit2 E и MitoVit10 E оказывали защитное действие на липиды мембран при перекисном окислении, и их эффекты были выражены значительно сильнее в сравнении с токоферолом [45]. Синтез и антиоксидантная активность митохондриально-нацеленного производного аскоробата (MitoC) описаны в работе, в которой для связывания TPP функции с фрагментом аскоробата авторы использовали алкановый линкер и атом серы [43]. Синтез аддуктов **8a-d** основан на взаимодействии 6-бром-6-деокси-L-аскорбиновой кислоты **7** с TPP-алкилтиолами **6a-d**, предварительно полученными взаимодействием соответствующих алкенбромидов **3a-d** с тиоацетатом в присутствии азобисизобутилнитрила (AIBN), с последующим вовлечением промежуточных продуктов **4a-d** в реакцию с трифенилфосфином с образованием трифенилфосфониевых солей **5a-d** (Схема 2). В испытаниях на изолированных митохондриях печени крыс MitoC проявил себя как эффективный митохондриально-нацеленный антиоксидант, который накапливался в митохондриях и регенерировался системами глутатиона и тиоредоксина.

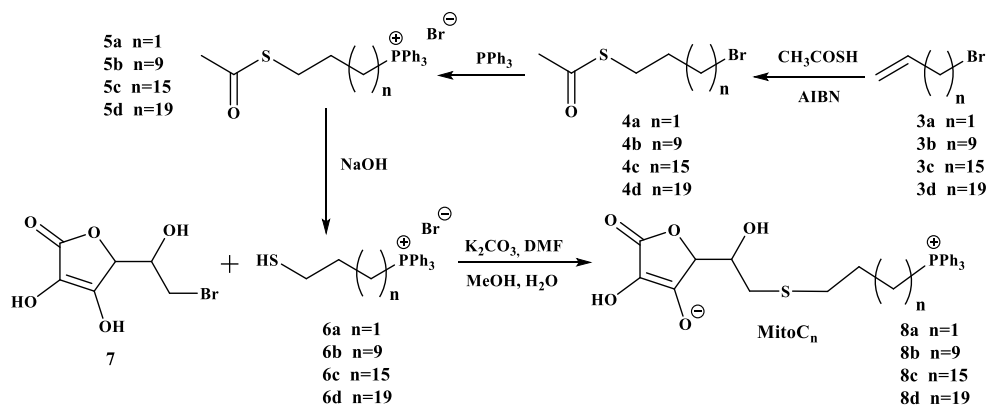


Схема 2 – Синтез митохондриально-нацеленного производного аскоробата (MitoC)

Таким образом, полученные на сегодняшний день результаты исследования в значительной степени показывают хорошие перспективы использования митохондриально-направленных антиоксидантов как молекул, способных противостоять пагубному воздействию свободных радикалов на жизнедеятельность клеток. Эти молекулы предотвращают или, по крайней мере, задерживают окисление путем ингибирования окислителей или прерывания процесса вредного окисления, превращая свободные радикалы в нереакционноспособные соединения. Mito-антиоксиданты оказывают значительное влияние на митохондриальный гомеостаз и поэтому могут иметь решающее значение в лечении широко распространенных патологий, связанных с окислительным стрессом. В то же время многие антиоксиданты, например, полифенолы, наряду с защитой нормальных клеток, могут быть триггерами апоптотической или некротической смерти злокачественных клеток, действуя как цитотоксические и прооксидантные соединения [53].

1.3 Митоканы

Митохондрии являются центральным местом производства клеточной энергии и играют важную роль в выживании и гибели клеток. Более того, большое количество исследований показало тесную связь между митохондриальным метаболизмом и онкогенезом, что делает митохондрии многообещающей новой мишенью для терапии рака [54-58]. В результате активного поиска нацеленных на митохондрии лекарств и разработки стратегий доставки молекул лекарств в митохондрии, в литературе появился ряд новых терминов, одним из которых является термин «митокан» (акроним слов mitochondria и cancer). Митоканы – это термин, предложенный Ralph и Neuzil в 2006 г. для описания препаратов, которые могут избирательно воздействовать на митохондрии злокачественно трансформированных клеток, подавляя развитие рака [54, 59]. Была предложена следующая классификация митоканов в зависимости от их механизма воздействия на митохондрии раковых клеток: ингибиторы гексокиназы, ингибиторы семейства белков Bcl-2, тиоловые

ингибиторы окислительно-восстановительного потенциала, регуляторы потенциал-зависимых ионных каналов, липофильные катионы, нацеленные на внутреннюю мембрану митохондрий, агенты, нацеленные на цикл трикарбоновых кислот или на электронную окислительно-восстановительную цепь, агенты, нацеленные на митохондриальную ДНК [60].

1.3.1 Митоканы на основе конъюгатов традиционных лекарств с ТРР

Несколько широко используемых цитотоксических препаратов, таких как цисплатин, доксорубин, хлорамбуцил, тамоксифен, метформин и артемизинин были конъюгированы с ТРР [61]. В работе [62] хлорамбуцил и липофильное катионное соединение F16 были ковалентно связаны в конъюгат **14**, который проявил себя как мультимитохондриальный противораковый агент. Конъюгация хлорамбуцила и производного F16 была реализована под действием NATU (азобензотриазол тетраметилурония гексафторфосфат) и DIEA (диизопропилэтиламин) в ДМФА. Синтез соединения **13** был выполнен в 4 стадии, которые включали взаимодействие метилпиридина **9** и 3-бромпропиламина с получением пиридиновой соли **10**, Вос-защиту первичной NH₂-функции, конденсацию пиридиновой соли **11** с индолкарбальдегидом и удаление защиты в полученном аддукте **12** (Схема 3). Синтезированная гибридная молекула была также связана с человеческим сывороточным альбумином с образованием нанопрепарата, который избирательно воздействовал на раковые, но не на нормальные клетки. Результаты исследования конъюгата на раковой клеточной линии HeLa методом проточной цитометрии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показали, что соединение избирательно накапливалось в основном в митохондриях раковых, но не нормальных клеток. Его аккумуляция в митохондриях раковых клеток приводила к деполяризации потенциала митохондриальной мембраны, увеличению количества АФК и разрушению митохондриальной ДНК (мтДНК). Благодаря синергетическому действию на несколько митохондриальных компонентов, конъюгат, включая его

наноформу, эффективно убивал раковые клетки и преодолевал множественную лекарственную устойчивость.

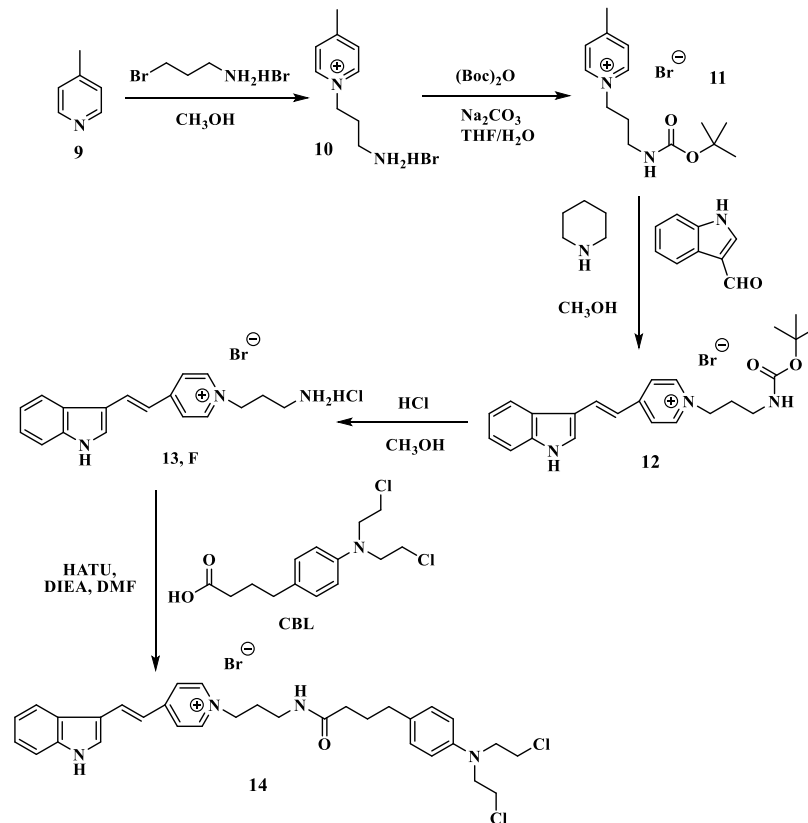


Схема 3 – Синтез митохондриально-нацеленного конъюгата хлорамбуцила с аналогом F16 (**14**)

Конъюгация хлорамбуцила с TRP также привела к усилению противоопухолевого действия лекарственного средства (Рисунок 5) [63]. На панели линий клеток карциномы молочной железы и поджелудочной железы, резистентных к исходному препарату, полученный Mito-хлорамбуцил воздействовал на мтДНК, останавливая клеточный цикл и вызывая усиленную гибель клеток. На модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека Mito-хлорамбуцил вызывал более значительную задержку опухоли по сравнению с хлорамбуцилом.

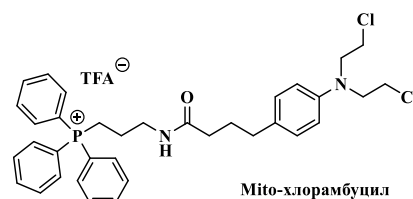


Рисунок 5 – Молекулярная структура конъюгата хлорамбуцила с трифенилфосфониевым катионом

Проведено сравнительное исследование цитотоксичности и внутриклеточного распределения доксорубина (DOX) и его конъюгата с катионом трифенилфосфония на клетках карциномы молочной железы MDA-MB-435/WT и DOX-резистентных клетках MDA-MB-435/DOX. Трифенилфосфониевое производное DOX было получено карбодимидным методом с использованием трифенилфосфониевой соли бромбутановой кислоты и *N*-гидроксисукцинимида в качестве активатора (Схема 4) [64]. В обеих клеточных линиях наблюдалась высокая цитотоксичность TPP-DOX, которая сопровождалась повышенным уровнем расщепленной каспазы 3 и PARP, указывающим на усиленный апоптоз. Клеточное поглощение DOX оказалось значительно выше в клетках MDA-MB-435/WT, чем в резистентных клетках MDA-MB-435/DOX. Доксорубин был способен проникать в ядро клеток MDA-MB-435/WT, но в клетках MDA-MB-435/DOX его присутствие было ограничено цитоплазмой. С другой стороны, TPP-DOX был локализован в цитоплазме обоих фенотипов клеток и демонстрировал преимущественное распределение в митохондриях. Конъюгат TPP-DOX значительно увеличивал продукцию АФК и токсичность в отношении клеток карциномы молочной железы при комбинации с гиалуроновой кислотой, использованной в качестве наноносителя для селективной доставки Mito-DOX в митохондрии раковых клеток. Эффективность полученного молекулярного ансамбля была подтверждена на модели *Danio rerio* (Zebrafish) [65].

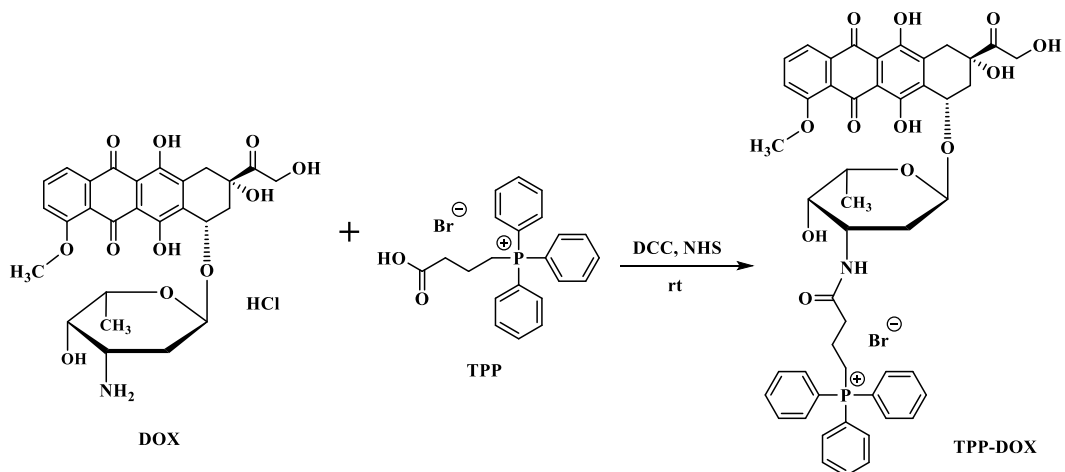


Схема 4 – Синтез митохондриально-нацеленного конъюгата доксорубина с TPP (TPP-DOX)

Клиническая эффективность известного противоопухолевого препарата цисплатина сильно ограничена лекарственной резистентностью. Кроме того, цисплатин не избирателен в отношении опухолевых клеток и имеет серьезные побочные эффекты. Исследования показали, что связанный с ТРР цисплатин, преимущественно накапливается в митохондриях, минуя ядерную ДНК и проникая в митохондриальный геном. Этот подход позволяет преодолеть лекарственную устойчивость к цисплатину [66]. Синтез ТРР-производного цисплатина был проведен с использованием реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения алкинов и азидов (Схема 5). Для этого фосфониевую соль бромгексановой кислоты **15** связали с азадибензоциклооктином **16**, используя дициклогексокарбодиимид (DCC) и *N*-гидроксисукцинимид. Полученный аддукт **17** ввели в реакцию с азидным производным цисплатина **18**, получив целевое соединение **19**. Авторы работы измерили распределение цисплатина в основных органах мышей и обнаружили, что большая часть препарата накапливалась в печени и почках. Однако ТРР-цисплатин присутствовал больше в легочных и опухолевых тканях и, по сравнению с цисплатином, был менее цитотоксичен для нормальных клеток и обладал хорошей совместимостью. Кроме того, ТРР-цисплатин участвовал в повреждении ДНК, а также в других противоопухолевых сигнальных путях, таких как ингибирование гликолиза, нарушение митохондриальной биоэнергетики и высвобождение цитохрома *c*.

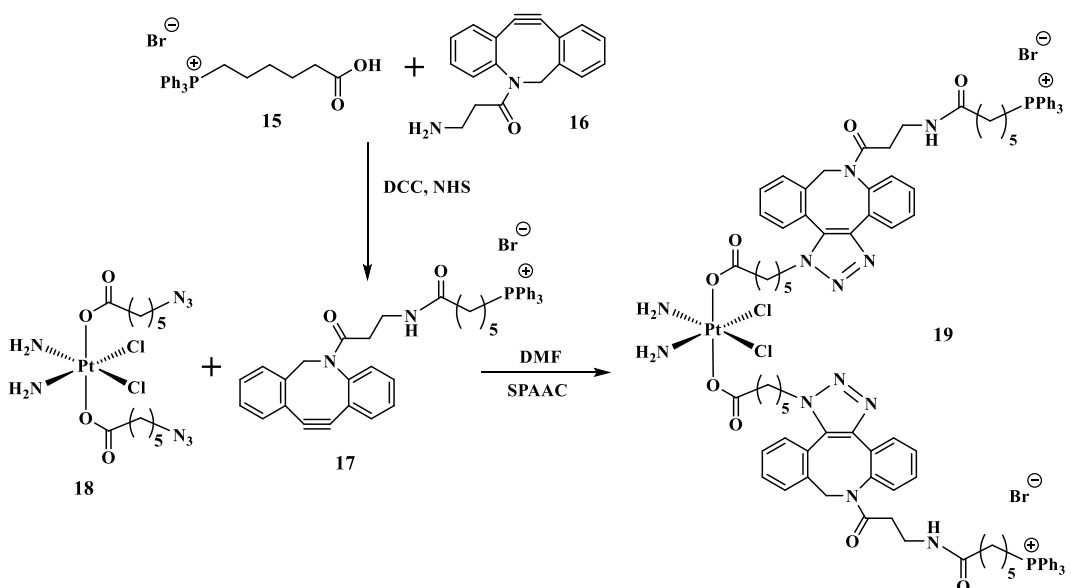


Схема 5 – Синтез митохондриально-нацеленного конъюгата ТРР-цисплатин

Недавние исследования обнаружили у известного с 1950-х годов противодиабетического лекарства метформина противоопухолевую активность в отношении рака поджелудочной железы. Изучение механизма противоопухолевого действия метформина показало, что соединение в первую очередь нацелено на комплекс 1 (CI) дыхательной цепи митохондрий. Присоединение к метформину фрагмента TRP через C-10 алкановый линкер привело к увеличению токсичности исходного препарата на 3-4 порядка, что делает трифенилфосфониевое производное метформина Mito-Met многообещающим противораковым агентом [67]. Для получения Mito-Met **25a** 1,10-дибромдекан **20a** был трансформирован в моно-трифенилфосфониевую соль **21a**, в которой атом брома заменили на NH₂-группу взаимодействием с аммиаком (**22a**) или с MeNH₂ (**23a**) в растворе метанола. Затем первичную NH₂-функцию трансформировали в гуанидиниевую реакцией с дициандиамидом в ДМФА с получением соответствующих соединений **24a** и **25a** (Схема 6).

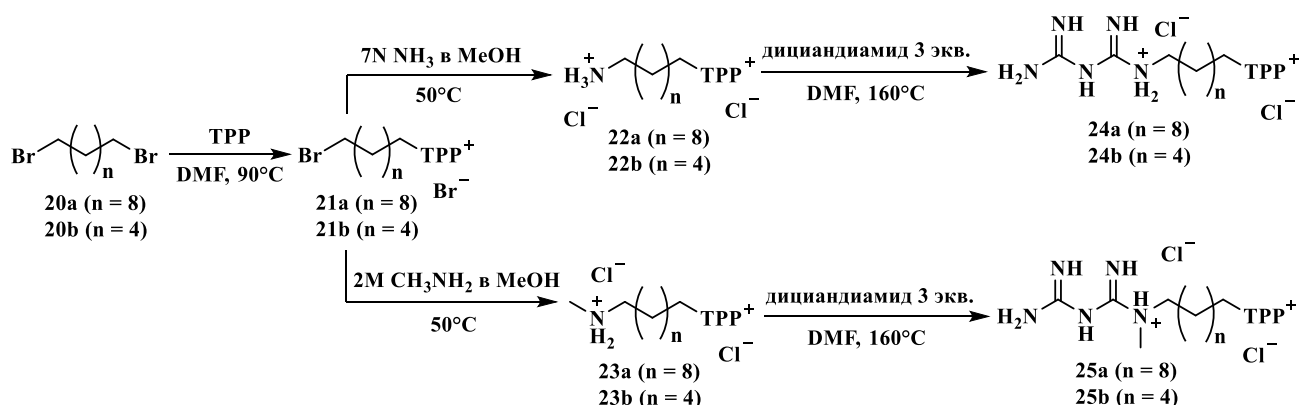


Схема 6 – Синтез митохондриально-нацеленных конъюгатов метформина с TRP

Тамоксифен (Tam) – смешанный агонист/антагонист рецептора эстрогена (ER), используется в качестве терапии первой линии при лечении гормонально-чувствительного рака груди, но неэффективен при лечении Her2-зависимого типа опухоли (рецептор эпидермального фактора роста человека). В настоящее время Her2-положительный рак молочной железы лечат таргетными препаратами, такими как трастузумаб, эмтанзин, лапатиниб и др. Эти лекарства прицельно воздействуют на гиперэкспрессирующий в клетках молочной железы рецептор

Her2, но со временем эффективность лечения снижается из-за развивающейся множественной лекарственной резистентности. Конъюгат тамоксифена с митохондриально-нацеленной группой TPP проявил высокую эффективность в отношении опухолевых клеток с высоким уровнем Her2 [68]. Значения IC_{50} Mito-Tam, полученные для ряда клеточных линий рака молочной железы, были как минимум на порядок ниже, чем для исходного тамоксифена. С другой стороны, значения IC_{50} для нераковых клеточных линий на порядок превысили таковые для линий раковых клеток, что указывает на хорошие возможности фармацевтического окна. Цитотоксичность митохондриально-направленного аналога тамоксифена объясняется ингибированием комплекса CI и значительным увеличением продукции АФК в раковых клетках. В настоящее время Mito-Tam и Mito-Met успешно прошли испытания фазы I клинической триады (Рисунок 6) [69].

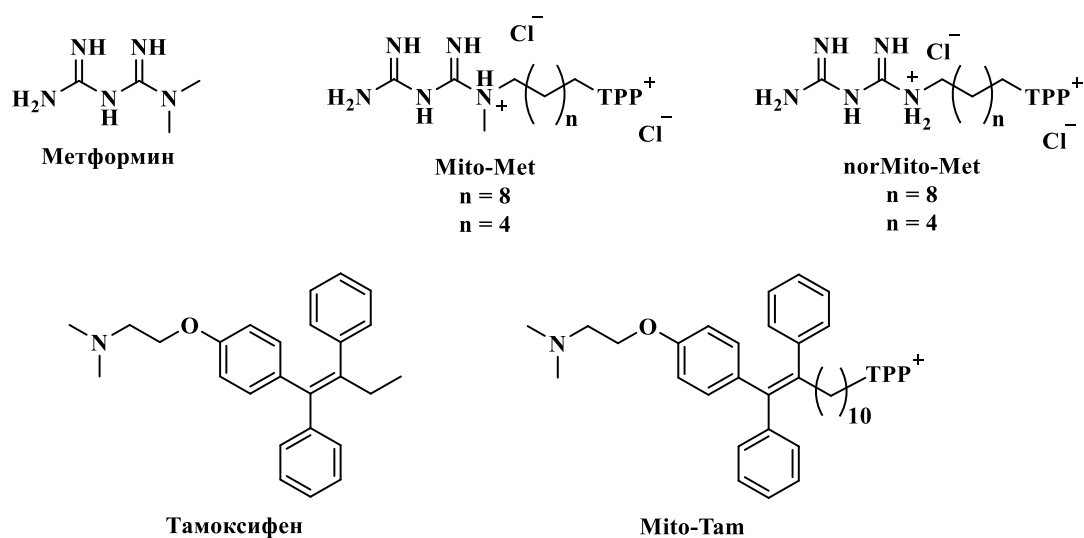


Рисунок 6 – Молекулярные структуры метформина, тамоксифена и их TPP-солей

1.3.2 Митоканы на основе конъюгатов природных биологически активных веществ с TPP

Наряду с развитием стратегий лечения онкологических заболеваний с использованием митохондриально-нацеленных производных известных синтетических лекарственных средств, ведется активный поиск митоканов среди

природных веществ растительного происхождения, названных в литературе как «Herbal mitocans» [70]. При этом исследуются как экстракты медицинских растений, так и индивидуальные молекулы. На сегодняшний день известны митоканы природных соединений различных классов веществ. Значительное место в ряду этих противоопухолевых соединений занимают полифенолы и их синтетические/полусинтетические производные: куркумин, кверцетин, ресвератрол, галловая кислота, хонокиол и др. (Рисунок 7) [53, 61, 71-89].

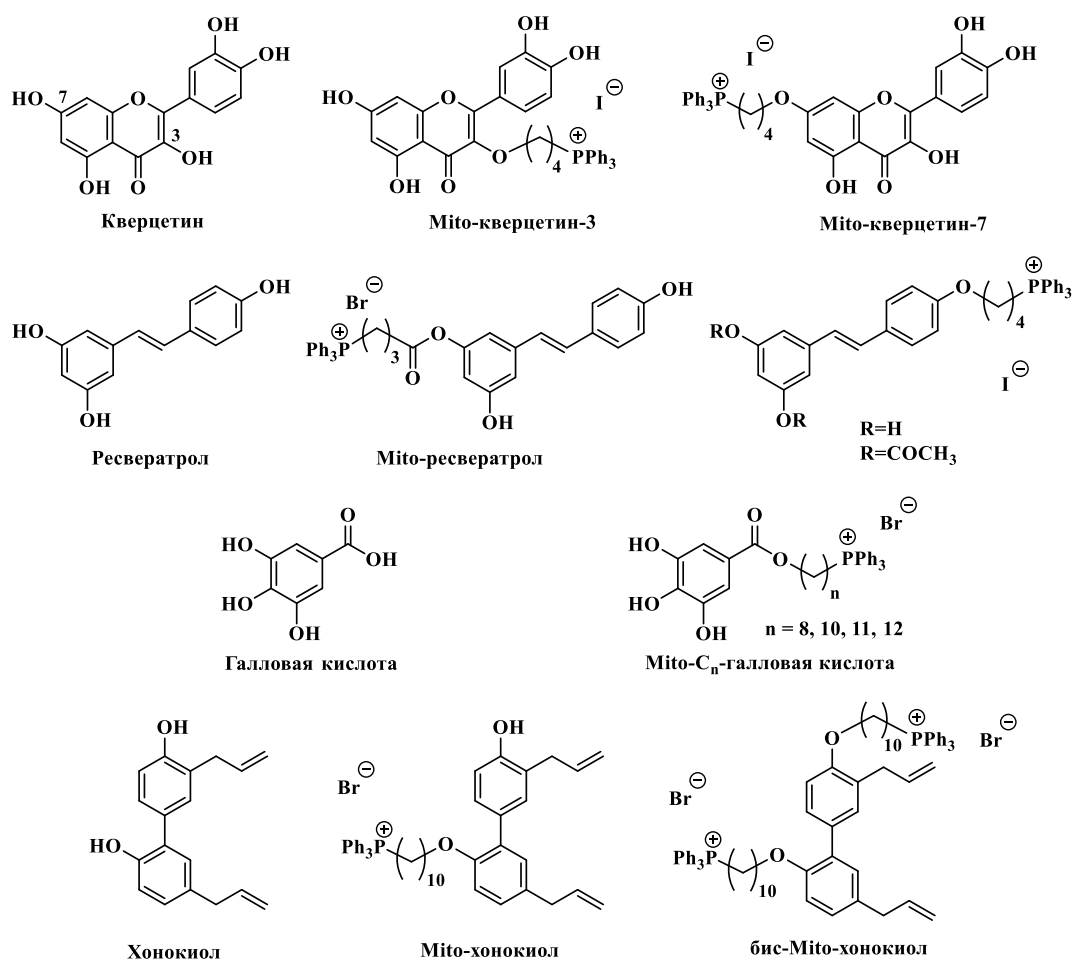


Рисунок 7 – Молекулярные структуры некоторых полифенолов и их митоканов

В качестве перспективного кандидата в лекарство исследуются полифенольное соединение куркумин и его аналоги Mito-куркумины (Рисунок 8). Куркумин может подавлять пролиферацию и выживаемость почти всех типов опухолевых клеток, однако он демонстрирует ограниченную эффективность из-за

низкой биодоступности в плазме крови и тканях, что недостаточно для внутриклеточного накопления.

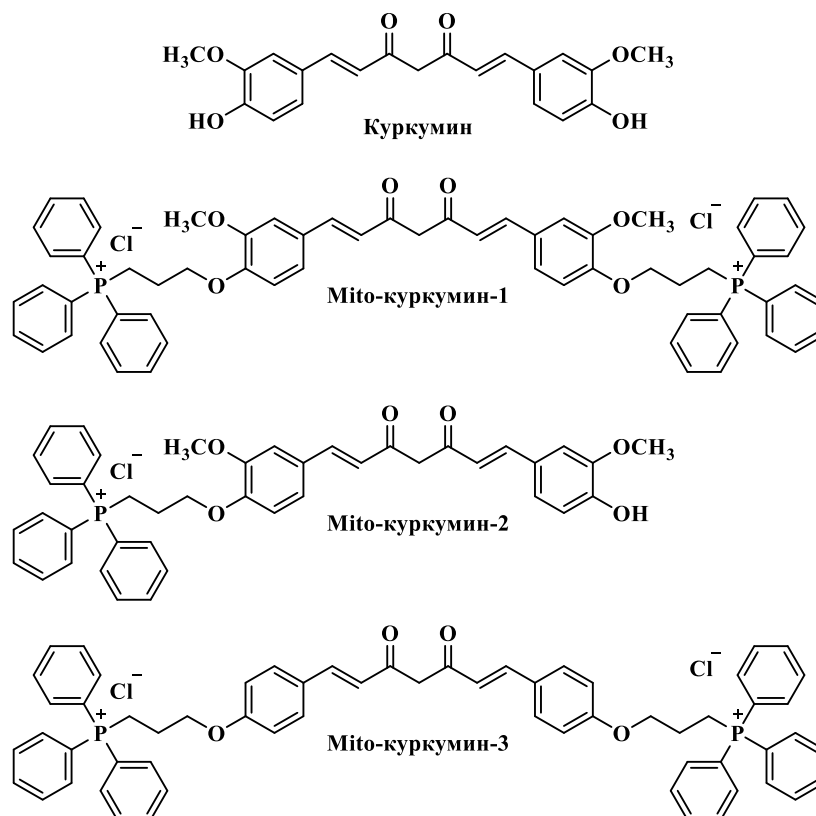


Рисунок 8 – Молекулярные структуры куркумина и его TPP-производных

В испытаниях *in vitro* Mito-куркумины проявили значительную цитотоксичность в отношении раковых клеток MCF-7, MDAMB-231, SKNSH, DU-145 и HeLa с гораздо более низким значением IC₅₀ по сравнению с куркумином [71, 72]. Наибольшую активность эти соединения показали в отношении карциномы молочной железы и глиомы человека. На мышинной модели ксенотрансплантата глиомы Mito-куркумины продемонстрировали уменьшение опухоли на 78% без явной системной токсичности. В работе [73] для улучшения терапии фиброза печени куркумин был загружен в самоорганизующиеся мицеллы, полученные конъюгацией фосфониевой соли бромпропановой кислоты с полиэтиленгликолем. Благодаря трифенилфосфониевому катиону мицеллы избирательно накапливались в митохондриях и играли роль эффективного средства доставки куркумина в митохондрии клеток печени HSC-T6. Инкапсулирование куркумина в

полученный наноноситель привело к усиленному ингибированию клеточной пролиферации клеток HSC-T6, продлению системной циркуляции и улучшению биодоступности куркумина.

Природные полифенолы, ресвератрол и кверцетин, оказывают антипролиферативное и проапоптотическое действие на различные опухолевые клетки и противодействует росту ксенотрансплантатов и мутаген-индуцированного рака [90-92]. Противоопухолевый эффект этих веществ связан с генерацией супероксид-аниона, то есть с прооксидантным действием в митохондриях. Однако плохая биодоступность и низкая цитотоксическая активность, проявляемая в диапазоне сотен микромолей, ограничивают использование этих соединений в практической медицине. В отличие от природных предшественников, производные ресвератрола и кверцетина, несущие трифенилфосфониевую группу, O-связанную с фенольным кольцом бутановым линкером, проявили прооксидантное и цитотоксическое действие в низких микромолярных концентрациях, убивая быстро пролиферирующие клетки по некротическому типу [77, 78, 80, 81, 93]. Цитотоксичность этих TRP-производных полифенолов была обусловлена гиперпродукцией в митохондриях АФК, в основном H_2O_2 . Прооксидантное действие исследованных соединений возрастало при ацетилировании и метилировании фенольных гидроксильных групп [93]. Противоопухолевая активность митохондриально-тропных полифенолов была продемонстрирована на клеточной линии карциномы молочной железы человека MDA-MB-231, мышинной карциномы 4T1, а также на клеточной линии рака толстой кишки HCT116 [80, 81].

Известно, что галловая кислота и ее эфиры могут индуцировать митохондриальные дисфункции [94]. В работе [85] были синтезированы и исследованы на антипролиферативный эффект четыре алкилгаллата, содержащие в алкильной цепи концевую трифенилфосфониевую группу. Наиболее эффективное в ряду исследованных соединений TRP-производное галловой кислоты, содержащее в линкере 10 углеродных атомов, показало противоопухолевое действие с величиной IC_{50} 0.4-1.6 μM и индексом

селективности 17 в отношении опухолевой линии аденокарциномы мыши ТА3/На и ее мультирезистентного варианта ТА3-МТХ-Р в сравнении с нормальными клетками. Присутствие этого соединения в клетках приводило к увеличению скорости потребления кислорода, уменьшению митохондриального потенциала и снижению продукции АТФ. Более того, ТРР-галлат значительно ингибировал рост опухоли ТА3/На на модели сингенных мышей.

В ряду природных митоканов широко исследованы также сукцинат альфа-токоферола (α -TOS) и его трифенилфосфониевое производное (Mito-VES) [95-100]. Установлено, что митоканы из группы витамина Е подавляют активность комплекса II дыхательной цепи митохондрий и усиливают продукцию АФК, инициируя апоптоз в раковых клетках. При этом Mito-VES связывается с митохондриями раковых клеток и убивает злокачественные клетки значительно более эффективно, чем исходное соединение α -TOS. В настоящее время α -TOS и Mito-VES успешно прошли стадию доклинических исследований в отношении рака молочной железы человека [95].

1.3.3 Митоканы на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с ТРР

Пентациклические тритерпеноиды (бетулин, бетулиновая, урсоловая, олеаноловая и глицирретовая кислоты) являются одними из самых распространенных терпеноидов растительного происхождения (Рисунок 9). Например, бетулин, бетулиновая и бетулоновая кислоты идентифицированы более чем в 200 различных типах растений. Тритерпеноиды демонстрируют широкий спектр биологических свойств, среди которых особый интерес вызывает их противораковая активность и способность запускать путь митохондриального апоптоза в различных типах раковых клеток человека [101-106]. Так, бетулиновая кислота стимулировала апоптотическую гибель клеток в исследованиях на опухолевых клеточных линиях меланомы, рака легких, рака яичников и нейроэктодермальных опухолях [7, 107, 108]. При этом противоопухолевая активность бетулиновой кислоты была связана с гиперпродукцией АФК, которые

способствовали проницаемости внешней митохондриальной мембраны (ОММ) и высвобождению апоптогенных митохондриальных белков из межмембранного пространства, с последующей активацией каспазного каскада [7, 107-110]. Урсоловая кислота также может вызывать апоптоз, аутофагию и остановку клеточного цикла различными путями, такими как ингибирование репликации ДНК, стимуляция продукции АФК и влияние на баланс между про- и антиапоптотическими белками [111-114]. Особая привлекательность тритерпеновых кислот обусловлена их слабым цитотоксическим действием по отношению к нормальным клеткам человека (фибробластам или нормальным лимфоцитам). Однако относительно низкий противоопухолевый потенциал и высокая гидрофобность тритерпеноидов заметно затрудняют их испытание на животных и продвижение в качестве кандидатов в противораковые препараты.

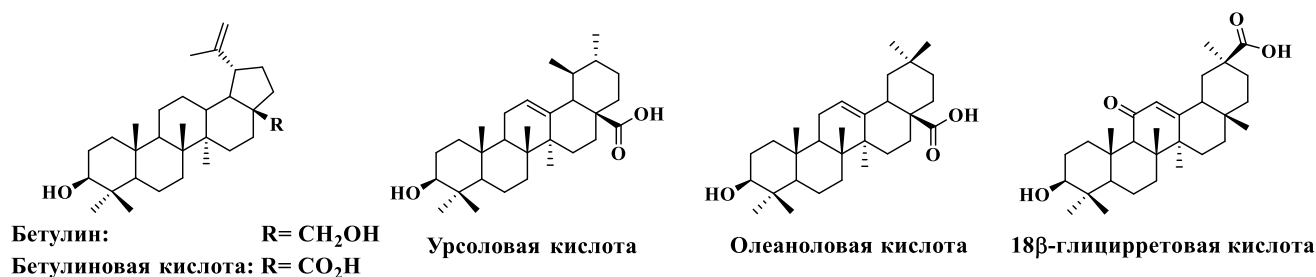


Рисунок 9 – Молекулярные структуры бетулина, бетулиновой, урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот

Митохондриально-нацеленные пентациклические тритерпеноиды, связанные с трифенилфосфониевым катионным фрагментом через полиалкановые линкеры описаны в работах [115-123]. Первые представители трифенилфосфониевых производных бетулиновой кислоты были синтезированы в 2013 году (Рисунок 10) [115].

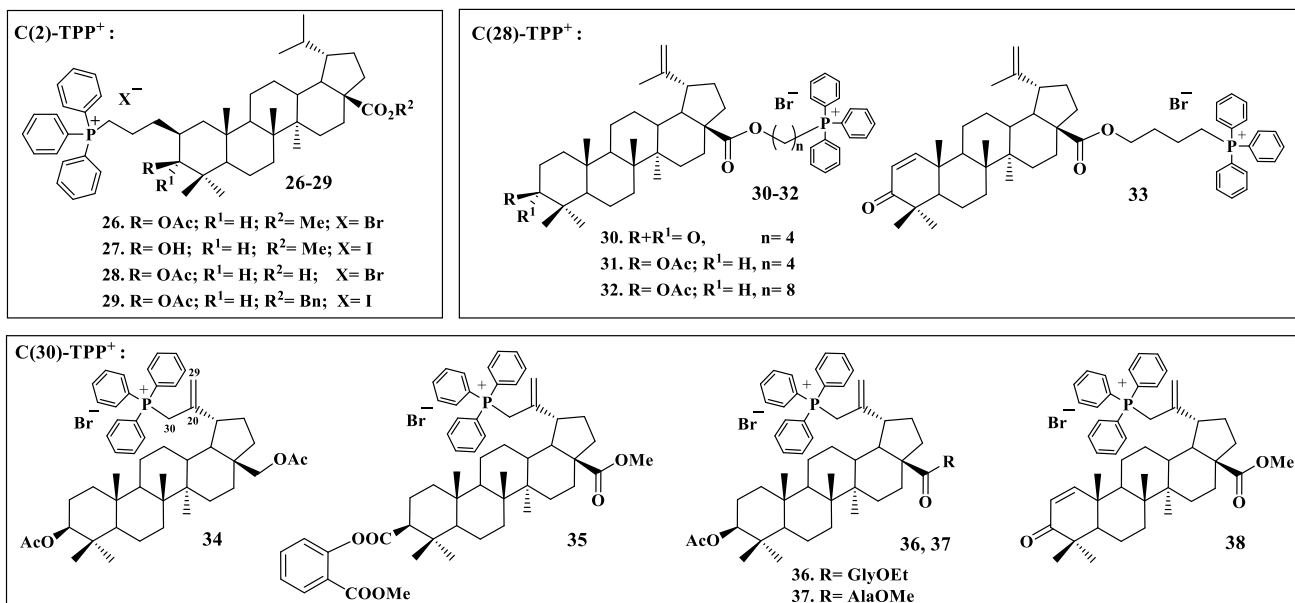


Рисунок 10 [123] – Молекулярная структура трифенилфосфониевых солей бетулиновой кислоты

Ковалентное связывание фрагмента TPP с лупановым тритерпеноидом при C-2 позиции кольца А через пропильную цепь привело к 40-50-кратному увеличению цитотоксического действия катионных производных по сравнению с бетулиновой кислотой. Дальнейшее исследование на цитотоксическую активность по отношению к клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7, мышинной карциномы Эрлиха и мастоцитомы P815 большого ряда трифенилфосфониевых солей лупановых тритерпеноидов показало, что трифенилфосфониевая группа оказывает решающее воздействие на цитотоксичность катионных соединений. Тритерпеновые митоканы показали сравнимый противоопухолевый эффект не зависимо от структуры тритерпенового скелета и позиции тритерпенового ядра, к которой был присоединен катионный фрагмент TPP (Рисунок 11) [116, 123].

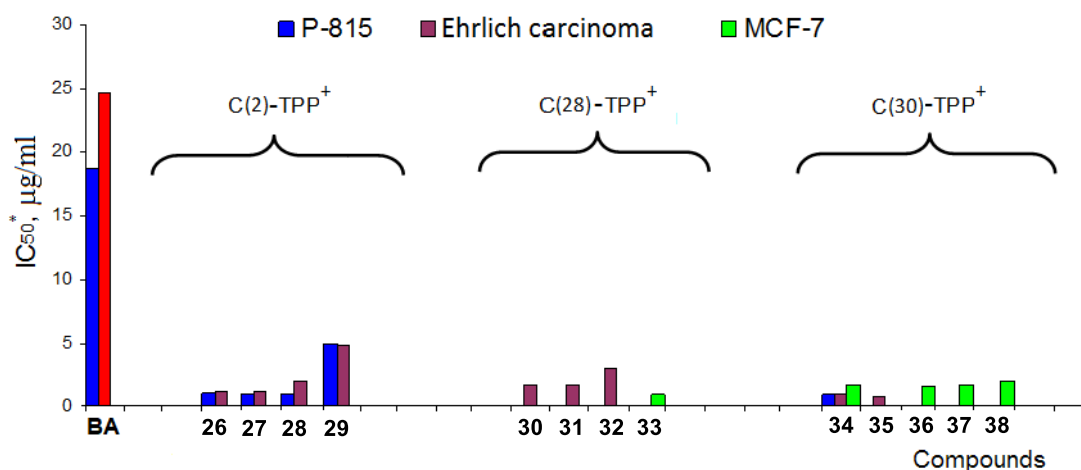


Рисунок 11 [123] – Данные о цитотоксической активности бетулиновой кислоты (**BA**) и солей трифенилфосфония **26-38** в отношении клеточных линий P-815, карциномы Эрлиха и MCF-7.

*IC₅₀ – концентрация соединений, подавляющая 50 % роста клеток

При исследовании TPP-производных бетулина против аденокарциномы простаты (PC-3) и рака груди человека (MCF-7), включая винбластин-резистентный тип рака MCF-7/Vinb, конъюгаты продемонстрировали высокую антипролиферативную активность в отношении винбластин-резистентных клеток MCF-7 со значением IC₅₀ менее 0.045 µM (Рисунок 12) [117].

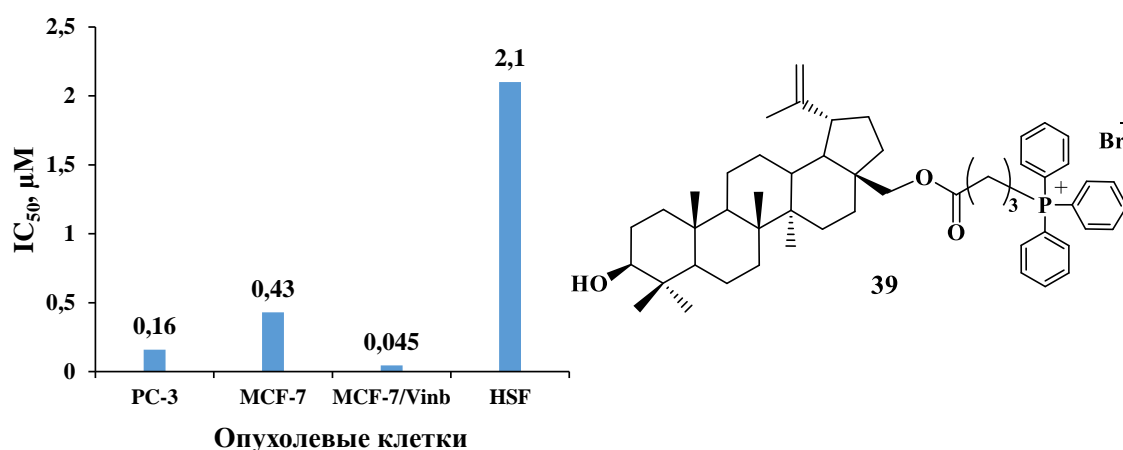


Рисунок 12 – Данные о цитотоксической активности трифенилфосфониевой соли бетулина **39**

Исследование механизма цитотоксических эффектов конъюгатов тритерпеноид-ТРР показало, что тритерпеновые митоканы инициируют митохондриальный путь апоптоза раковых клеток, продуцируя активные кислородсодержащие частицы и уменьшая митохондриальный мембранный потенциал. Анализ потребления кислорода опухолевыми клетками карциномы толстой кишки НСТ116, после их инкубации с бетулиновой кислотой или трифенилфосфониевым производным **40**, свидетельствовал о том, что трифенилфосфониевый аддукт **40** подавляет митохондриальное дыхание при низких концентрациях (1-2 μM), при которых бетулиновая кислота была не эффективной (Рисунок 13) [118-120, 123].

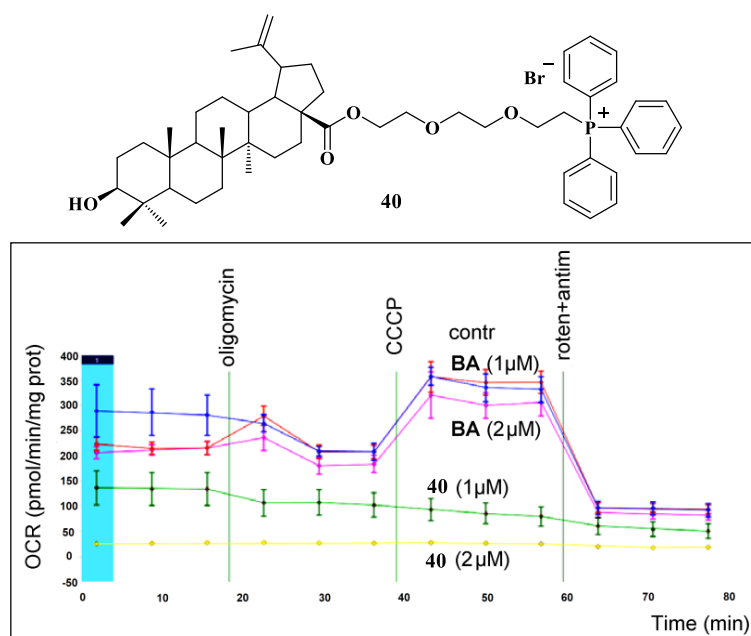


Рисунок 13 [123] – Оценка потребления кислорода клетками рака НСТ116 (карцинома толстой кишки человека) после инкубации с бетулиновой кислотой (**BA**) и трифенилфосфониевой солью **40**, в течение 24 ч

Усиление цитотоксической активности и селективности противоопухолевого действия тритерпеновых кислот было подтверждено и при биологическом скрининге конъюгатов глицирретовой кислоты с ТРР-фрагментом [119]. Трифенилфосфониевое производное этого тритерпеноида **41** проявило значительно более высокую противоопухолевую активность и одновременно

приемлемую селективность в отношении исследуемых раковых и нормальных клеток по сравнению с исходной природной кислотой и 10-гидроксикамптотецином (НСРТ) (Рисунок 14).

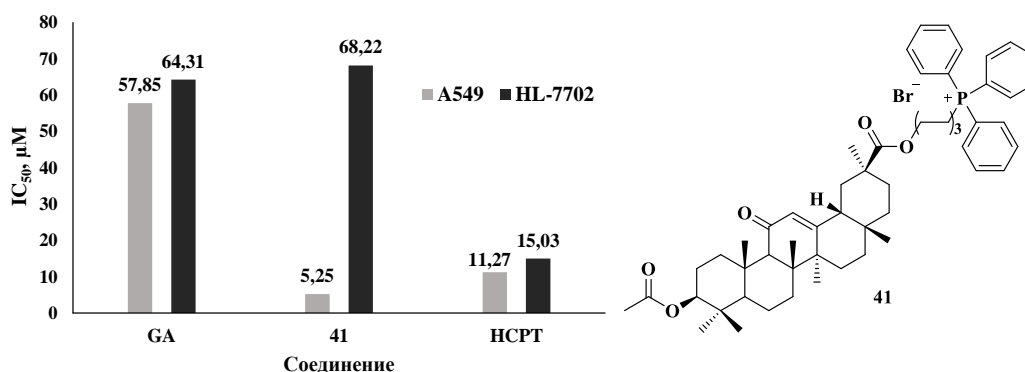


Рисунок 14 – Данные о цитотоксической активности глицирретиновой кислоты (GA), соли трифенилфосфония **41** и 10-гидроксикамптотецина (НСРТ)

Возможность индуцировать митохондриально-зависимый путь апоптоза раковых клеток различной этиологии под действием тритерпеновых митоканов была подтверждена *in vivo* на моделях Zebrafish в работе Fan с соавторами [120]. Синтез амфифильных конъюгатов, несущих фармакофорный фрагмент бетулина или абиетиновой кислоты, связанных с TPP-группой глицеролипидными линкерами описан в работе [124]. Полученные амфифильные конъюгаты, сформированные в митохондриально-тропные липидные везикулы (фармакосомы) показали сравнимую с доксорубицином значительную цитотоксичность по отношению к широкому кругу опухолевых клеток. При этом формирование в фармакосомы обеспечило высокую селективность (SI = 480) в отношении линии опухолевых клеток NuTu-80 и линии нормальных клеток печени.

1.3.4 Митоканы на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с родамином

В своих работах Csuk с соавторами в качестве «вектора доставки» при получении тритерпеноидных митоканов использовал митохондриально-тропное

катионное соединение родамин В (Rho B). Этой исследовательской группой была получена большая серия гибридов маслиновой, азиатиковой, бетулиновой, урсоловой, олеаноловой и других ди- и тритерпеновых кислот, в которых терпеновое ядро связано с Rho B пиперазиновым или гомопиперазиновым линкером (Рисунок 15) [125-137]. В отношении нескольких исследованных опухолевых клеточных линий природные тритерпеновые кислоты проявили очень низкую цитотоксическую активность ($IC_{50} > 30 \mu M$), в отличие от их С-28 пиперазинамидных производных, которые показали значение IC_{50} для MCF-7 в интервале 1.0-2.0 μM . Однако цитотоксичность этих пиперазинамидов была также высокой и для незлокачественных мышинных фибробластов NIH3T3. Значительный эффект был достигнут путем получения конъюгатов с Rho B, содержащих пиперазиновый линкер. Эти конъюгаты показали противоопухолевую активность в наномолярных концентрациях и были менее токсичны для фибробластов мыши (MCF-7, $IC_{50} 0.075 \mu M$; NIH3T3, $IC_{50} 0.137 \mu M$).

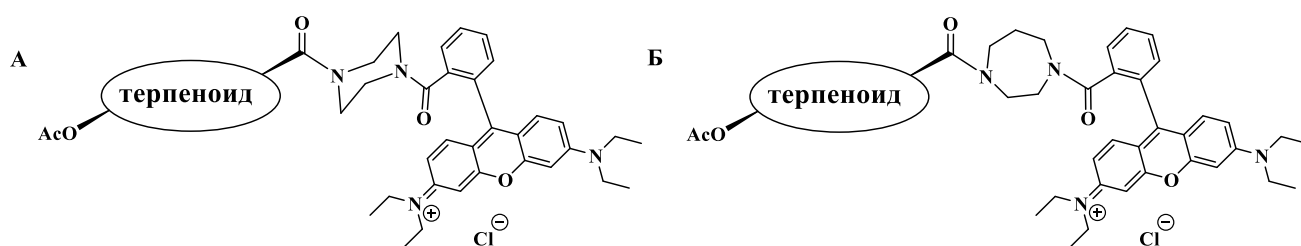


Рисунок 15 – Конъюгаты тритерпеновых кислот с родамином В, содержащих пиперазиновый (А) и гомопиперазиновый (Б) линкеры

Исследования, проведенные на флуоресцентном микроскопе методом двойного окрашивания с использованием родамина 123 и Hoechst 33,342, подтвердили высокую аккумуляцию конъюгатов в митохондриях опухолевых клеток [125]. Интересно, что конъюгаты тритерпеновых кислот и Rho B, содержащие гомопиперазиновый мостик были даже более цитотоксичными по сравнению с пиперазиновыми аналогами [129]. Исследования большой серии конъюгатов тритерпеноидов с Rho B показали, что молекулярная структура тритерпенового ядра оказывает заметное влияние на цитотоксичность

конъюгатов. В частности, конъюгат гомопиперазинилродамина Б и мадекассовой кислоты обладал превосходной цитотоксичностью и селективностью в отношении нескольких линий опухолевых клеток человека (IC_{50} $0.0029 \pm 0.0005 \mu\text{M}$). Его цитотоксичность была более чем в 2.4 раза выше, чем у аналога, полученного из маслиновой кислоты, и он имел почти такую же цитотоксичность, как аналог, полученный из коросолевой кислоты [137]. Кроме того, это соединение было в 10 000 раз более цитотоксичным, чем исходная мадекассовая кислота, для клеток рака яичников A2780. Авторы работы предположили, что наличие дополнительной гидроксильной группы в положении С-6 в производных мадекассовой кислоты, а также $2\alpha,3\beta$ -конфигурация ацетильных функций в кольце А, оказали благотворное влияние на цитотоксичность конъюгатов также, как и на их селективность в отношении опухолевых/неопухолевых клеток [134]. Лидирующей структурой среди исследованных конъюгатов тритерпеновых кислот с Rho В, как считают Csuk и соавторы, является производное азиатиковой кислоты, сочетающее в себе высокую цитотоксичность в наномолярных концентрациях, высокую селективность и способность преодолевать лекарственную устойчивость (Рисунок 16). Эффективность конъюгата была подтверждена в доклинических испытаниях на 3D сфероидных моделях колоректального рака и рака молочной железы [135].

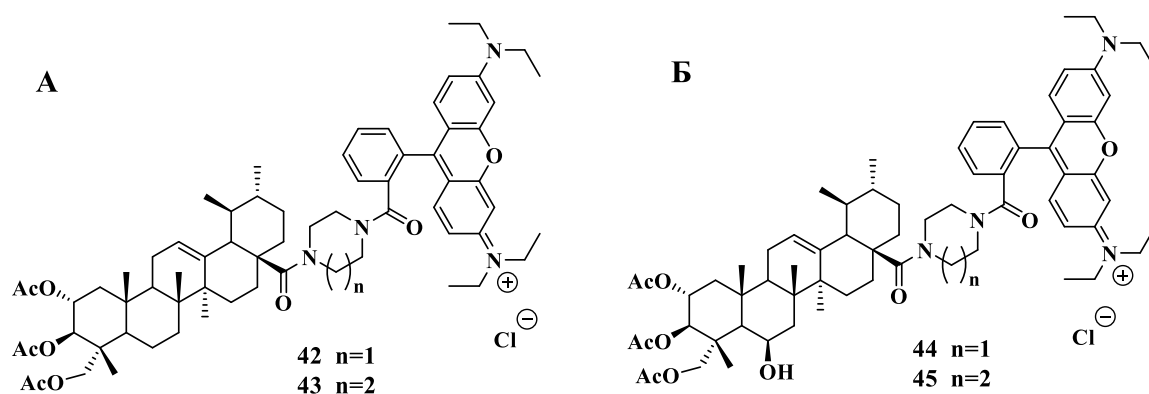


Рисунок 16 – Конъюгаты азиатиковой (А) и мадекассовой кислот (Б) с пиперазинил- и гомопиперазинилродамином Б

Конъюгаты Rho В с некоторыми стероидами, такими как абиратерон, преднизолон, тестостерон и желчные кислоты, описаны в работах (Рисунок 17)

[131, 136]. По своей противоопухолевой активности и селективности цитотоксического эффекта исследованные гибридные молекулы стероидного типа уступали пиперазинил родаминовым производным тритерпеновых кислот. Конъюгаты Rho B с желчными кислотами (холевая, дезоксихолевая, литохолевая и др.) при тестировании на нескольких опухолевых клеточных линиях действовали как цитостатики, вызывая арест клеток в G1 фазе.

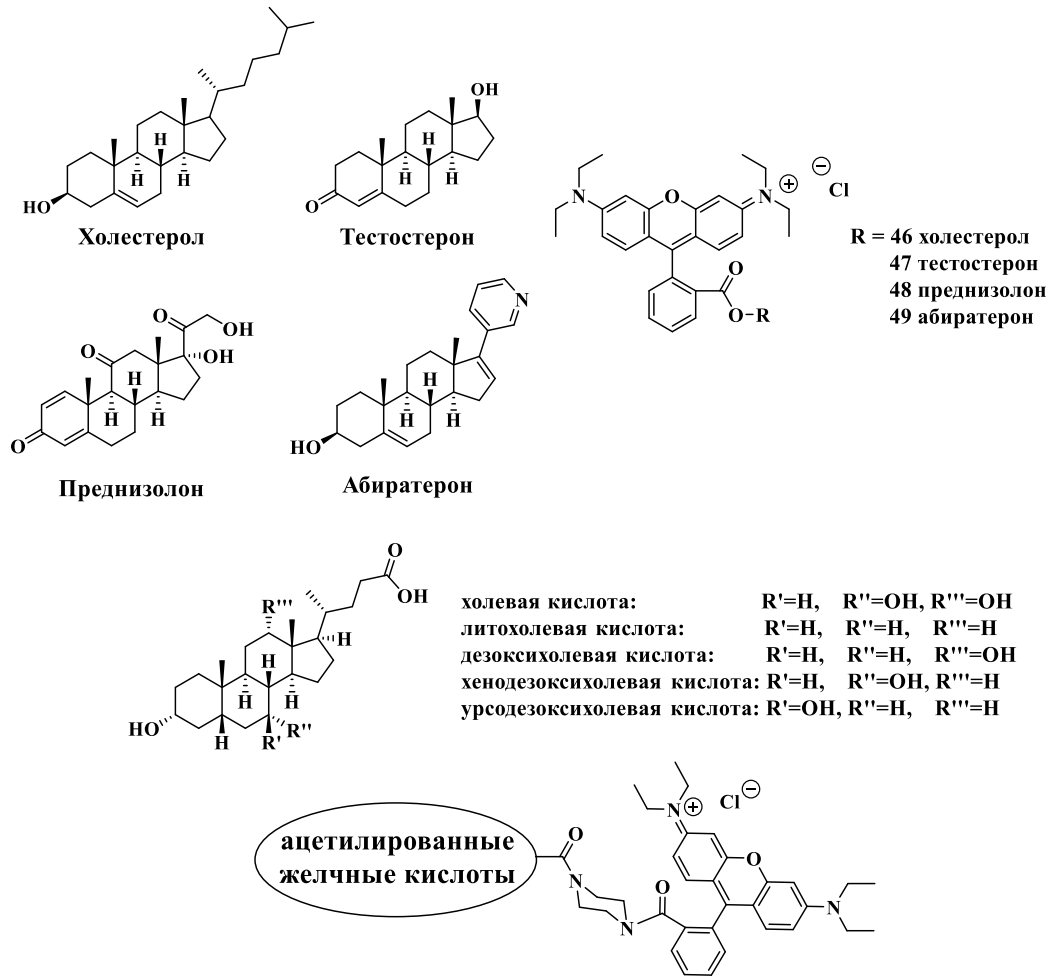


Рисунок 17 – Конъюгаты стероидов и желчных кислот с пиперазинином родамином B

Хотя противоопухолевый эффект митохондриально-направленных желчных кислот был ниже, чем у аналогичных производных тритерпеноидов, эти соединения представляют собой интересный объект для дальнейших биологических исследований, учитывая их хорошую детергентность и участие в поддержании гомеостаза кишечного эпителия [131, 136].

Заключение к литературному обзору

Таким образом, из опубликованных в литературе результатов следует, что химическое связывание цитотоксических молекул с нацеленными на митохондрии липофильными катионными соединениями, является перспективной стратегией для открытия новых таргетных противоопухолевых лекарств или кандидатов в лекарства. При разработке этой стратегии подразумевается, что гиперполяризованные мембраны митохондрий опухолевых клеток способствуют селективному накоплению цитотоксических агентов в злокачественно-трансформированных клетках, что приводит к уничтожению злокачественных новообразований при минимальной потенциальной токсичности в отношении нормальных клеток. К настоящему времени концепция гибридизации цитотоксических веществ с липофильными делокализованными катионными соединениями успешно использована для улучшения клинической эффективности традиционных противоопухолевых лекарств, таких как доксорубицин, хлорамбуцил или цисплатин. Некоторые известные препараты, например, метформин или тамоксифен, используемые для лечения воспалительных заболеваний или заболеваний, вызванных многофакторным нарушением обмена веществ, проявили сильный противоопухолевый эффект в результате их трансформации в митохондриально-направленные агенты. Трансформация фитохимических веществ полифенолов в мито-полифенолы (куркуминоиды, ресвератрол, галловая кислота и другие полифенольные кислоты) вызывает интерес, поскольку эти молекулы могут проявлять прооксидантное действие и индуцировать в раковых клетках митохондриальную дисфункцию. Митоканы тритерпеновой структуры, представляющие собой конъюгаты пентациклических тритерпеновых кислот с катионом трифенилфосфония, показали высокую противоопухолевую активность на различных типах раковых клеточных линиях независимо от тритерпенового ядра.

Следует отметить, что сегодня среди известных липофильных делокализованных катионных соединений, катион трифенилфосфония является

наиболее широко используемым липофильным лигандом, нацеленным на митохондрии. Митохондриотропные свойства фрагмента TPP⁺ успешно использованы для доставки широкого спектра биологически активных веществ в митохондрии, включая антиоксиданты (MitoQ, MitoVitE и MitoTEMPOL). В настоящее время соединение MitoQ проходит стадии клинических испытаний в качестве лекарства для лечения гепатита С и болезни Паркинсона. На основе SkQ1 разработано лекарство для глаз Визомитин и мазь от ран и ожогов. Однако, в отличие от указанных мито-антиоксидантов, тритерпеновые митоканы продемонстрировали высокую цитотоксичность и селективность в отношении опухолевых/здоровых клеток пока только в условиях *in vitro*. Несколько соединений из этой категории кандидатов в противоопухолевые лекарства проходят доклинические или начальные стадии клинических испытаний. В предстоящие годы будет важно подтвердить их эффективность на животных моделях. Недавно в литературе появились некоторые обнадеживающие данные относительно нового липофильного катиона F16. Это флуоресцентное соединение демонстрирует интересную цитотоксическую активность, но соединение F16 еще недостаточно изучено как средство доставки функциональных молекул в митохондрии.

В связи с изложенным выше, настоящая работа посвящена поиску новых противоопухолевых митохондриально-направленных лекарственных агентов путем синтеза ранее неизвестных конъюгатов доступных фитохимических веществ тритерпеновой структуры с катионным соединением F16.

ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1 Синтез и исследование цитотоксической активности новых конъюгатов лупановых, олеановых и урсановых 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.

Противоопухолевая активность нативных тритерпеновых кислот, обнаруженная *in vitro* для различных типов опухолевых клеток (меланома, аденокарцинома, нейробластома, медуллобластома, глиобластома), удачно сочетается с их низкой системной токсичностью [101, 138-144]. Эти вторичные метаболиты действуют на митохондрии опухолевых клеток, инициируя образование АФК. Свободные радикалы, образующиеся в высоких концентрациях, увеличивают проницаемость митохондриальных мембран или разрывают мембраны, что приводит к выходу медиатора апоптоза цитохрома *c* в цитозоль, активации каспаз и фрагментации ДНК [109, 110]. Однако плохая растворимость этих тритерпенов в воде требует применения высоких концентраций для накопления в митохондриях и достижения желаемого терапевтического эффекта, а это может вызывать многочисленные побочные эффекты, ограничивающие их применение в клинической медицине. Поэтому усилия многих лабораторий направлены на разработку методов химической модификации тритерпеноидов для повышения их биодоступности и активности [101].

Недавно было показано, что бетулин и производные бетулиновой и урсоловой кислот, ковалентно связанные с трифенилфосфониевым фрагментом углеродным линкером, существенно (в 40-50 раз) превосходят свои прототипы по противоопухолевой активности и способности индуцировать митохондриальный путь апоптоза раковых клеток [115, 116, 118]. Превосходная цитотоксическая активность была также обнаружена для катионных производных

пентациклических тритерпеноидов, содержащих катионный остаток родамина Б (Рисунок 18) [125].

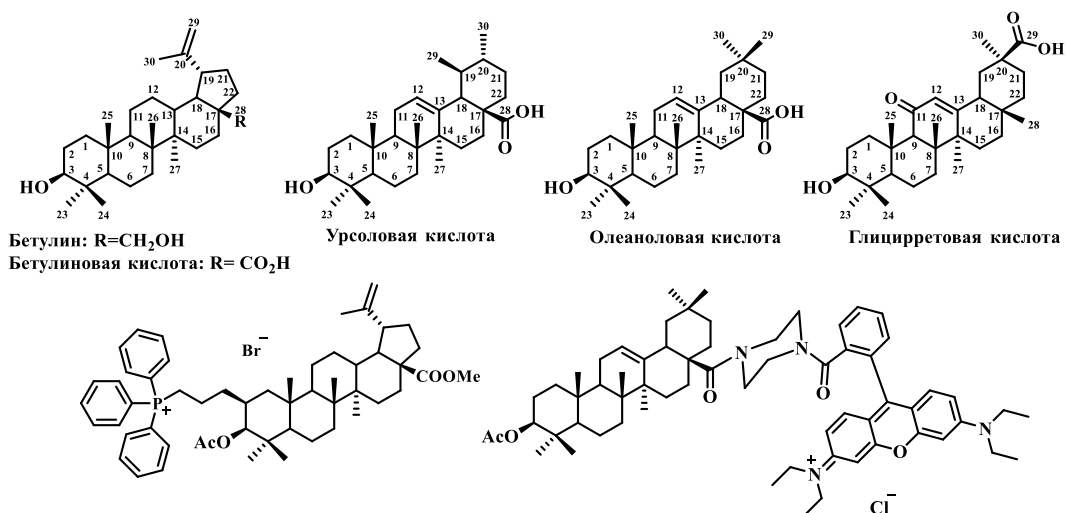


Рисунок 18 – Природные тритерпеновые кислоты и их модифицированные производные с высокой противоопухолевой активностью

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 [24, 25].

Высокие концентрации этого соединения в митохондриях вызывают гибель клеток, связанную с остановкой клеточного цикла, прерыванием митохондриальной дыхательной цепи, снижением уровня внутриклеточного АТФ и индукцией апоптоза. Однако, в отличие от широко используемого катиона трифенилфосфония, возможности использования соединения F16 в качестве вектора доставки цитотоксических соединений в злокачественные клетки исследовано всего в нескольких работах [62, 145].

Соединение F16 синтезируют конденсацией грамина с пиридинкарбоксальдегидом в присутствии трибутилфосфина с последующим взаимодействием пиридинвинилиндола **2** с метилиодидом (Схема 7). В синтезе описанных в работе конъюгатов «тритерпеноид-F16» мы использовали

нейтральный предшественник F16 – соединение **2**, которое получали по методу [146].

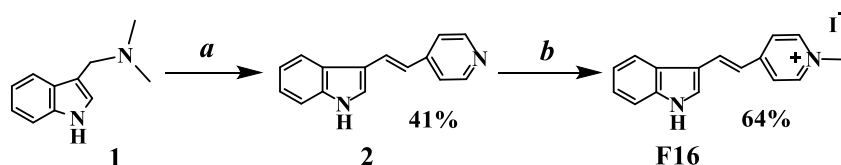


Схема 7 – Синтез катионного соединения F16

Реагенты и условия. (а) 4-пиридинкарбоксальдегид, tri-n-BuP, CH₃CN, 81°C, 24ч.; (b) CH₃I, ДМФА, 80°C, 24ч.

В первой серии конъюгатов лупановых тритерпеноидов с катионным фрагментом F16 было задействовано фармакологически нейтральное С-30 положение тритерпенового каркаса. Конъюгаты **5** и **8** синтезировали из доступных ацетильных производных бетулина и бетулиновой кислоты. Диацетат бетулина **3** получали напрямую из березовой бересты кипячением в уксусной кислоте [147], а ацетат бетулиновой кислоты **6** синтезировали взаимодействием бетулиновой кислоты с ацетилхлоридом в ТГФ в присутствии пиридина и 4-диметиламинопиридина (DMAP). Полученные ацетаты были трансформированы в соответствующие аллильные бромиды **4** и **7** с использованием N-бромсукцинимиды (NBS) в четыреххлористом углероде [148], а затем были введены в реакцию с соединением **2** в ДМФА при 85°C с образованием конъюгатов **5** и **8** (Схема 8).

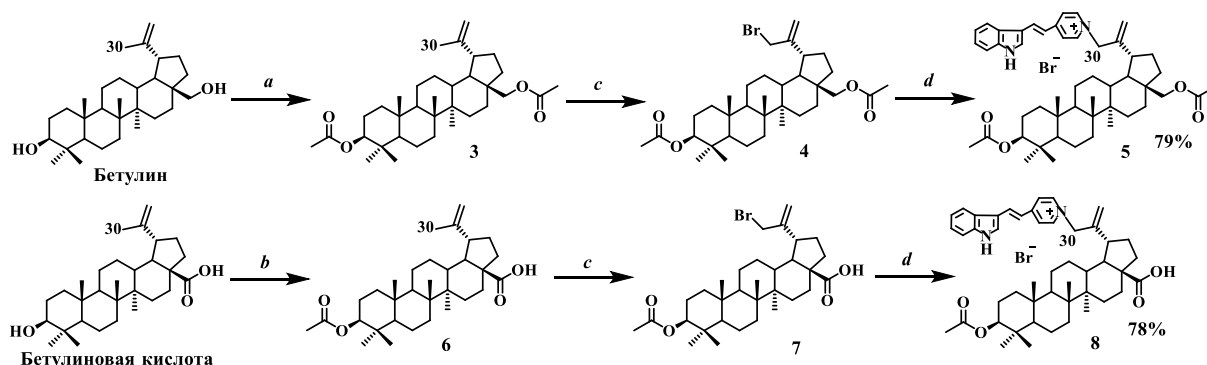


Схема 8 – Синтез конъюгатов бетулина и бетулиновой кислоты с соединением F16 при С-30 позиции

Реагенты и условия. (а) AcOH, кипячение; (b) AcCl, ТГФ, пиридин, DMAP; 20°C; (c) NBS, CCl₄, 20°C, 24ч.; (d) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, 85°C, 12ч.

Хорошо 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 мы синтезировали следующую серию конъюгатов, в которых катионная группа F16 была связана с молекулой тритерпеноидов лупанового ряда при 3-ОН и/или 28-СООН положениях через легкогидролизуемую сложноэфирную связь. Для этого из бетулина карбодиимидным методом были получены моно- и дибромиды бетулина **9** и **11** с использованием одного или двух эквивалентов 5-бромвалериановой кислоты в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC) и DMAP [117]. Полученные бромиды были введены во взаимодействие с соединением **2** в ДМФА при 85°C, давая с хорошим выходом конъюгаты **10** и **12** (Схема 9).

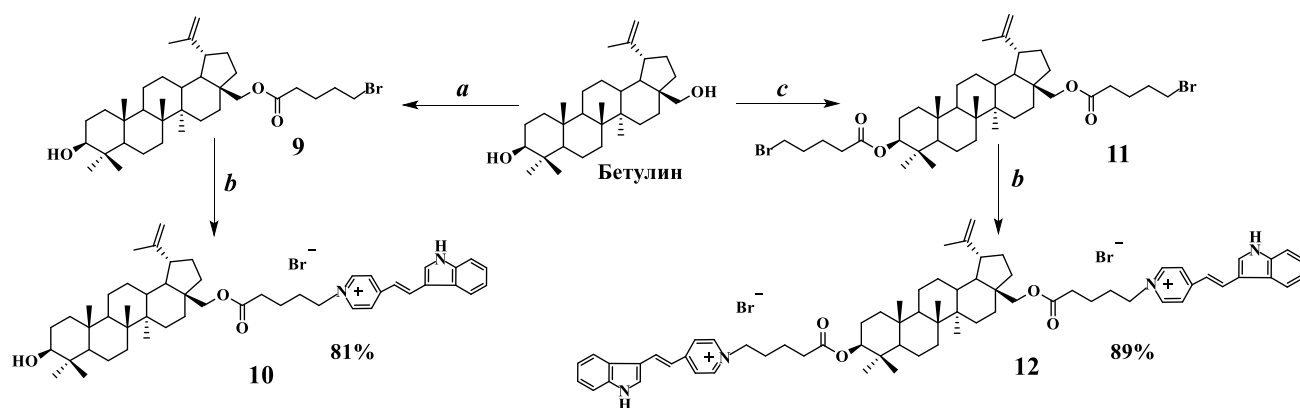


Схема 9 – Синтез конъюгатов бетулина с соединением F16 при C-28/C-3 позициях
Реагенты и условия. (а) 5-бромвалериановая кислота (1 экв.), DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 20°C; (b) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, 85°C, 12ч.; (c) 5-бромвалериановая кислота (2 экв.), DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 20°C.

Конъюгаты F16 с бетулиновой кислотой **15** и **18**, связанные алкановым или триэтиленгликолевым мостиками, получали из бромидов **13** и **17**, которые предварительно синтезировали взаимодействием бетулиновой кислоты с четырехкратным мольным избытком 1,4-дибромбутана или α,ω-дибромтриэтиленгликоля в ДМФА или в смеси растворителей ДМФА–CH₃CN (3:1), как описано в работах [116, 118]. Ацилированием 3-ОН функции

бетулиновой кислоты с использованием бромуксусной кислоты получен бромид **19**, который реакцией с четырёхкратным мольным избытком 1,4-дибромбутана был трансформирован в дибромид бетулиновой кислоты **20**, а затем в конъюгат **21** (Схема 10).

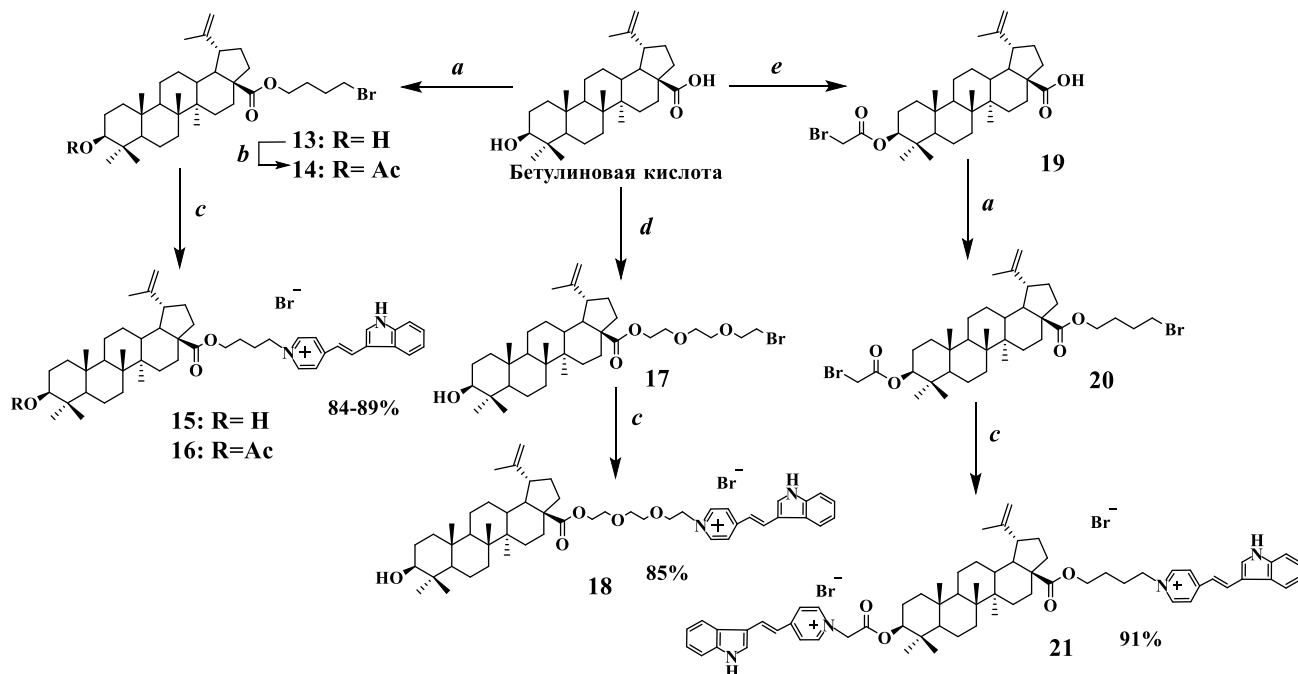


Схема 10 – Синтез конъюгатов бетулиновой кислоты с соединением F16 при С-3 и/или С-28 позициях

Реагенты и условия. (a) 1,4-дибромбутан, K_2CO_3 , ДМФА, CH_3CN , $50^\circ C$; (b) $AcCl$, ТГФ, пиридин, DMAP, $20^\circ C$; (c) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, $85^\circ C$, 12ч.; (d) α,ω -дибромтриэтиленгликоль, K_2CO_3 , ДМФА, $50^\circ C$; (e) бромуксусная кислота, ТГФ, пиридин, DMAP, $20^\circ C$.

С целью расширения ряда F16-производных тритерпеноидов и дальнейшего исследования влияния молекулярной структуры тритерпенового ядра на цитотоксическую активность гибридных молекул, в условиях, приведенных на схеме 11, были синтезированы алкилбромиды урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот **22**, **26** и **30** и F16-конъюгаты **24**, **28** и **32** (Схема 11). С целью исследования влияния ацетильной группы на биологическую активность конъюгатов, были синтезированы 3-ОАс-бромиды **14**, **23**, **27** и **31** и соответственные F16-конъюгаты **16**, **25**, **29** и **33** (Схемы 10 и 11).

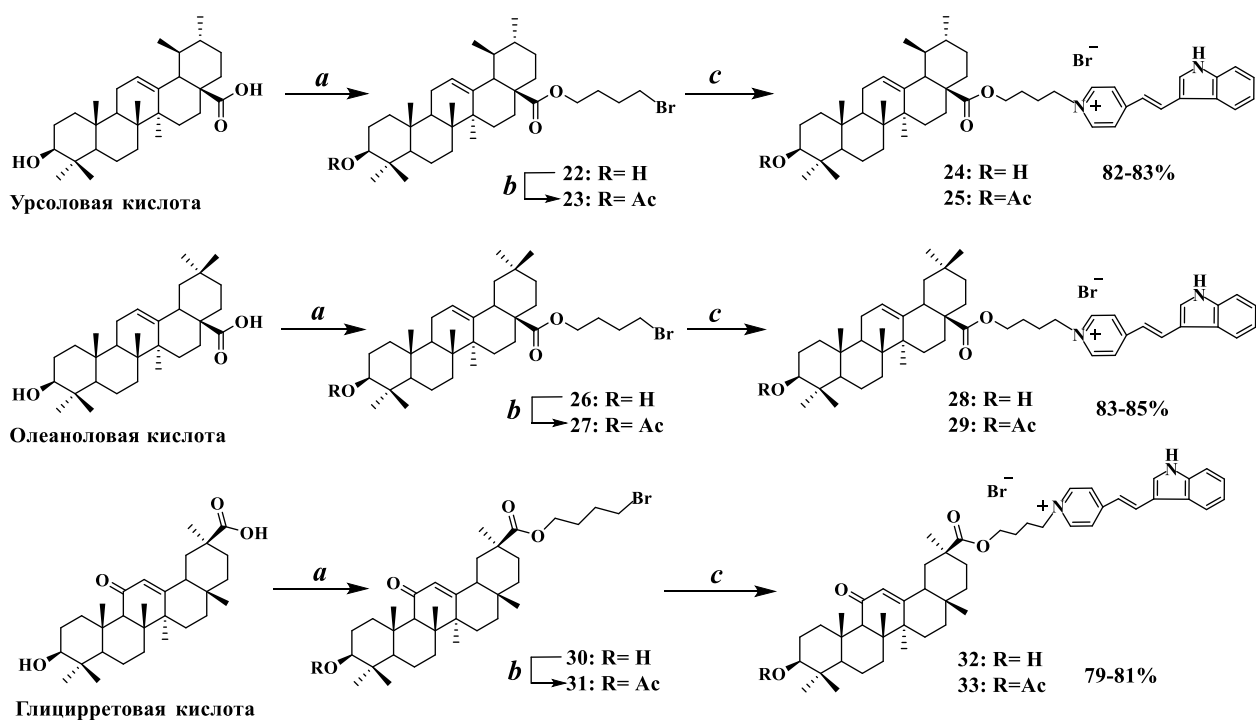


Схема 11 – Синтез конъюгатов урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот с соединением F16

Реагенты и условия. (a) 1,4-дибромбутан, K_2CO_3 , ДМФА, CH_3CN , $50^\circ C$; (b) $AcCl$, ТГФ, пиридин, DMAP, $20^\circ C$; (c) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, $85^\circ C$, 12ч.

Строение всех полученных соединений подтверждено данными одномерных (1H , ^{13}C , АРТ), двумерных гомо- (COSY, NOESY) и гетероядерных (HSQC, HMBC) ЯМР-экспериментов. Химические сдвиги терпенового ядра и (E)-4-(1H-индол-3-илвинил)пиридина определяли путем сравнения с литературными данными [115, 116, 149, 150]. В спектрах ЯМР 1H конъюгатов наличие (E)-4-(1H-индол-3-илвинил)пиридиневого фрагмента подтверждалось присутствием двух дублетов, характерных для пиридиневого кольца в области 8.02 и 8.58 м.д., ($J = 6.0$ Гц.). Два дублета, принадлежащие винильной связи наблюдались в области 7.10 и 8.09 м.д. с $J = 16.0$ Гц, а три мультиплета, характерные для индольного фрагмента лежали в диапазонах 7.22-7.29, 7.48-7.88 и 8.07-8.09 м.д. В спектрах ЯМР ^{13}C сигналы атомов углерода (E)-4-(1H-индол-3-илвинил)пиридиния находились в области 113.6-157.4 м.д.

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 [151]. В качестве исходного тритерпеноида было использовано С-2-пропинильное производное бетулиновой кислоты **35**, полученное из бетулиновой кислоты в несколько стадий по ранее разработанному нами методу [152].

Для реализации синтеза новой гибридной молекулы «тритерпеноид-F16» пиридинвинилиндола **2** был вовлечен в CuI-катализируемую реакцию сочетания по Ульману-Голдбергу с 1-бром-4-йодбензолом по методу [146]. Полученный прекурсор с бромфенильным заместителем в индольном фрагменте **36** мы попытались ввести в реакцию кросс-сочетания по Соногашира с пропаргильным производным **35** в присутствии катализаторов CuI/PdCl₂(PPh₃)₂. Однако в этом случае, по-видимому, из-за стерической затрудненности терминального алкина и низкой активности атома брома, реакция протекала только по пути ацетиленовой гомодимеризации тритерпеноида **35** с образованием в качестве единственного продукта известного синтетического симметричного димера тритерпеноида **37**, синтез которого путем Cu/Pd-катализируемого гомосочетания метилбетулоната **35** описан нами ранее в работе [153]. В связи с этим нами было синтезировано йодфенильное производное **38** взаимодействием соединения **2** с двукратным мольным избытком 1,4-дииодбензола. Взаимодействие соединений **38** и **35** дало целевой продукт кросс-сочетания, который без предварительной очистки трансформировали в аддукт «F16-тритерпеноид» **39** путем кватернизации пиридиниевого кольца под действием CH₃I в ДМФА по методу [146]. Реакция протекала при комнатной температуре в течение 12 часов с образованием целевого гибридного соединения **39** с выходом 71% (Схема 12).

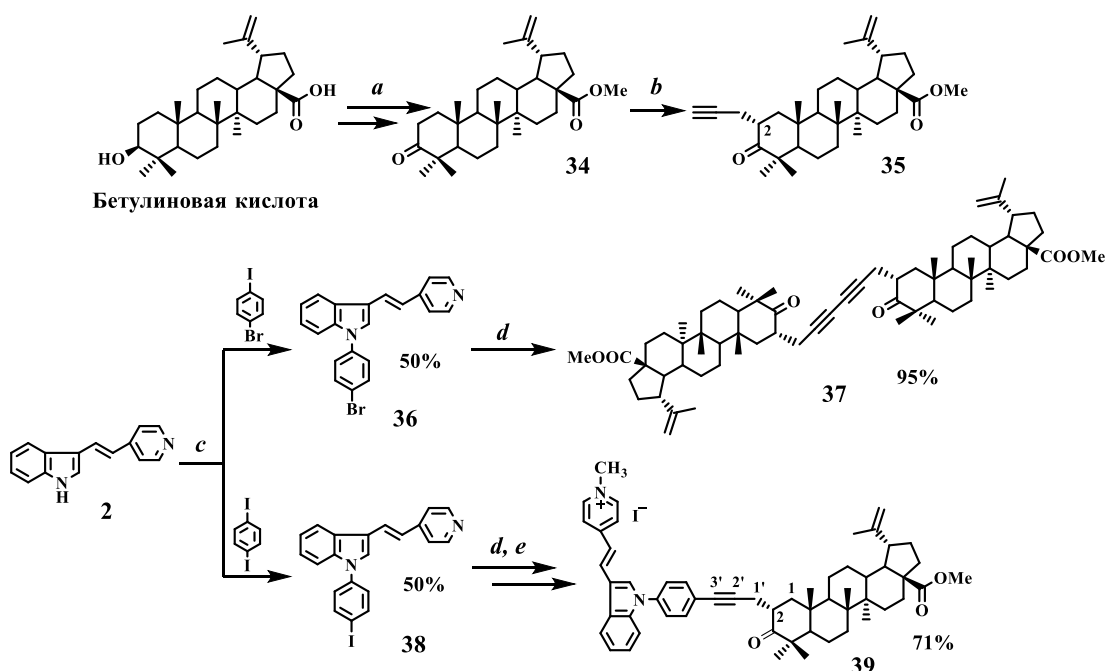


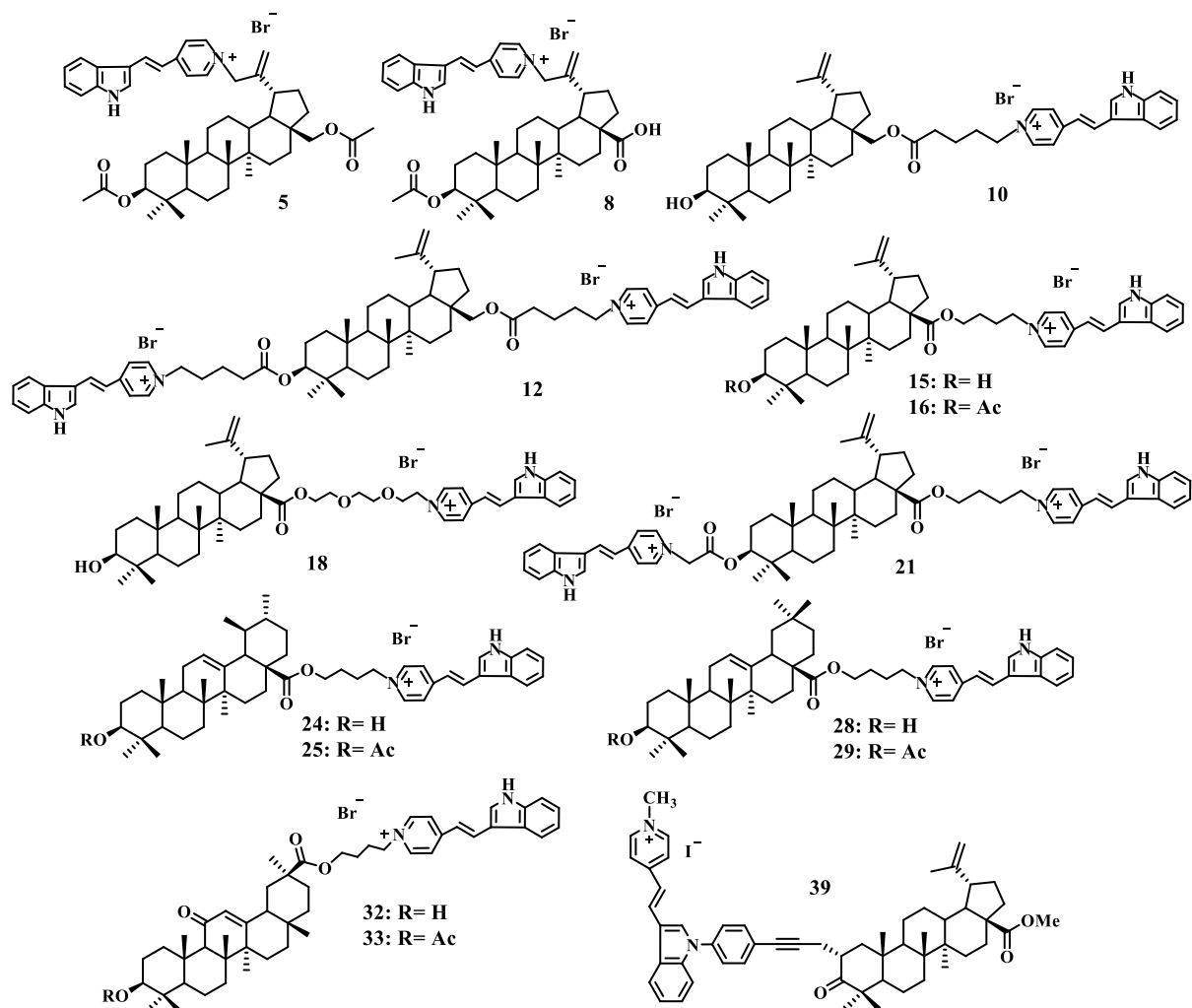
Схема 12 – Синтез конъюгата бетулиновой кислоты с соединением F16 при C-2 позиции с фенилэтинильным линкером

Реагенты и условия. (a) 1. CrO_3 , H_2SO_4 , ацетон, 2ч.; 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, 2ч.; (c) пиперидин-2-карбоновая кислота, CuI , K_2CO_3 , ДМФА, 110°C , 24ч.; (d) соединение **35**, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI , $\text{Et}_3\text{N}/\text{ДМФА}$ (1:1), 20°C , 2ч.; (e) CH_3I , ДМФА, 12ч.

Структуру гибридного соединения **39** идентифицировали с помощью одномерных (^1H , ^{13}C , АРТ), двумерных гомо- (COSY, NOESY) и гетероядерных (HSQC, HMBC) ЯМР-экспериментов. Химические сдвиги терпенового ядра и йодида (E)-4(1H-индол-3-илвинил)-N-метилпиридиния определяли путем их сравнения с ранее опубликованными данными [146, 152]. В спектре ЯМР ^1H наличие фрагмента йодида (E)-4(1H-индол-3-илвинил)-N-метилпиридиния подтверждалось характерным сигналом пиридиниевого кольца в виде дублета в области 8.49 м.д., $J = 6.5$ Гц, а также дублета винильной группы при 7.21 м.д., $J = 16.0$ Гц. Четыре мультиплета, характерные для индольного и фенильного фрагментов проявлялись в областях 8.07-8.09, 7.96-8.00, 7.44-7.52 и 7.30-7.33 м.д., синглет метильной группы наблюдался в области 4.80 м.д. (N^+CH_3); Один из протонов метиленовой группы, $\text{H}^{\text{a}}-1'$, проявлялся в виде дублета дублетов ($J = 15.0, 5.0$ Гц); второй протон $\text{H}^{\text{b}}-1'$ и протон $\text{H}^{\text{a}}-1$ наблюдались в виде мультиплета в области 2.40-2.48 м.д. В спектре ЯМР ^{13}C зарегистрированы сигналы атомов

углерода, характерные для йодида (E)-4(1H-индол-3-илвинил)-N-метилпиридиния и фенильного кольца в диапазоне 109.7-154.3 и 47.8 м.д. Сигналы атомов углерода C-2' и C-3' резонировали при 90.5 и 80.6 м.д. соответственно.

Таким образом, нами была получена серия принципиально новых гибридных соединений «тритерпеноид-F16», в которых тритерпеновое ядро лупановой, урсановой и олеановой структуры было связано при C-2, C-3 и/или C-28 и C-30 позициях с одной или двумя катионными группами F16 через различные линкеры (Рисунок 19).



Полученные конъюгаты тритерпеновых кислот, бетулиновая кислота, соединение F16 и эквимольная механическая смесь бетулиновой кислоты и F16 (1:1, моль/моль) протестировали *in vitro* на трех лейкозных опухолевых клеточных линиях: U937 (лейкемическая моноцитарная лимфома), K562 (хронический миелоидный лейкоз) и Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз), а также на

клеточной линии незлокачественных фибробластов человека. Жизнеспособность клеток после обработки тестируемыми соединениями изучали методом проточной цитометрии путем окрашивания клеток 7-ААД (7-аминоактиномицин D).

Большинство конъюгатов (15, 16, 18, 24, 25, 28, 29, 32, 33) показали высокую цитотоксическую активность в отношении всех протестированных линий раковых клеток и превзошли бетулиновую кислоту (БК) в 100-200 раз (Таблица 1).*

Таблица 1 – Цитотоксическое действие конъюгатов (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>				
5	3.040±0.094 ^b	3.260±0.091 ^b	3.190±0.089 ^b	11.400±1.030 ^b
10	0.906±0.037 ^b	0.937±0.032 ^b	0.904±0.033 ^b	8.200±0.630 ^b
12	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>				
8	>125 ^b	>125 ^b	>125 ^b	>125 ^b
15	0.616±0.028 ^b	0.844±0.034 ^b	0.812±0.032 ^b	6.100±0.220 ^b
16	2.167±0.073 ^b	0.584±0.027 ^b	0.559±0.025 ^b	4.360±0.990 ^b
18	0.573±0.024 ^b	1.260±0.042 ^b	1.210±0.041 ^b	5.500±0.340 ^b
21	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>				
24	2.461±0.085 ^b	0.623±0.031 ^b	0.588±0.032 ^b	6.230±0.850 ^b
25	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>				
28	0.607±0.027 ^b	0.687±0.034 ^b	0.671±0.035 ^b	3.490±0.560 ^b
29	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>				
32	2.425±0.083 ^b	0.559±0.024 ^b	0.511±0.022 ^b	8.300±1.190 ^b
33	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. Величина IC_{50} ($X \pm SE$) была получена в результате трех независимых экспериментов в двух экземплярах.

*Автор выражает глубокую благодарность д.м.н., с.н.с. Джемилевой Л.У. за исследование противоопухолевой активности представленных в таблице соединений

Производные бетулиновой кислоты **15** и **16**, урсоловой кислоты **24** и **25**, олеаноловой кислоты **28** и **29** и глицирретовой кислоты **32** и **33** проявили противоопухолевую активность в отношении клеток линии Jurkat с величиной IC_{50} в диапазоне 0.56-0.84 μM , многократно превзойдя по цитотоксичности бетулиновую кислоту (IC_{50} 81.68 μM). Среди исследованных соединений конъюгаты F16 с лупановыми терпеноидами **10**, **15** и **18** были наиболее селективными в отношении опухолевых линий и доброкачественных фибробластов (величина индекса селективности около 10 определена как IC_{50} для линии опухолевых клеток U937 по сравнению с IC_{50} для фибробластов). Вопреки нашим ожиданиям, введение второго (E)-4-(1H-индол-3-илвинил)пиридиниевого фрагмента в молекулу тритерпеноида не увеличивало противоопухолевую активность. Биконъюгаты бетулина и бетулиновой кислоты **12** и **21** были менее активны, чем соответствующие монопроизводные (IC_{50} по отношению к линии U937 составил 2.06 и 4.19 μM , соответственно). Эти результаты полностью согласуются с ранее опубликованными данными [116], из которых следует, что бифосфониевые соли лупановых тритерпеноидов не показали более высокое противоопухолевое действие по сравнению с монофосфониевыми солями. F16-производное бетулиновой кислоты при C-30 атоме (соединение **8**) не проявило цитотоксическую активность ($IC_{50} > 125 \mu M$), а конъюгат C-30 диацетата бетулина **5** показал умеренное цитотоксическое действие по отношению к линии U937 (IC_{50} 3.04 μM). Полученные результаты показывают, что цитотоксичность конъюгатов F16 с тритерпеноидами может изменяться в зависимости от позиции тритерпенового ядра, связанного с катионным фрагментом. Ранее эта закономерность наблюдалась для катионных диметиламинопиридиновых производных тритерпеноидов лупановой структуры [154].

В условиях нашего эксперимента соединение F16 не проявляло цитотоксичности, а бетулиновая кислота проявила противоопухолевую активность с IC_{50} 149.3 (U937), 81.7 (Jurkat) и 78.5 (K562) μM . В отличие от бетулиновой кислоты и F16, связанных ковалентной связью, механическая смесь этих соединений не показала заметного усиления цитотоксического действия.

В продолжение работы, мы решили провести сравнительное исследование цитотоксического действия соединения **18** (ВА-F16), одного из наиболее активных гибридов бетулиновой кислоты и F16, связанных триэтиленгликолевым линкером, в отношении аденокарциномы молочной железы MCF-7 и здоровых клеток фибробластов HF*. Кроме того, на примере соединения **18** мы продолжили изучение механизма цитотоксического действия F16-конъюгатов [155, 156], оценив влияние гибрида **18** на клеточный цикл раковых и здоровых клеток с помощью проточной цитометрии (Рисунок 20) [157]. Как уже наблюдалось нами ранее на лейкозных клетках [158], цитотоксический эффект конъюгата **18** на карциномном раке многократно превысил цитотоксический эффект бетулиновой кислоты (ВА-F16: $IC_{50} = 2.1 \mu M$; ВА: $IC_{50} = 105 \mu M$). Все это свидетельствовало о том, что проникающий катион F16 значительно усиливает цитотоксическое действие бетулиновой кислоты. Для сравнения, известный препарат доксорубицин, применяемый для лечения опухолей молочной железы, оказывал сравнимое с конъюгатом цитотоксическое действие на обе исследуемые клеточные линии ($IC_{50} = 0.5-0.6 \mu M$).

Исследование влияния бетулиновой кислоты и соединения **18** на пролиферацию раковых клеток MCF-7 и здоровых клеток фибробластов методом проточной цитометрии в концентрациях, приведенных на рисунке 20, показало, что бетулиновая кислота в концентрации $5 \mu M$ не проявила антипролиферативного действия.

*Автор выражает глубокую благодарность д.б.н., проф. Белослудцеву К.Н. и к.б.н., доц. Дубинину М.В. (Марийский государственный университет, г. Йошкар-Ола, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино) за выполнение биологических исследований, результаты которых отражены на стр. диссертации 55, 56, 69-72, а также в совместных публикациях [155-157, 176]

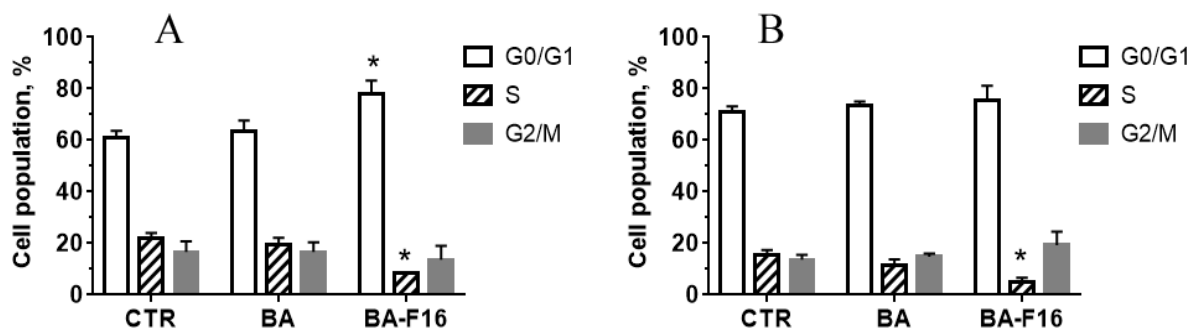


Рисунок 20 – Анализ клеточного цикла MCF-7 (А) и HF (В) после 24-часовой инкубации с **BA** (5 μ M) и **BA-F16** (1 μ M), **CTR** (контроль) – не инкубированные клетки. Данные представляют собой среднее стандартное отклонение трех независимых экспериментов (*указывает на $p < 0.05$ по сравнению с контролем)

Конъюгат **18** (BA-F16) оказывал влияние на клеточный цикл как клеток MCF-7, так и фибробластов человека. При этом наблюдалось увеличение числа клеток в фазе G0/G1, которое сопровождалось значительным уменьшением числа клеток в S фазе клеточного цикла. Это уменьшение можно объяснить тем, что не все клетки переходят из фазы G0/G1 в следующую S-фазу клеточного цикла. Из этого следует, что конъюгат BA-F16 влияет на жизнеспособность клеток MCF-7 и фибробластов посредством ингибирования пролиферации и остановки клеточного цикла в фазе G0/G1.

Таким образом, конъюгат **18** 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 селективность 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 для здоровых клеток.

2.2 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.

Из литературы известно, что конфигурация и количество гидроксильных групп в кольце А пентациклического тритерпеноида может оказать влияние на его биологические свойства, такие как противоопухолевая, противовоспалительная, противомикробная и гипогликемическая активность [159-165]. Найденные во многих медицинских растениях полигидроксилированные тритерпеноиды: маслиновая, коросолевая и азиатиковая кислоты, содержащие несколько гидроксильных групп в кольце А, характеризуются широким спектром биологических свойств, среди которых особый интерес вызывает их противоопухолевое действие (Рисунок 21) [135, 160, 166, 167].



Рисунок 21 – Структура природных полигидроксилированных тритерпеновых кислот

Так, в работе [162] из природных урсоловой и олеаноловой кислот была синтезирована серия новых тригидроксилированных пентациклических тритерпенов с гидроксильными группами в кольце А при С-1, С-2 и С-3 атомах (Рисунок 22А). При исследовании их антибактериальной активности было показано, что большинство производных проявили *in vitro* высокую ингибирующую активность против грамположительных бактерий (MIC, 1-64 μM) по сравнению с исходными соединениями (MIC > 100 μM). Исследования

взаимосвязи структуры и активности показали, что присутствие гидроксильных функций в положениях С-1, С-2 и С-3 и алкилэфирной функции в положении С-28 тритерпеноидов урсановой и олеановой структуры значительно усиливает антибактериальную активность против грамположительных бактерий.

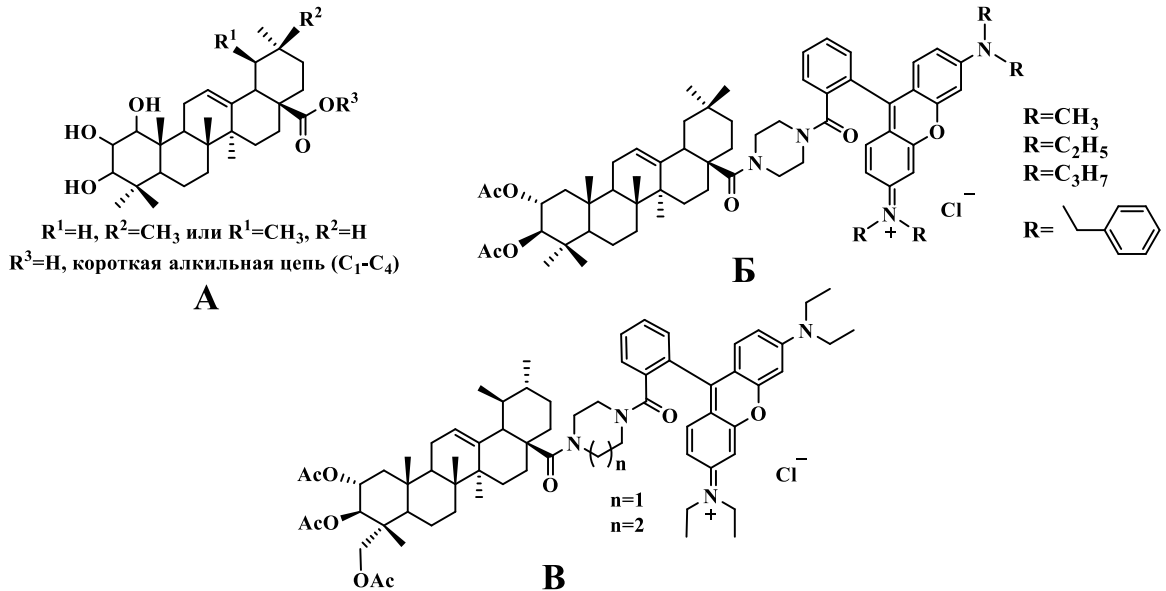


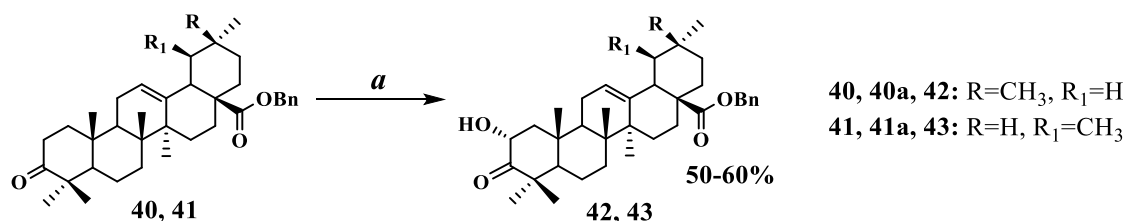
Рисунок 22 – Производные полигидроксилированных тритерпеновых кислот с высокой антибактериальной (А) и противоопухолевой (Б, В) активностью

В своих работах Csuk [135, 166] впервые синтезировал конъюгаты маслиновой и азиатиковой кислот с пиперазинродаминами и исследовал их противоопухолевую активность в сравнении с исходными природными кислотами. Полученные конъюгаты ацетатов маслиновой и азиатиковой кислот с родаминами были цитотоксичны для ряда линий опухолевых клеток человека, но в меньшей степени для незлокачественных фибробластов (Рисунок 22Б). Азиатиковая кислота показала себя как лидирующая структура для получения противоопухолевых митохондриально-направленных агентов, в которых высокая цитотоксическая активность сочеталась с высокой селективностью и возможностью преодолевать лекарственную устойчивость. Перспективность производных азиатиковой кислоты была также подтверждена на доклинических моделях опухоли человека [135, 168].

Основываясь на фактах, свидетельствующих о высокой активности полигидроксилированных тритерпеноидов, мы синтезировали ранее неизвестные F16-конъюгаты с маслиновой и коросолевой кислотами и исследовали их цитотоксическое действие.

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. Поэтому, чтобы избежать этого трудоемкого процесса, в литературе разработаны две альтернативные полусинтетические схемы получения маслиновой и коросолевой кислот из доступных олеаноловой и урсоловой кислот [160, 169, 170]. Структурная разница между олеаноловой и маслиновой кислотами или между урсоловой и коросолевой кислотами заключается в наличии дополнительной гидроксильной группы в С-2 положении в маслиновой и коросолевой кислотах. Принципиальное отличие описанных полусинтетических схем синтеза заключается в ключевой стадии введения гидроксильной группы в С-2 положение кольца А олеаноловой или урсоловой кислот (Схема 13).

I метод



II метод

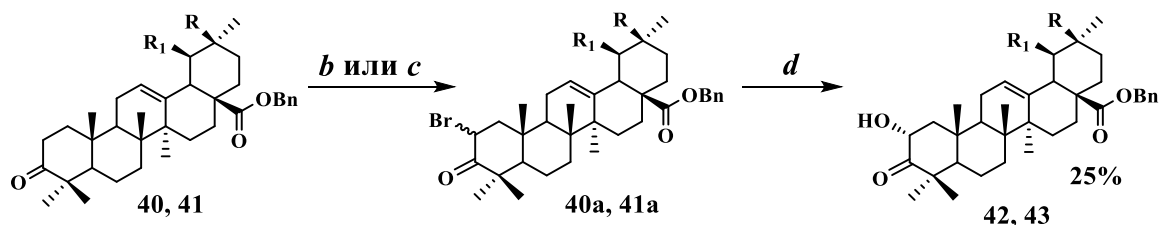


Схема 13 – Сравнение методов синтеза α -гидроксикетонов олеаноловой/урсоловой кислот

Реагенты и условия. (a) *m*-CPBA, H₂SO₄, MeOH–CH₂Cl₂, 0°C → 25°C, 21ч.; (b) пиридиний трибромид, AcOH, 25°C, 2ч.; (c) дибромид кислоты Мельдрума, Et₂O, 25°C, 12ч; (d) 2М р-р NaOH, ДМФА, 0°C, 20 мин.

По первому методу проводилось окисление метиленовой группы при С-2 атоме кольца А бензилового эфира олеаноновой (**40**) или урсоновой кислот (**41**) под действием м-хлорнадбензойной кислоты в присутствии каталитических количеств серной кислоты [160]. Образование целевых 2 α -гидроксикетонов **42** и **43** составило 50-60%. Отличием второго метода синтеза является получение бромидов **40a** и **41a**, содержащих атом брома при С-2 позиции кольца А. Бромиды получают действием на 3-кето тритерпеноиды пиридиний трибромида или дибромида кислоты Мельдрума [170, 171]. Затем проводят нуклеофильное замещение атома брома на гидроксильную группу воздействием на соединения **40a** или **41a** 2М раствором NaOH [170]. Мы провели синтез маслиновой и коросолевой кислот по первому и по второму методу, 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, трудно разделимых при очистке целевого продукта методом колоночной хроматографии на SiO₂.

Выполненный нами по первому методу многостадийный 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 дали тритерпеноиды **40** или **41** [115]. Обработка полученных 3-кето тритерпеноидов м-хлорнадбензойной кислотой в присутствии каталитических количеств серной кислоты привела к образованию в качестве единственных продуктов соответственных 2 α -гидроксикетонов **42** или **43**. Наблюдаемая при этом высокая стереоспецифичность 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 NaBH₄ в 2 α -гидроксикетонах **42** или **43** дало смесь диастереоизомерных 2,3-дигидроксилированных тритерпеноидов **44-47** с преимущественным

образованием 3β -эпимеров ($2\alpha,3\beta:2\alpha,3\alpha = 80\%:20\%$). Последующее хроматографическое разделение вицинальных диолов на колонке с SiO_2 дало целевые бензильные эфиры маслиновой и коросолевой кислот **44** и **45** в аналитически чистой форме. Синтез маслиновой и коросолевой кислот был завершён снятием бензильной защиты с карбоксильной функции тритерпенов **44** и **45** [160]. Полученные маслиновую и коросолевою кислоты трансформировали в бромалкиловые эфиры **48** и **49** взаимодействием с избытком дибромбутана в присутствии K_2CO_3 и конъюгировали с соединением F16 в ДМФА при 85°C . В результате были получены конъюгаты МК-F16 и КК-F16 **50** и **51** (Схема 14).

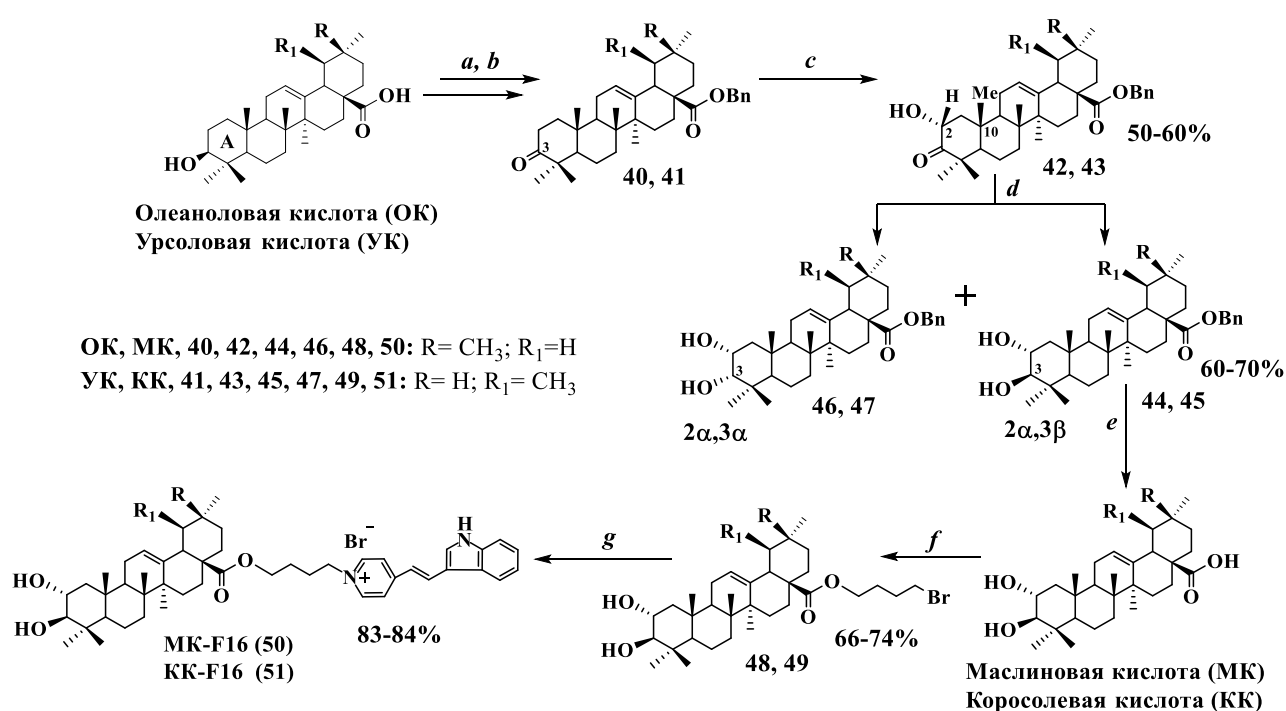


Схема 14 – Синтез конъюгатов маслиновой и коросолевой кислот с F16

Реагенты и условия. (a) VnCl , K_2CO_3 , ДМФА, 55°C , 2ч.; (b) CrO_3 , H_2SO_4 , ацетон, 0°C ; (c) *m*-CPBA, H_2SO_4 , $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$, $0^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$, 21ч.; (d) NaBH_4 (или $\text{NaBH}_4 - \text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), $\text{MeOH}-\text{TГФ}$, $-30^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$, 2ч.; (e) $\text{Pd-C}/10\%$, H_2 , $\text{MeOH}-\text{TГФ}$, 20°C ; (f) 1,4-дибромбутан, K_2CO_3 , CH_3CN , ДМФА, 50°C , 2ч.; (g) (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридин, ДМФА, 85°C , 12ч.

Структура диастереоизомерных продуктов восстановления **44-47** была определена по одномерным спектрам ЯМР ^1H . Для соединений **44** и **45**

наблюдалась КССВ ($^3J_{\text{H}(2),\text{H}(3)} = 9.0$ Гц) протона H(3) с аксиальным протоном H(2), что указывало на аксиальное расположение протона H(3) и, следовательно, на экваториальное расположение (β -ориентацию) 3-ОН группы, для сравнения, в α -эпимерах **46** и **47** КССВ $^3J_{\text{H}(2),\text{H}(3)} = 2.0$ Гц. Стереоселективность реакции заметно повышалась при использовании NaBH_4 , модифицированного $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ по методу [172]. При этом были получены 3β -эпимеры **44** и **45** с селективностью 95-96%. Для сравнения мы использовали другую соль лантанида – $\text{SmCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, но она не оказала того же эффекта на селективность что $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

В литературе описано использование $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ как добавки для стереоселективного восстановления циклогексанонов в экваториальные спирты, включая стероидные кетоны (восстановление по Луше) [172, 173]. Предполагается, что восстановление кетонов под действием иона церия протекает с образованием комплекса «церий – кетогруппа», который заметно усиливает «аксиальную» атаку боргидридом с последующим образованием экваториального спирта. Бурное выделение газообразного водорода указывает на образование алкоксиборгидридов, которые, собственно, и являются восстановителями (Рисунок 23).

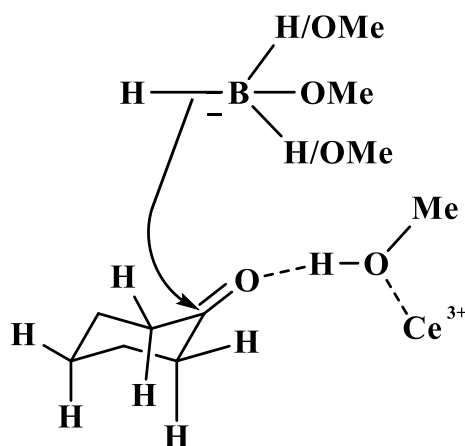


Рисунок 23 [173] – Механизм реакции восстановления кетонов NaBH_4 в присутствии $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Мы проводили реакцию восстановления при двухмольном избытке NaBH_4 и эквимольных количествах $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ по отношению к кетону в смеси растворителей MeOH –ТГФ при комнатной температуре в течение двух часов.

Конъюгаты F16 с азиатиковой кислотой **54** и **54a** получали из коммерчески доступной природной кислоты, которую трансформировали в ацетат **52** взаимодействием с AcCl в ТГФ в присутствии пиридина и DMAP. Азиатиковую кислоту и триацетат **52** трансформировали в бромалкиловые эфиры **53** и **53a**. Синтез гибридных соединений **54** и **54a** завершили взаимодействием эфиров **53** и **53a** с (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридином в ДМФА при 85°C с выходом 81-82% (Схема 15).

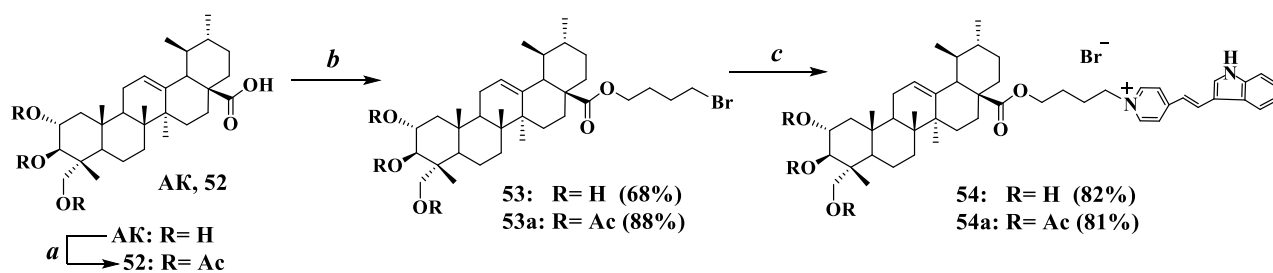


Схема 15 – Синтез конъюгатов F16–азиатиковая кислота

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

Нами также был разработан стереоселективный метод синтеза ранее неизвестного аналога бетулиновой кислоты, содержащего 1 α ,2 β ,3 β -триацетокси функционализированное кольцо А. Полигидроксилированный лупановый тритерпеноид **61** трансформировали в F16-конъюгат **63**, который исследовали на противоопухолевую активность в отношении клеток аденокарциномы легких H1299 и A549 и незлокачественных клеток MEFs (мышинные эмбриональные фибробласты) [174].

Для предотвращения скелетных перегруппировок, характерных для лупанового скелета в кислой среде, С-20 двойную связь в изопропилиденовом фрагменте бетулиновой кислоты предварительно гидрогенировали. Трансформацию дигидробетулиновой кислоты **55** в бензиловый эфир триацетилированного лупанового тритерпеноида **61** проводили по методу [162]. Первые этапы синтеза, заключающиеся в окислении 3-ОН группы реагентом

Джонса в ацетоне и бензилировании 28-COOH функции, дали соединение **56** [115]. Формирование енонового фрагмента в кольце А тритерпеноида **56** проводили действием PhSeCl и м-хлорнадбензойной кислоты в присутствии пиридина с образованием соответствующего енона **57**. Основная синтетическая задача при получении тритерпеноида **61** с тремя ацетильными группами в кольце А заключалась в стереоселективном эпоксицировании двойной связи в 1,2-еноновом фрагменте кольца А бензилового эфира тритерпеноида **57** и стереоселективном раскрытии эпоксидного кольца. Эпоксицирование двойной связи енона **57** с использованием 30% H₂O₂ в щелочной среде дало 1 α ,2 α -эпоксикетон **58** в качестве единственного продукта реакции, которая протекала с высокой стереоспецифичностью за счет жесткого стереохимического контроля со стороны β -ориентированной метильной угловой группы при С-10 атоме. Восстановление 3-кето группы в кольце А эпоксикетона **58** под действием NaBH₄, дало смесь диастереоизомеров **59** (3 β -ОН) и **59a** (3 α -ОН) (3 β :3 α = 4:1), которые были разделены методом колоночной хроматографии на SiO₂. Хроматографически выделенный основной диастереоизомер **59** (выход 59%) был трансформирован в соответствующий ацетат **60**. Стереоселективное раскрытие эпоксидного кольца в соединении **60**, катализируемое HClO₄, и ацетилирование полученного оксигенированного тритерпеноида без его предварительной очистки, дали с высокой стереоселективностью бензильный эфир 1 α ,2 β ,3 β -триацетокси производного дигидробетулиновой кислоты **61** с выходом 66% после его выделения методом колоночной хроматографии на SiO₂. Ранее подобный стереохимический результат кислотного раскрытия эпоксидного кольца в 1,2-эпокси-терпеноидах наблюдался при получении 1 α ,2 β ,3 β -полигидроксилированных производных урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот. Структура этих оксигенированных тритерпеноидов урсанового и олеанового типа была надежно доказана на основе анализа спектров 2D ЯМР и подтверждена рентгеноструктурным анализом [162, 175]. Синтез целевой гибридной молекулы **63** был завершён снятием бензильной защиты в соединении **61**, получением бромалкилового эфира **62** и конъюгацией последнего с (E)-4-(2-

(1H-индол-3-ил)винил)пиридином при 85°C в ДМФА. Аналогичным образом было получено гибридное соединение F16 и оксигенированного тритерпеноида урсановой структуры **67** (Схема 16).

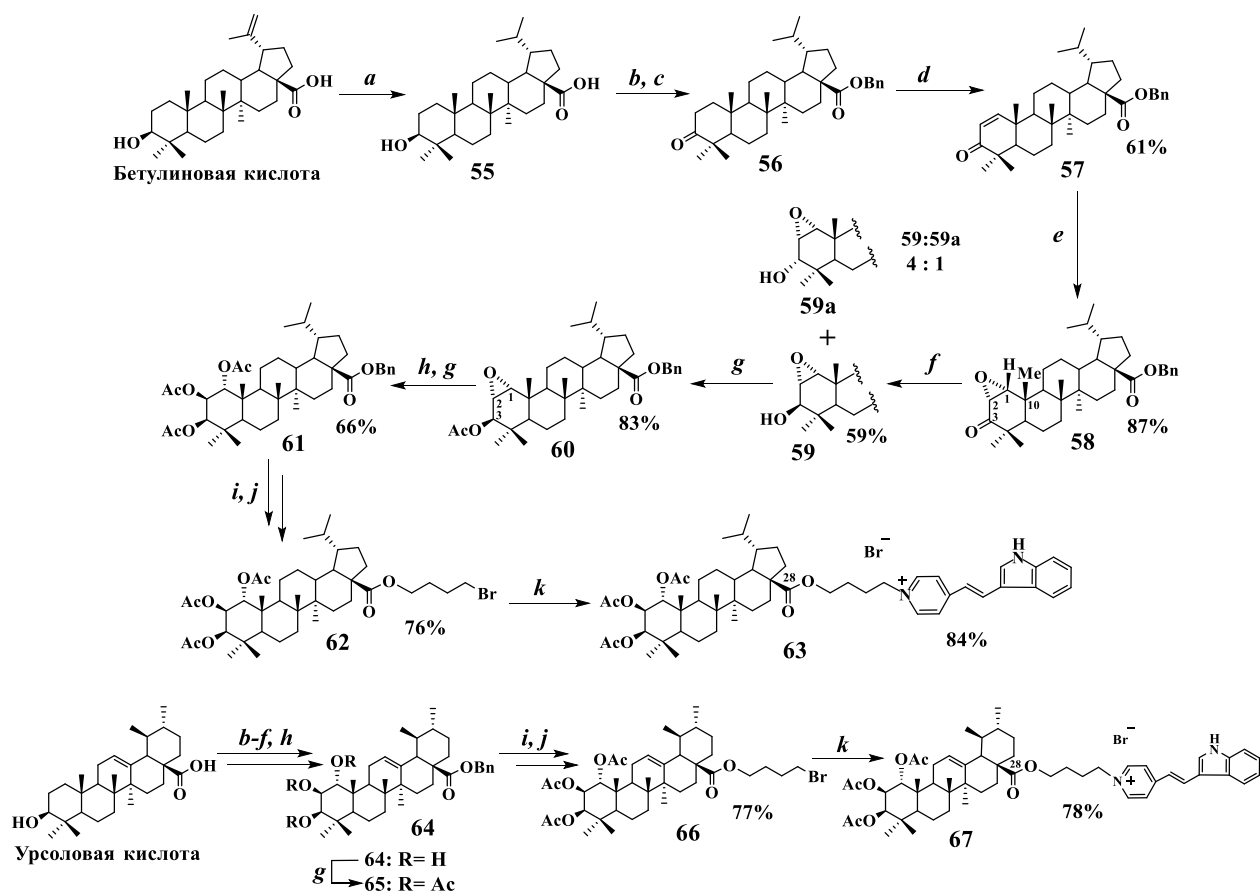


Схема 16 – Синтез F16-конъюгатов полигидроксилированных аналогов бетулиновой и урсоловой кислот **63** и **67**

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

Структуры всех новых и известных ранее соединений были определены с помощью ИК, ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Относительная конфигурация эпоксидного кольца в соединениях **58-60** и ориентация ацетильных функций в кольце А в соединениях **60-63** и **65-67** были

установлены с применением экспериментов DEPT, HMBC, HSQC, COSY и NOESY.

Так, в кетоэпоксиде **58** сигналы метиновых протонов при C-1 и C-2 атомах кольца А проявляются в виде двух дублетов в области δ 3.36 и 3.57 м.д. с КССВ = 4.0 Гц. NOE-корреляция, наблюдаемая между протонами H-25 β в β -ориентированной метильной ангулярной группе (Me-25) и протонами H-1 и H-2, свидетельствует о том, что эти протоны находятся в β -ориентации и следовательно эпоксидное кольцо α -ориентировано (Рисунок 24).

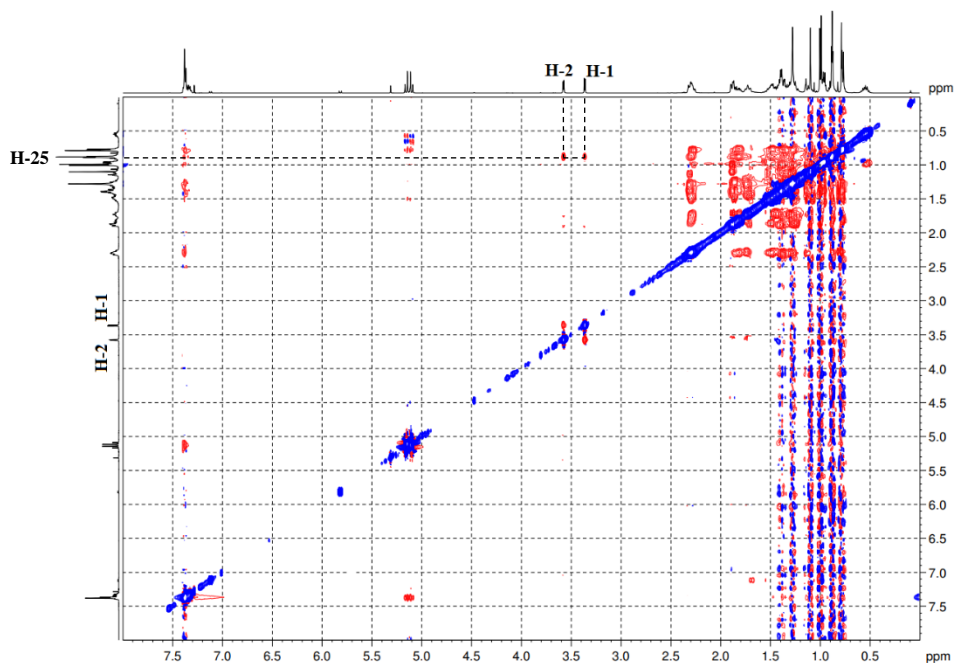


Рисунок 24 – Данные экспериментов ЯМР NOESY для соединения **58**

В соединениях **59** и **60** протоны при C-1, C-2 и C-3 атомах были отнесены в соответствии с данными спектров HSQC, HMBC и COSY. Относительная конфигурация 3 β -ОН и 3 β -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. Конфигурация 3 β -ОАс функции была также подтверждена сильной NOE-корреляцией, наблюдаемой между протонами H-23 α в α -ориентированной

метильной группе (Me-23) и протонами Н-5 и Н-3, свидетельствующей о том, что эти протоны находятся в α -ориентации (Рисунок 25).

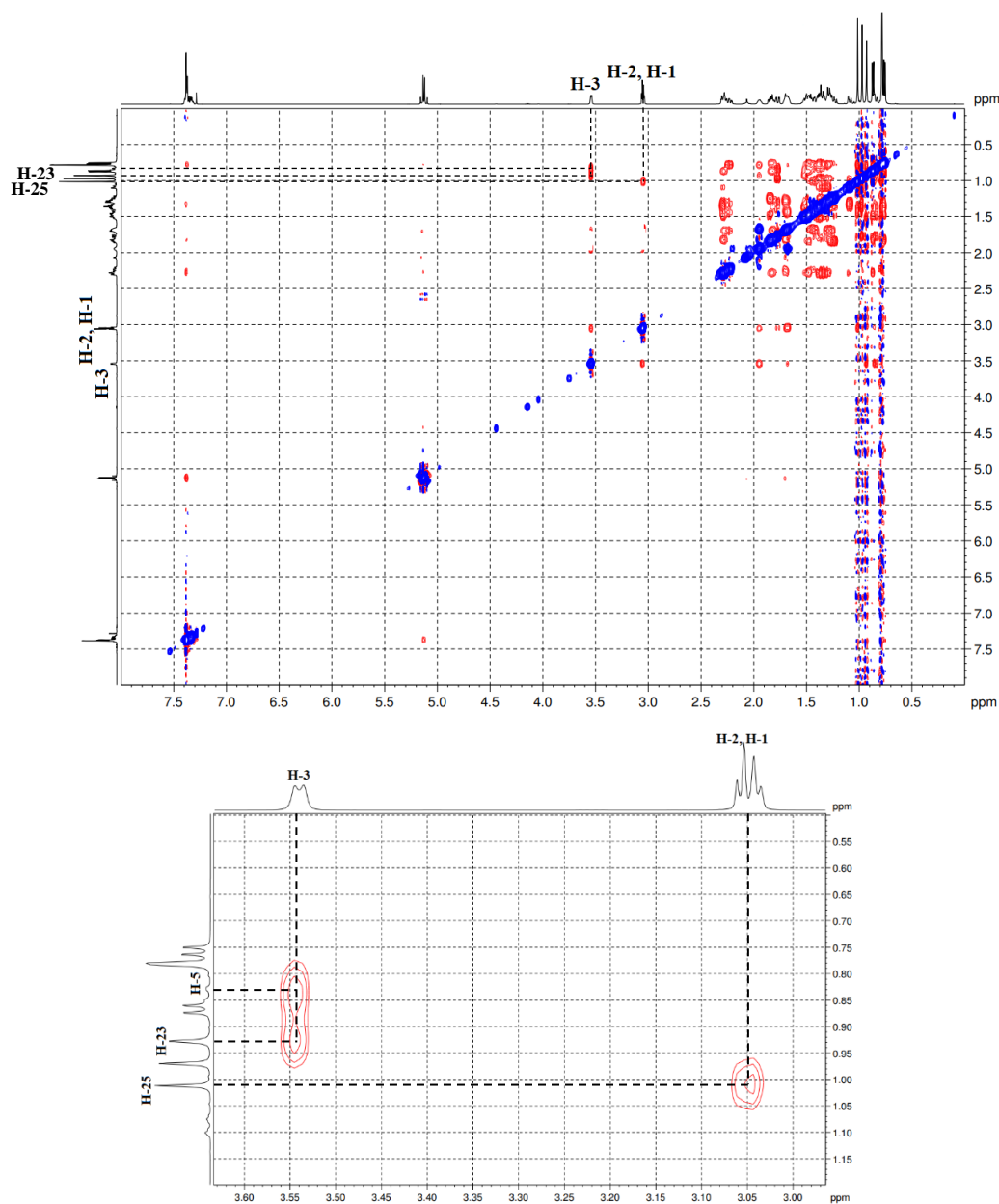


Рисунок 25 – Данные экспериментов ЯМР NOESY для соединения **59**

В соединениях **61-63** относительная конфигурация 1α -OAc группы была установлена на основании спектров NOESY, в которых наблюдалась сильная корреляция между протонами Н-1 и Н-25 β , а 2β -OAc конфигурация была подтверждена NOE-корреляцией, наблюдаемой между Н-2 и Н-3 (Рисунок 26).

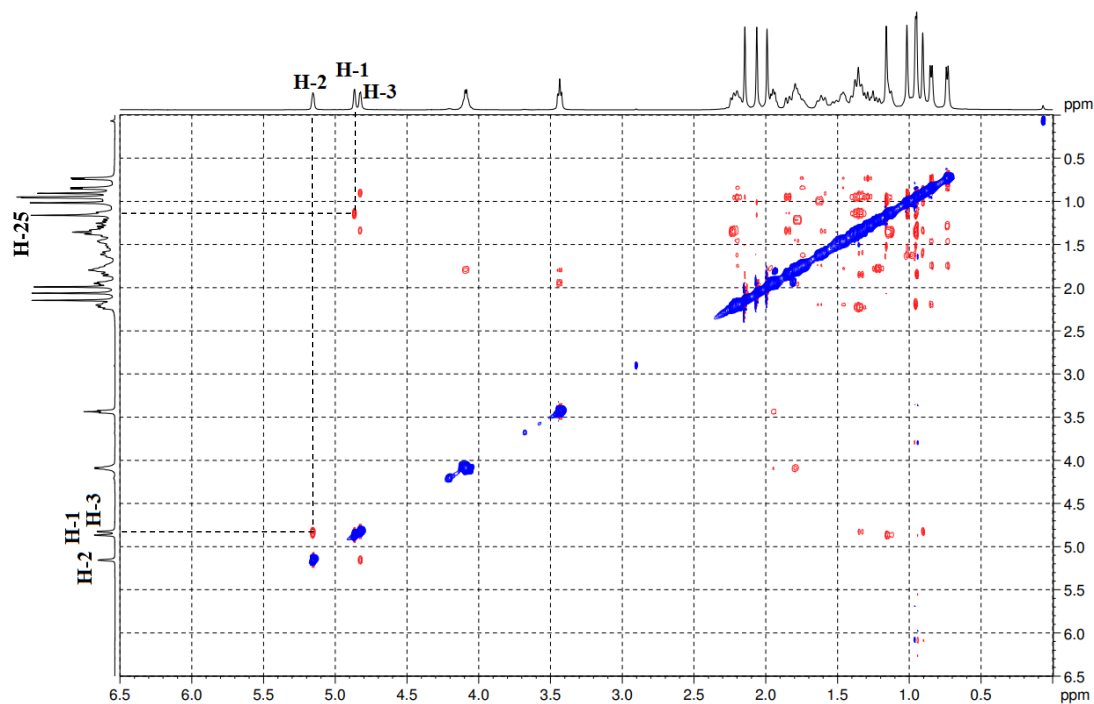


Рисунок 26 – Данные экспериментов ЯМР NOESY для соединения **62**

Конъюгаты F16 с маслиновой и коросолевой кислотами **50** и **51** были исследованы *in vitro* на их цитотоксическую активность на четырех опухолевых клеточных линиях аденокарциномы рака легких человека, карциномы молочной железы и на здоровых клетках фибробластах человека (HF), ДМСО использовали в качестве контроля [176]. Чтобы оценить эффект наличия дополнительной гидроксильной группы в С-2 положении кольца А в F16-производных маслиновой и коросолевой кислот на противоопухолевую активность, мы также оценили цитотоксичность конъюгатов урсоловой и олеаноловой кислот **24** и **28**. Исходные соединения – урсоловую и олеаноловую кислоты использовали как стандарт (Таблица 2).

Таблица 2 – Цитотоксическая активность (IC_{50} , μM) конъюгатов **24**, **28**, **50** и **51**, олеаноловой (ОК) и урсоловой (УК) кислот в отношении линий карцином

Соединение	Карцинома легких человека		Карцинома молочной железы		Здоровые клетки
	H1299	A549	MCF7	BT474	HF
28	0.93 ± 0.07	0.74 ± 0.09	1.52 ± 0.16	4.34 ± 0.28	2.05 ± 0.58
50	10.50 ± 2.44	13.52 ± 2.02	7.44 ± 0.78	11.05 ± 2.51	9.30 ± 2.56
24	2.80 ± 0.25	2.40 ± 0.30	1.36 ± 0.74	5.18 ± 0.15	4.98 ± 0.9
51	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 **28** превзошел по противоопухолевой активности исходную олеаноловую кислоту в отношении исследуемых опухолевых клеток максимально в 318 раз. Цитотоксичность конъюгата коросолевой кислоты **51** 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, соответственно, для конъюгатов **28** и **24**, 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 неоксигенированными структурными аналогами. Среди исследованных соединений, конъюгат **24** показал наибольшую разницу в индексе селективности между опухолевыми клетками и фибробластами в диапазоне от 2 до 4. В результате, конъюгаты **28**, как наиболее цитотоксичный, и **24**, как наиболее селективный, были выбраны нами для исследований механизма их цитотоксического действия.

С использованием метода проточной цитометрии было показано, что цитотоксический эффект конъюгатов **24** (УК-F16) и **28** (ОК-F16) в раковых клетках MCF-7 или BT474 может быть связан с их митохондриально-

ориентированным, прооксидантным действием и чрезмерным образованием активных форм кислорода (АФК) в клетке [176]. Так, типичные данные проточной цитометрии для количества АФК-положительных и АФК-отрицательных клеток в культуре клеток BT474 свидетельствовали о том, что нативные кислоты при концентрации 25 μM не оказывают значительного влияния на производство АФК и, следовательно, уровень АФК-положительных клеток совпадает с контролем. В то же время их конъюгаты при значительно более низкой концентрации (2 μM ОК-F16 и 3 μM УК-F16) значительно увеличивают уровень АФК-положительных клеток, что указывает на большое количество супероксида в клетках при наличии этих конъюгатов (Рисунок 27).

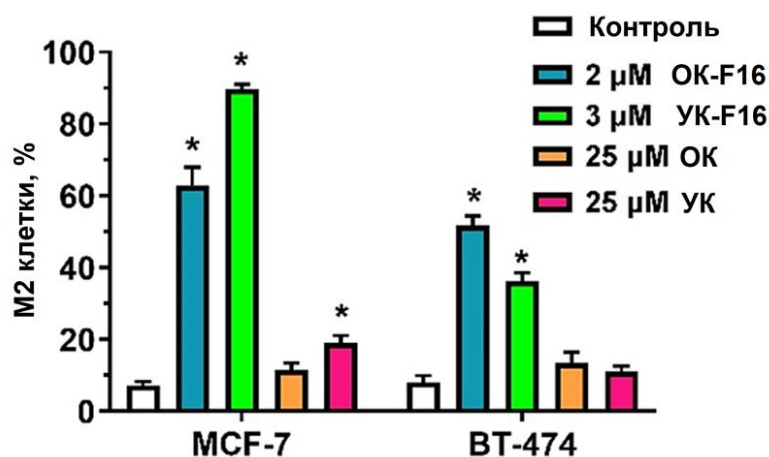


Рисунок 27 – Оценка продукции активных форм кислорода (АФК). Показаны средние значения \pm SEM (*указывает на $p < 0.05$ по сравнению с контролем).

Мы также оценили влияние синтезированных конъюгатов олеаноловой и урсоловой кислот на функциональную активность митохондрий. В качестве объекта исследования были использованы изолированные митохондрии печени крысы. Установлено, что испытываемые конъюгаты вызывают дисфункцию органелл, которая проявляется в значительном снижении эффективности окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ в митохондриях, а также снижении мембранного потенциала органелл. При этом F16-конъюгаты значительно превосходили нативные урсоловую и олеаноловую кислоты в качестве индукторов дисфункции митохондрий. Этот эффект конъюгатов, по-

видимому, связан с их мембранотропной активностью. Действительно, оба испытываемых конъюгата способны более эффективно снижать митохондриальный мембранный потенциал, а также модулировать активность комплексов дыхательной цепи органелл, локализованных во внутренней мембране (Рисунок 28).

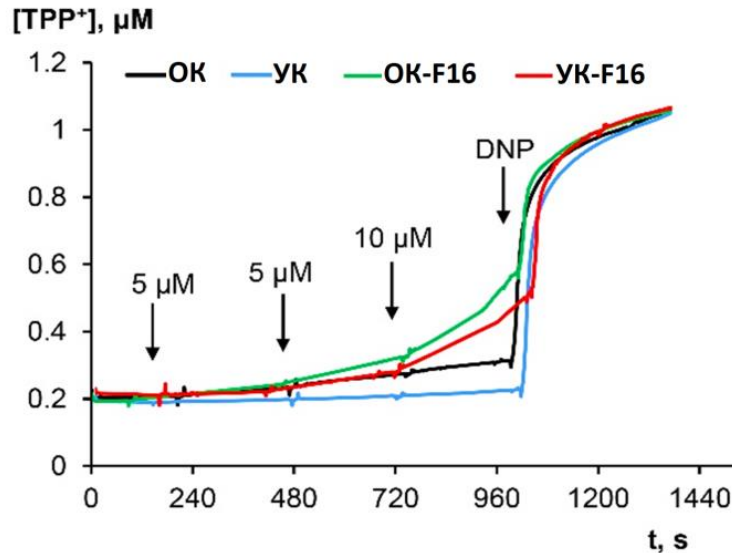


Рисунок 28 – Влияние конъюгатов и нативных кислот на мембранный потенциал митохондрий печени крыс. DNP – 2,4-динитрофенол

2.3 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 с интенсивной флуоресценцией в видимой области (поглощение 431 нм, эмиссия 544 нм) [149], 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. 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 29: А-С) [157].

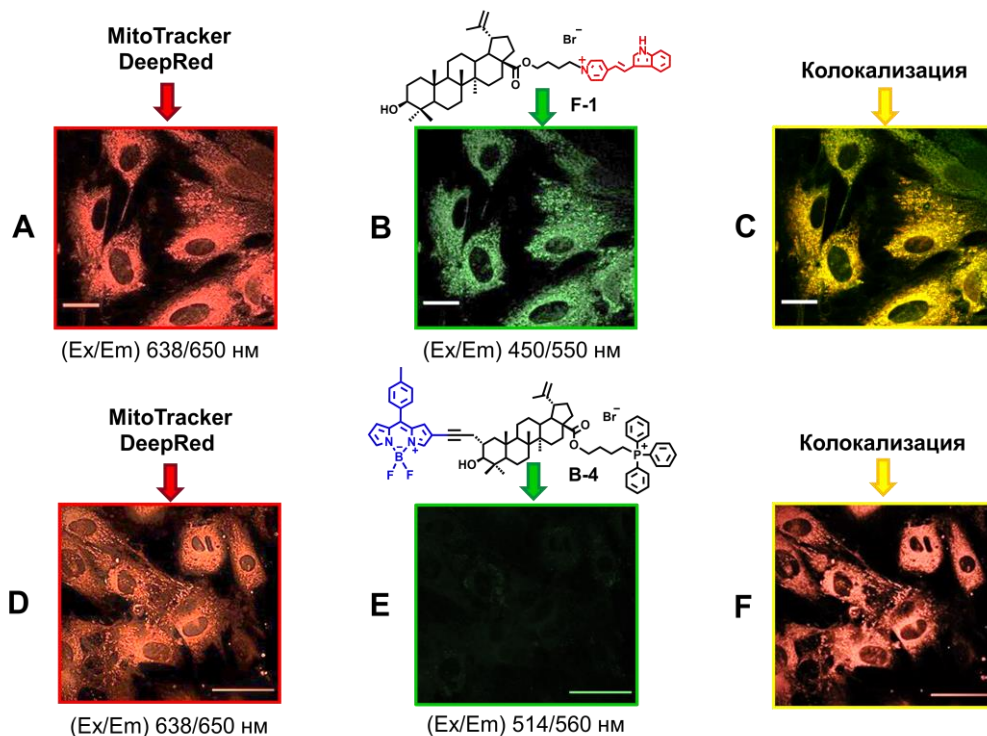


Рисунок 29 – Внутриклеточная локализация F16- и TPP⁺-производных тритерпеноидов в митохондриях эндотелиальных клеток мыши показана на примере конъюгатов **15** (F-1) и **78** (B-4)

Кроме того, мы попытались сравнить внутриклеточное распределение F16-конъюгатов с аналогичными по структуре трифенилфосфониевыми конъюгатами. Но поскольку трифенилфосфониевый катион, в отличие от F16, лишен флуоресцентных свойств, перед нами встала задача – введение флуоресцентного красителя, в данном случае боро-дифторо-дипирометена, известного как BODIPY, в молекулу конъюгата бетулиновой кислоты с трифенилфосфониевым катионом.

Известно несколько работ, в которых описан синтез и биологический анализ конъюгатов бетулиновой кислоты с эффективным флуоресцентным красителем BODIPY [177-179]. В этих BODIPY-маркированных тритерпеноидах молекула флуорофора была ковалентно связана различными линкерами с 3-ОН или 28-

COOH функциональными группами тритерпенового ядра, что в большинстве случаев привело к снижению или даже к полной потере цитотоксического действия (Рисунок 30). Полученные результаты подтверждают уже хорошо известные факты значительного влияния C-3 и C-28 боковых цепей на биологическую активность тритерпеновых кислот [102].

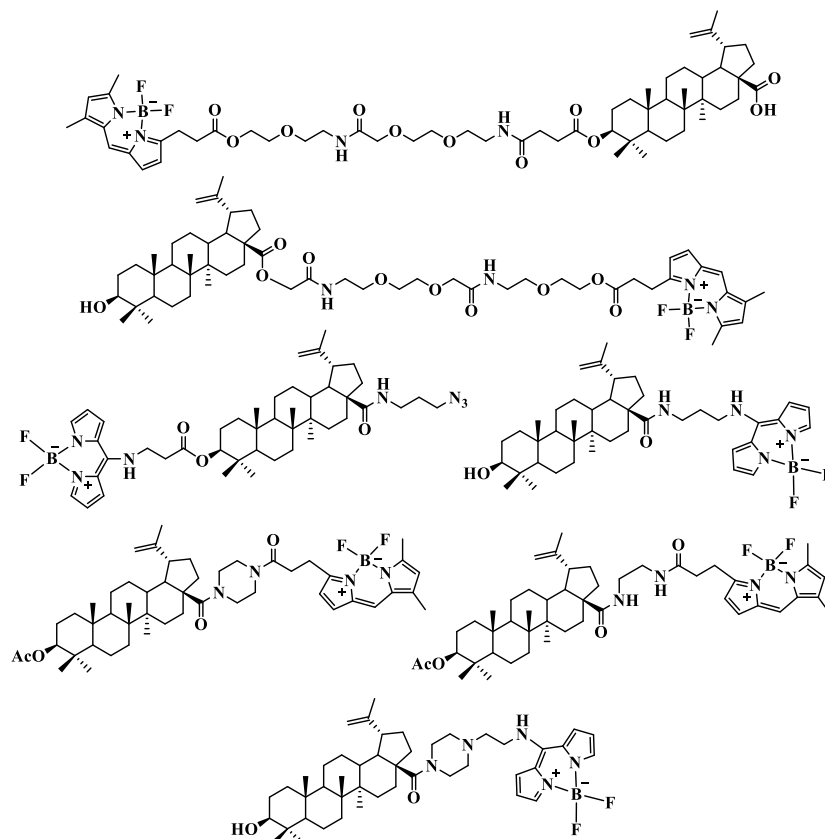


Рисунок 30 – Примеры конъюгатов бетулиновой кислоты, связанных с флуоресцентным красителем BODIPY по C-3 или C-28 позициям

Поэтому в качестве ключевой стадии синтеза нами была использована реакция кросс-сочетания между C-2 пропилильным производным бетулиновой кислоты и галоидными производными флуоресцентного красителя, содержащего йодную функцию при C-2 или C-8 позициях BODIPY-платформы. Разработанная нами процедура ковалентного связывания флуорофора BODIPY с бетулиновой кислотой, позволила нам сохранить в тритерпеновом ядре нативные 3-OH и 28-COOH функции, которые могут быть трансформированы в трифенилфосфониевые производные [180, 181].

На первом этапе синтеза – конденсации пирролов с ароматическими альдегидами, в качестве катализаторов, протонирующих или хелатирующих карбонильный атом кислорода, обычно используют трифторуксусную кислоту или $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, а реакции проводят в CH_2Cl_2 [182]. Мы синтезировали дипиррометаны **68** и **70** с применением мало известного в этих трансформациях кислотного катализатора InCl_3 [183]. Реакции проводили при 20-мольном по отношению к альдегидам избытке пиррола, который одновременно играл роль реагента и растворителя. Эти условия позволили значительно уменьшить образование побочных продуктов олигомеризации пиррола и получить целевые дипиррометаны **68** и **70** с хорошими выходами. Трансформацию дипиррометанов **68** и **70** в комплексные соединения **69** и **71** выполнили «one-pot» методом в две стадии с использованием в качестве окислителя 2,3-дихлор-5,6-дициано-*p*-бензохинона (DDQ) с последующим одновременным добавлением $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ и Et_3N [184]. Соединение **69**, содержащее атом йода в фенильном кольце, связали непосредственно с пропилильным производным бетулиновой кислоты, а соединение **71**, с метильной группой в фенильном кольце, подвергли йодированию по пиррольному кольцу с использованием эквимолярного количества ICl в смеси растворителей $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ по методу [185]. Реакция протекала с высокой хемоселективностью и дало после очистки методом колоночной хроматографии на SiO_2 целевой моно-йодид **72** (Схема 17).

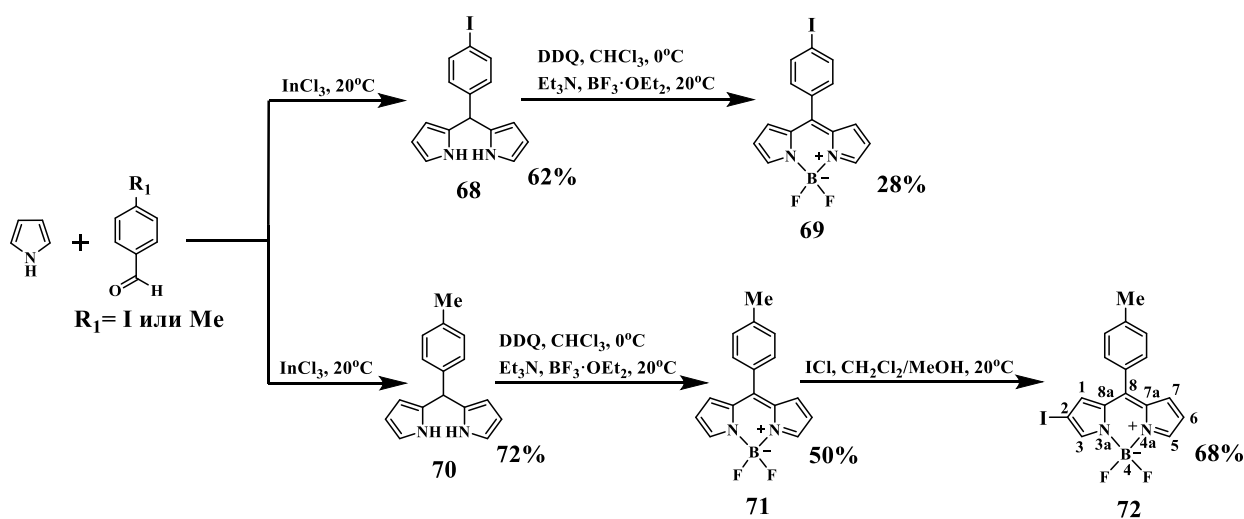


Схема 17 – Синтез йодсодержащих производных BODIPY

В качестве тритерпенового компонента в реакции Соногишира послужило С-2 пропилильное производное бетулиновой кислоты **73**, полученное в несколько стадий из бетулиновой кислоты по разработанному нами ранее методу [152], которое было трансформировано в бромалкиловый эфир **74**. Синтез аддуктов ВODIPY-БК **75** и **76**, связанных через фенилпропилильный или пропилильный мостики при мезо-положении или при С-2 позиции ВODIPY-платформы, осуществили кросс-сочетанием флуорофоров **69** и **72** с бромалкиловым эфиром **74**. Реакцию Соногаширы проводили в присутствии катализаторов $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2/\text{CuI}$ в атмосфере аргона в смеси растворителей $\text{Et}_3\text{N}/\text{DMF}$ в течение 1-3 ч при комнатной температуре. Последующее взаимодействие тритерпеноидов **75** и **76** с трифенилфосфином при кипячении в CH_3CN дало соответствующие трифенилфосфониевые соли **77** и **78** (Схема 18).

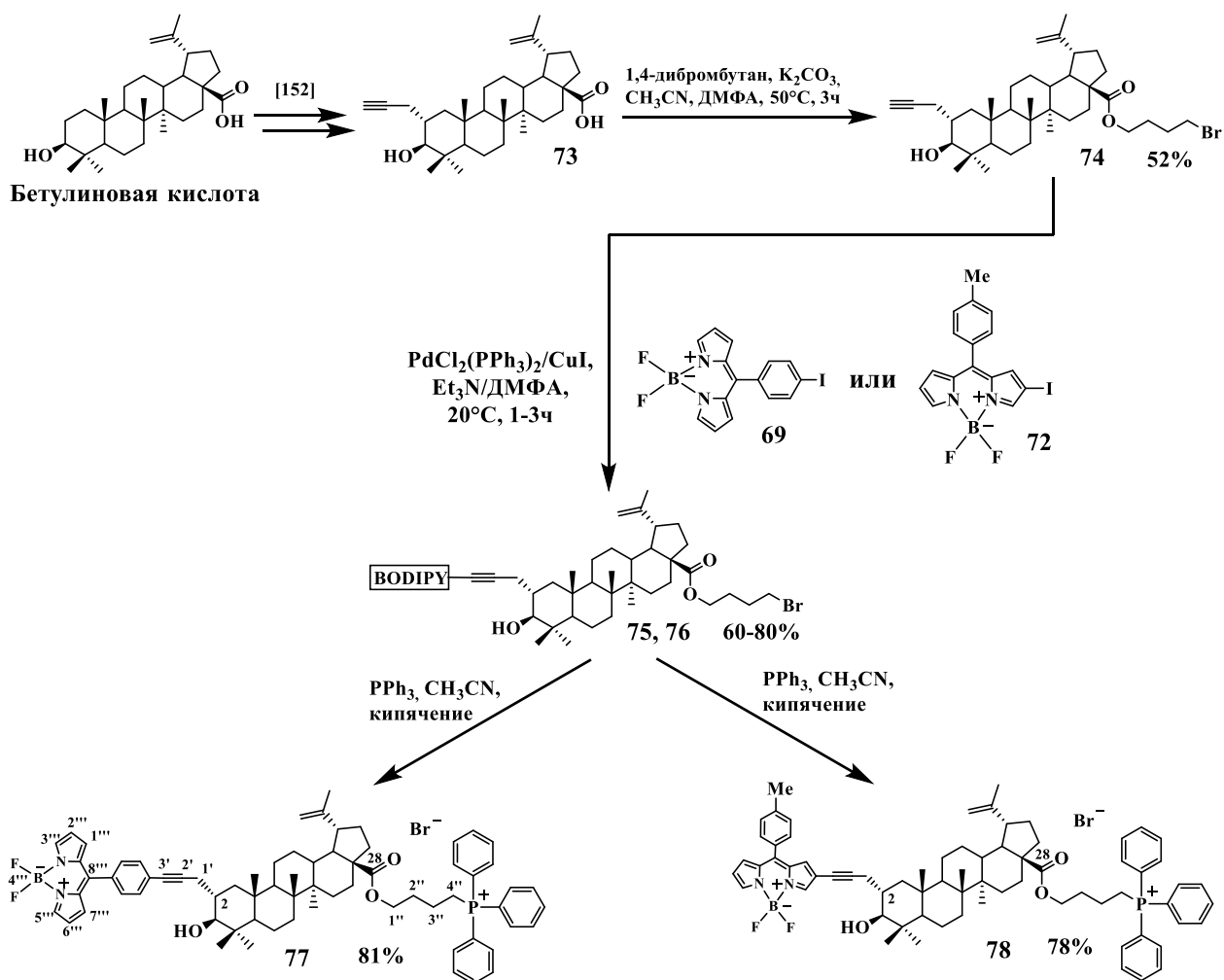


Схема 18 – Синтез ВODIPY-меченых конъюгатов бетулиновой кислоты с трифенилфосфониевым катионом

Структуры соединений **75-78** подтверждены данными одномерных (^1H , ^{13}C , АРТ), двумерных гомо- (COSY, NOESY) и гетероядерных (HSQC, HMBC) ЯМР-экспериментов. Пики молекулярных ионов в масс-спектрах и сопоставление элементного анализа с ожидаемым составом соединений подтвердили идентичность соединений **75-78**. Данные спектров ЯМР полученных конъюгатов различались незначительно, поэтому анализ спектров ЯМР приведен нами на примере одного соединения – конъюгата **77**. Так, в спектре ЯМР ^{13}C соединения **77** наблюдается сдвиг сигналов атомов углерода ацетиленовой связи С-2' и С-3' в слабое поле (92.5 и 81.3 м.д.) по сравнению с пропиловым производным бетулиновой кислоты **74** (70.0 м.д.). Кроме того, в спектре ЯМР ^{13}C отчетливо виден сигнал четвертичного атома углерода фенильного кольца в области 127.1 м.д., который мы отнесли к атому углерода, связанному с ацетиленовым фрагментом. В спектре ЯМР ^1H соединения **77** присутствует мультиплетный сигнал в области 7.54 м.д., относящейся к протонам фенильного кольца, а также сигналы протонов пиррольных колец, проявляющиеся в виде дублетов ($^2J_{\text{HH}} = 4.0$ Гц) в области 6.94 (H-1'', H-7''), 6.56 (H-2'', H-6'') и синглета в области 7.93 (H-3'', H-5'') м.д. Остальные сигналы в спектрах ЯМР ^1H , ^{13}C соответствуют структуре углеродного скелета лупанового тритерпеноида [152].

Известно, что арильный заместитель в мезо-положении флуорофоров BODIPY, расположенный почти перпендикулярно ядру BODIPY, мало участвует в электронном сопряжении и не оказывает существенного влияния на изменение длин волн поглощения и эмиссии красителя [182]. Напротив, введение π -электронных доноров, таких как фенилэтинильная или этинильная группы в 2,6- или 3,5-позиции BODIPY платформы, может привести к заметному смещению в красную область длин волн абсорбции и эмиссии производных BODIPY по сравнению с незамещенной молекулой флуорофора [186, 187]. Как следует из данных, приведенных в таблице 3 и на рисунке 30, полученные нами результаты соответствуют этой закономерности.* Связывание тритерпенового ядра с BODIPY

*Автор выражает глубокую благодарность к.ф.-м.н., с.н.с. Тухбатуллину А.А. за проведение фотофизических исследований соединений **75-78**.

при С-8 позиции красителя через фенилэтинильный линкер в соединениях **75** и **77** не повлияло на положение максимумов поглощения и фотолюминесценции в сравнении с исходным флуорофором **69**. Напротив, введение атома йода в С-2 позицию пиррольного кольца платформы BODIPY или конъюгация тритерпеноида с BODIPY через ацетиленовый фрагмент, сопряженный с пиррольным кольцом, привели к заметному батохромному сдвигу максимума поглощения и эмиссии как флуорофора **72**, так и флуоресцентных соединений **76** и **78** (Таблица 3, Рисунок 31).

Таблица 3 – Спектральные и люминесцентные свойства производных BODIPY **69**, **72** и конъюгатов BODIPY-бетулиновая кислота **75-78** при T=298 K в MeOH

Соединение	Растворитель	Абс. ^a λ_{\max} , нм	$\varepsilon \times 10^4$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	ϕ	ФЛ λ_{\max} , нм	Стокс. сдвиг нм
69^b	MeOH	499	1.6	0.05	514	15
72^b	MeOH	523	2.2	0.03	540	17
75	MeOH	499	2.9	0.01	520	21
76	MeOH	535	1.7	0.05	573	38
77	MeOH	500	2.3	0.02	519	19
78	MeOH	530	0.8	0.14	568	38

^a Поглощение (λ_{\max} , нм) и фотолюминесценция (ФЛ) (λ_{\max} , нм) длина волны максимума; молярное поглощение ($\varepsilon \times 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$) на максимальной длине волны; квантовый выход ФЛ (ϕ).

^b Литературные данные [185] и [188]

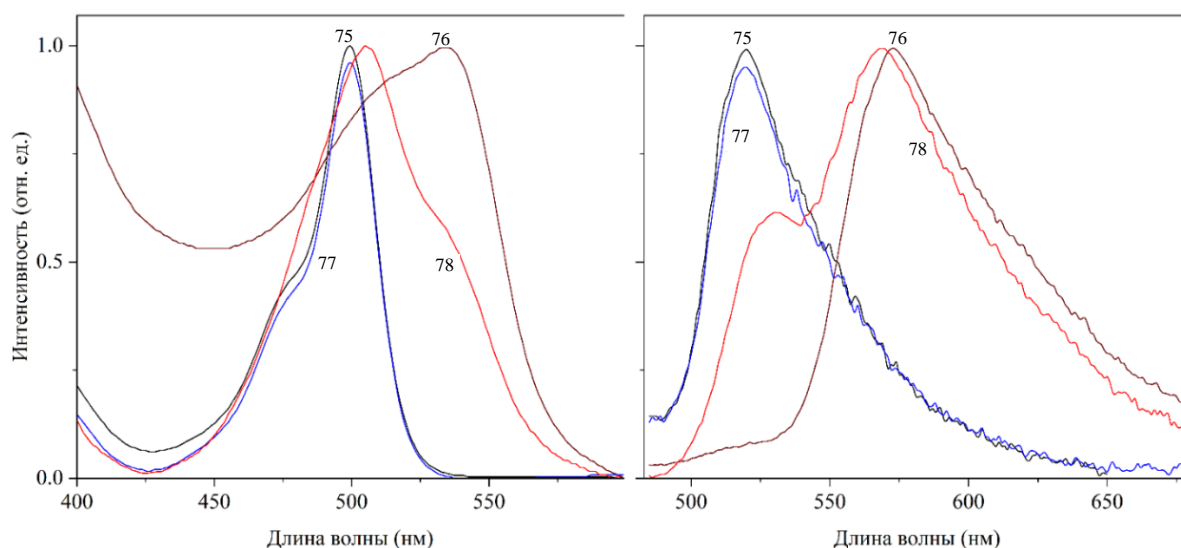


Рисунок 31 – Абсорбция и эмиссия соединений **75-78**. T = 298 K, C = 10^{-5} моль \cdot л $^{-1}$ в MeOH, $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм, Fluorolog-3, $\Delta\lambda = 1$ нм.

Однако, полученные соединения с трифенилфосфониевым катионом, в которых в качестве флуоресцентной метки был BODIPY, несмотря на проявленные хорошие флуоресцентные свойства, не давали флуоресценции поскольку, по-видимому, не преодолевали внутриклеточные мембраны и не проникали в клетку, в отличие от конъюгатов с F16 (Рисунок 29: D-F).

Таким образом, нами был разработан эффективный метод синтеза BODIPY-флуоресцентных проб трифенилфосфониевых производных бетулиновой кислоты, в которых молекула флуорофора BODIPY связана с тритерпеновым ядром при С-2 позиции кольца А пропилильным или фенилпропилильным мостиками. Конъюгаты **76** и **78**, содержащие в пропилильном мостике ацетиленовый фрагмент, сопряженный с пиррольным кольцом красителя, показали значительный батохромный сдвиг максимумов флуоресценции и увеличение стоксовых сдвигов относительно конъюгатов **75** и **77** и исходных флуорофоров **69** и **72**. Разработанная нами методология может найти применение в синтезе других конъюгатов BODIPY-тритерпеноид в качестве потенциальных флуоресцентных проб для биологических исследований.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК-спектры получали на спектрометре «Vertex 70v» в тонком слое или в растворе в CHCl_3 . Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на приборе «Bruker AVANCE-500» (рабочая частота для ^1H 500.13 МГц; для ^{13}C 125.78 МГц) или на приборе «Bruker AVANCE-400» (рабочая частота для ^1H 400.13 МГц; для ^{13}C 100.62 МГц), внутренний стандарт Me_4Si , растворитель CDCl_3 , MeOD , DMSO . Масс-спектры записывали на спектрометре «LCMS-2010 EV» (Shimadzu) или на спектрометре «Bruker–AutoflexIII» в режиме MALDI TOF с регистрацией положительных ионов и использованием в качестве матриц синапиновой кислоты или на спектрометре с высоким разрешением «Bruker maXis Impact». Оптическое вращение определяли на поляриметре «Perkin–Elmer-141», $[\alpha]_D$ – удельное вращение, $(\text{град} \cdot \text{мл}) \cdot (\text{г} \cdot \text{дм})^{-1}$, c – концентрация раствора, $\text{г} \cdot (100 \text{ мл})^{-1}$. Элементный анализ выполнен на анализаторе «Carlo Erba 1106». Для ТСХ использовали пластинки Sorbfil (Сорбполимер, Краснодар, Россия) в системах MeOH–CHCl_3 , 1:20, или EtOAc–гексан , 1:10, проявитель – анисовый альдегид. Для колоночной хроматографии применяли силикагель L (50-160 мкм) марки КСКГ. Все растворители были высушены стандартными методами. В работе были использованы 4-пиридинкарбоксальдегид, три-*n*-бутилфосфин, CH_3I , CH_3COCl , DMAP , NBS , ДМФА, 5-бромвалериановая кислота, DCC , 1,4-дибромбутан, триэтиленгликоль, LiBr , бромуксусная кислота, VEt_3 (1 М раствор в ТГФ), $\text{KN}(\text{SiMe}_3)_2$ (1 М раствор в ТГФ), пропаргилбромид (80% раствор в толуоле), DME (диметоксиэтан), 1-бром-4-иодбензол, 1,4-дииодбензол, пиперидин-2-карбоновая кислота, CuI , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, Et_3N , *m*-CPBA, трибромид пиридиния, бензилхлорид, PhSeCl , H_2O_2 (30%), HClO_4 , пиррол, 4-иодбензальдегид, 4-метилбензальдегид, InCl_3 , DDQ , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, ICl , трифенилфосфин, урсоловая кислота, олеаноловая кислота фирмы «Acros Organics». Грамин, NaBH_4 , $\text{Pd-C}/10\%$, $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 18β-глицирретовая кислота фирмы «Aldrich». Соединения **2** и **F16** получали согласно описанному методу [146]. Бетулиновую кислоту получали из бетулина по известному методу [189]. Диацетат бетулина **3** получали из бетулина кипячением

в уксусной кислоте по методу [147]. Ацетаты бетулиновой и азиатиковой кислот, бромалкиловых эфиров бетулиновой, олеаноловой, урсоловой и 18 β -глицирретовой кислот, бромида **19**, а также соединения **60**, **61** и **65** были синтезировали по типовым методикам. Аллильные бромиды **4** и **7** получали по методу [148]. Моно- и дибромиды бетулина **9** и **11** получали реакцией с 5-бромвалериановой кислотой как описано ранее [117]. Бромиды **13**, **17**, **20**, **22**, **26**, **30**, **48** и **49** были получены по методу [118]. С-2-пропинильное производное метилового эфира бетулоновой кислоты **35** и бетулиновой кислоты **73** получали из бетулиновой кислоты по ранее разработанному нами методу [152]. Соединение **36** получали по методу [146]. Бензиловые эфиры урсоловой, олеаноновой и дигидробетулоновой кислот получали по типовой методике [115]. Маслиновую и коросолевою кислоты получали как описано в работе [160]. В синтезе полигидроксилированных аналогов бетулиновой и урсоловой кислот использовали ранее разработанную методологию [162]. Дигидробетулиновую кислоту **55** получали по методу [190]. Синтез соединений **68-71** выполняли по методам [183, 184]. Соединение **72** получали по методу [185].

Клеточные культуры

Используемые в этом исследовании клеточные линии U937 (лейкемическая моноцитарная лимфома), K562 (хроническая миелоидная лейкемия), Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) были приобретены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Россия), H1299 и A549 (немелкоклеточная аденокарцинома легкого) были приобретены в ATCC (Американская коллекция типовых культур). Эмбриональные фибробласты человека были получены из национальной коллекции культур Великобритании (UK National Culture Collection Archive). HF (первичные дермальные фибробласты человека, полученные из участка кожи здоровых доноров) были приобретены из биобанка Института регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. MEF (эмбриональные фибробласты

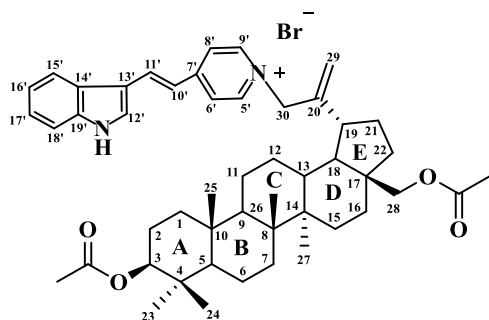
мышь) были приобретены в АТСС. Клетки фибробластов выращивали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 1% раствора пенициллина и стрептомицина. Лейкозные клетки (Jurkat, K562, U937) выращивали с добавлением 4 мМ глутамин, 10% FBS и 100 ед/мл пенициллина-стрептомицина. Клетки карцином (человеческой немелкоклеточной аденокарциномы легкого – H1299 и A549, аденокарциномы молочной железы человека — MCF-7 и BT474) выращивали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл гентамицина и 2 мМ глутамин. Все типы клеток выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

3.1 Синтез и исследование цитотоксической активности конъюгатов тритерпеноидов лупанового, олеанового и урсанового ряда с катионным соединением F16

3.1.1 Синтез конъюгатов бетулина, бетулиновой, урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот с катионным соединением F16. Общая методика.

К раствору соответствующих бромидов **4, 7, 9, 13, 14, 17, 22, 23, 26, 27, 30, 31** (1.0 ммоль) в 12 мл сухого ДМФА при перемешивании добавили 200 мг (1.0 ммоль) 3-[2-(4-пиридил)винил]индола или для дибромидов **11, 20** (1.0 ммоль) добавили 400 мг (2.0 ммоль) 3-[2-(4-пиридил)винил]индола. Реакционную смесь перемешивали при 85°C в атмосфере аргона в течение 12 часов. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали при пониженном давлении. Остаток хроматографировали на колонке SiO₂ (CH₂Cl₂–MeOH 30:1→10:1), получили соединения **5, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 33**.

N-(3β,28-диацетокси-луп-20(29)-ен-30-ил)-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]пиридиний бромид (5)



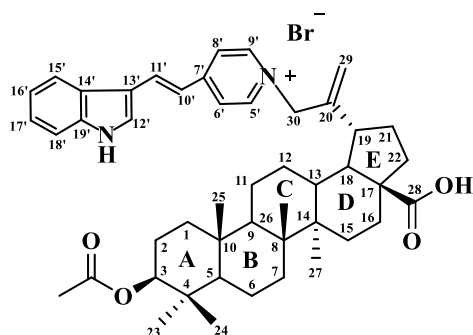
Оранжевые кристаллы, выход 0.65г (79%). Т. пл. 219-121°C, $[\alpha]_D^{23} +40.4^\circ$ (с 0.68, CH₃OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1731 (C=O), 3444 (NH).

Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 0.84, 0.85, 0.86, 1.03, 1.05 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 2.04, 2.07 (оба с, по 3H, COCH₃); 0.79-2.11 (м, 24H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете); 2.33-2.38 (м, 1H, C(19)H); 3.79, 4.32 (оба д, по 1H, J = 11.0, C(28)H); 4.42-4.45 (м, 1H, C(3)H); 4.94 (уш. с, 2H, C(30)H); 4.66, 5.17 (оба уш. с, по 1H, C(29)H); 7.15 (д, 1H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H); 7.28–7.29 (м, 2H, C(16')H, C(17')H); 7.50-7.52 (м, 1H, C(18')H); 7.87 (с, 1H, C(12')H); 7.94 (д, 2H, J = 6.5, C(6')H, C(8')H); 8.04-8.06 (м, 1H, C(15')H); 8.16 (д, 1H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H); 8.41 (д, 2H, J = 6.5, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д., J/Гц): 15.4 (C(27)); 16.6 (C(26)); 16.8 (C(24)); 17.1 (C(25)); 19.1 (C(6)); 21.2 (COCH₃); 21.5 (COCH₃); 21.9 (C(11)); 24.6 (C(12)); 27.9 (C(15)); 28.0 (C(2)); 28.6 (C(23)); 30.5 (C(16)); 30.6 (C(21)); 35.1 (C(7)); 35.2 (C(22)); 38.1 (C(10)); 38.6 (C(13)); 38.7 (C(4)); 39.4 (C(1)); 42.0 (C(8)); 43.7 (C(14)); 47.5 (C(17)); 48.6 (C(19)); 49.5 (C(18)); 51.3 (C(9)); 56.5 (C(5)); 63.3 (C(28)); 64.6 (C(30)); 82.4 (C(3)); 113.2 (C(29)); 113.6 (C(18')); 115.5 (C(13')); 117.5 (C(10') или C(11')); 121.5 (C(15')); 122.8 (C(17')); 123.0 (C(6'), C(8')); 124.4 (C(16')); 126.3 (C(14')); 134.0 (C(12')); 139.2 (C(19')); 139.3 (C(10') или C(11')); 144.3 (C(5'), C(9')); 150.8 (C(20)); 157.2 (C(7')); 172.8 (COCH₃); 173.1 (COCH₃).

Найдено (%): С, 71.31; Н, 8.09. Вычислено (%): С, 71.25; Н, 7.93. Масс-спектр, *m/z* для C₄₉H₆₅N₂O₄ [M-Br]⁺ 745.6. *M* 745.5.

N-[(3β-ацетокси-луп-20(29)-ен-28-овая кислота)-30-ил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]пиридиний бромид (8)



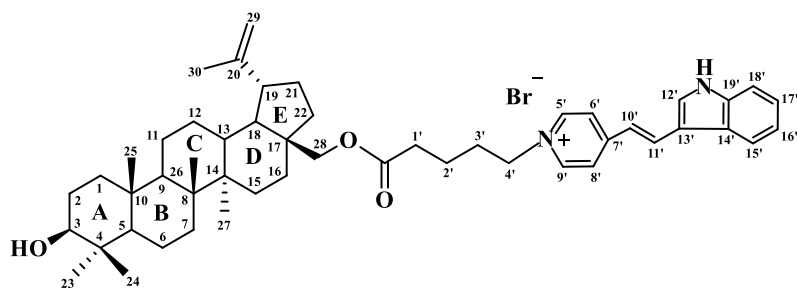
Оранжевые кристаллы, выход 0.62г (78%). Т. пл. 164-166°C, $[\alpha]_D^{23} +44^\circ$ (с 0.78, CH₃OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1735 (C=O), 3410 (NH).

Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 0.83, 0.84, 0.85, 0.94, 0.99 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 2.06 (с, 3H, COCH₃); 0.77-2.33 (м, 24H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете); 2.88- 3.01 (м, 1H, C(19)H); 4.41-4.45 (м, 1H, C(3)H); 4.89 (уш. с, 2H, C(30)H); 4.69, 5.14 (оба уш. с, по 1H, C(29)H); 7.08 (д, 1H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H); 7.28-7.29 (м, 2H, C(16')H, C(17')H); 7.49-7.51 (м, 1H, C(18')H); 7.85-7.89 (м, 3H, C(6')H, C(8')H, C(12')H); 8.01-8.03 (м, 1H, C(15')H); 8.12 (д, 1H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H); 8.32-8.34 (м, 2H, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д., J/Гц): 15.2 (C(27)); 16.7 (C(26)); 16.8 (C(24)); 16.9 (C(25)); 19.0 (C(6)); 21.5 (COCH₃); 22.0 (C(11)); 24.4 (C(12)); 28.4 (C(2)); 28.5 (C(23), C(15)); 30.6 (C(21)); 33.2 (C(16)); 35.2 (C(7)); 37.8 (C(22)); 37.9 (C(10)); 38.6 (C(4)); 39.1 (C(13)); 39.3 (C(1)); 41.6 (C(8)); 43.8 (C(14)); 48.5 (C(19)); 51.4 (C(18)); 51.7 (C(9)); 56.4 (C(5)); 57.5 (C(17)); 65.2 (C(30)); 82.3 (C(3)); 113.1 (C(29)); 113.5 (C(18')); 115.3 (C(13')); 117.3 (C(10') или C(11')); 121.3 (C(15')); 122.7 (C(17')); 122.8 (C(6'), C(8')); 124.3 (C(16')); 126.1 (C(14')); 133.8 (C(12')); 138.9 (C(10') или C(11')); 139.0 (C(19')); 143.9 (C(5'), C(9')); 151.3 (C(20)); 156.8 (C(7')); 172.7 (COCH₃); 182.9 (C(28)).

Найдено (%): С, 71.05; Н, 8.04. Вычислено (%): С, 70.75; Н, 7.71. Масс-спектр, *m/z* для C₄₇H₆₁N₂O₄ [M-Br]⁺ 717.6. *M* 717.5.

N-{5-[(3β-гидроксиуп-20(29)-ен-28-ил)-пентаноил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (10)



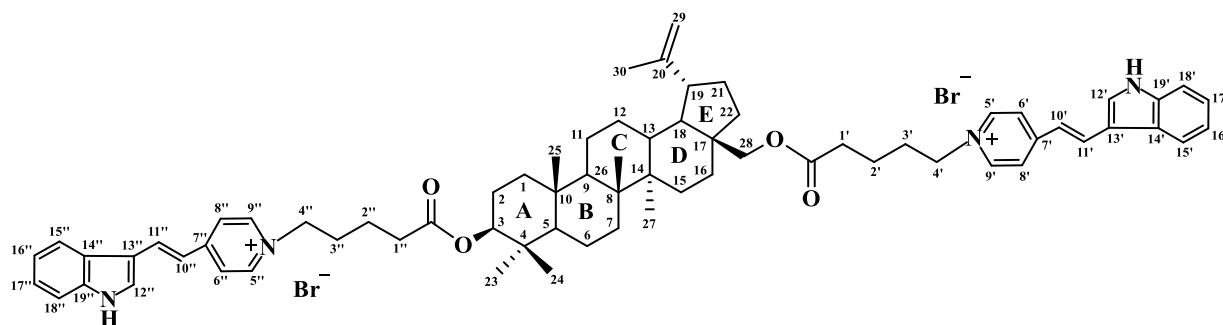
Оранжевые кристаллы, выход 0.67г (81%). Т. пл. 184-186°C, $[\alpha]_D^{23} +21^\circ$ (*c* 0.64, CH₃OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1725 (C=O), 2942 (OH), 3400 (NH).

Спектр ЯМР ¹H (δ , м.д., J/Гц): 0.72, 0.81, 0.92, 0.97, 1.01 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.67 (с, 3H, C(30)H); 0.58-2.24 (м, 28H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.40-2.48 (м, 3H, C(19)H, C(1')H); 3.10-3.15 (м, 1H, C(3)H); 3.86, 4.33 (оба д, по 1H, *J* = 11.0, C(28)H); 4.40-4.43 (м, 2H, C(4')H); 4.58, 4.69 (оба уш. с, по 1H, C(29)H); 7.12 (д, 1H, *J* = 16.0, C(10')H или C(11')H); 7.26-7.28 (м, 2H, C(16')H, C(17')H); 7.48-7.49 (м, 1H, C(18')H); 7.82 (с, 1H, C(12')H); 7.89 (д, 2H, *J* = 6.5, C(6')H, C(8')H); 8.01-8.02 (м, 1H, C(15')H); 8.11 (д, 1H, *J* = 16.0, C(10')H или C(11')H); 8.49 (д, 2H, *J* = 6.5, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ , м.д., J/Гц): 15.4 (C(27)); 16.1 (C(26)); 16.6 (C(24)); 16.7 (C(25)); 19.2 (C(6)); 19.5 (C(30)); 21.7 (C(11)); 22.3 (C(2')); 26.2 (C(12)); 27.8 (C(15)); 28.0 (C(2)); 28.6 (C(23)); 30.4 (C(16)); 30.6 (C(21)); 31.4 (C(3')); 34.1 (C(1')); 35.2 (C(22)); 35.4 (C(7)); 38.0 (C(10)); 38.7 (C(13)); 39.7 (C(4)); 39.8 (C(1)); 41.8 (C(8)); 43.6 (C(14)); 47.4 (C(17)); 48.6 (C(19)); 49.7 (C(18)); 51.4 (C(9)); 56.4 (C(5)); 60.4 (C(4')); 63.8 (C(28)); 79.4 (C(3)); 110.6 (C(29)); 113.4 (C(18')); 115.3 (C(13')); 117.3 (C(10') или C(11')); 121.2 (C(15')); 122.6 (C(17')); 123.0 (C(6'), C(8')); 124.3 (C(16')); 126.1 (C(14')); 133.6 (C(12')); 138.8 (C(10') или C(11')); 139.1 (C(19')); 143.6 (C(5'), C(9')); 150.9 (C(20)); 156.7 (C(7')); 174.8 (C=O).

Найдено (%): С, 72.65; Н, 8.36. Вычислено (%): С, 72.70; Н, 8.42. Масс-спектр, *m/z* для C₅₀H₆₉N₂O₃ [M-Br]⁺ 745.7. *M* 745.5.

N,N'-{5-[(3β-пентаноил-луп-20(29)-ен-28-ил)-пентаноил]-ди-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний дибромид (12)



Оранжевые кристаллы, выход 1.07г (89%). Т. пл. 243-245°C, $[\alpha]_D^{23} +5.7^\circ$ (с 0.87, CH₃OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1726 (C=O), 3435 (NH).

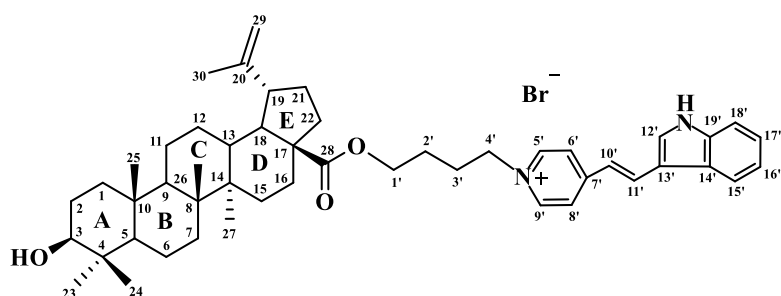
Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 0.78, 0.79, 0.82, 0.95, 0.99 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.67 (с, 3H, C(30)H); 0.74-2.01 (м, 32H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H, C(2'')H, C(3'')H); 2.41-2.48 (м, 5H, C(19)H, C(1')H, C(1'')H); 3.84, 4.31 (оба д, по 1H, J = 11.0, C(28)H); 4.39-4.44 (м, 5H, C(4')H, C(4'')H, C(3)H); 4.58, 4.68 (оба уш. с, по 1H, C(29)H); 7.11 (д, 2H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H, C(10'')H или C(11'')H); 7.22-7.31 (м, 4H, C(16')H, C(17')H, C(16'')H, C(17'')H); 7.45-7.51 (м, 2H, C(18')H, C(18'')H); 7.82 (с, 2H, C(12')H, C(12'')H); 7.84–7.89 (м, 4H, C(6')H, C(8')H, C(6'')H, C(8'')H); 7.98-8.02 (м, 2H, C(15')H, C(15'')H); 8.09 (д, 2H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H, C(10'')H или C(11'')H); 8.44-8.51 (м, 4H, C(5')H, C(9')H, C(5'')H, C(9'')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д., J/Гц): 15.4 (C(27)); 16.6 (C(26)); 16.8 (C(24)); 17.1 (C(25)); 19.0 (C(6)); 19.5 (C(30)); 21.7 (C(11)); 22.3 (C(2')); 22.4 (C(2'')); 24.6 (C(12)); 26.1 (C(15)); 28.0 (C(2)); 28.6 (C(23)); 30.4 (C(16)); 30.6 (C(21)); 31.4 (C(3'), C(3'')); 34.1 (C(1')); 34.4 (C(1'')); 35.1 (C(22)); 35.4 (C(7)); 38.0 (C(10)); 38.7 (C(13)); 38.6 (C(4)); 39.3 (C(1)); 41.8 (C(8)); 43.6 (C(14)); 47.4 (C(17)); 48.6 (C(19)); 49.7 (C(18)); 51.2 (C(9)); 56.4 (C(5)); 60.4 (C(4'), C(4'')); 63.8 (C(28)); 79.1 (C(3)); 110.7 (C(29)); 113.4 (C(18'), C(18'')); 115.3 (C(13'), C(13'')); 117.4 (C(10') или C(11'), C(10'') или C(11'')); 121.3 (C(15'), C(15'')); 122.6 (C(17'), C(17'')); 123.0 (C(6'), C(8'), C(6''), C(8'')); 124.3 (C(16'), C(16'')); 126.2 (C(14'), C(14'')); 133.6 (C(12'), C(12'')); 138.7 (C(10') или C(11'), C(10'') или C(11'')); 139.1 (C(19'), C(19'')); 143.6 (C(5'),

C(9'), C(5''), C(9'')); 150.9 (C(20)); 156.7 (C(7'), C(7'')); 174.3 (C(OCH₃)); 174.8 (C(OCH₃)).

Найдено (%): C, 69.43; H, 7.25. Вычислено (%): C, 69.53; H, 7.34. Масс-спектр, *m/z* для C₇₀H₈₈N₄O₄ [M-HBr₂]²⁺ 1047.69. *M* 1047.67.

N-{4-[(3β-гидроксиуп-20(29)-ен-28-оил)-бутил]-(Е)-4-[2-(1Н-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (15)



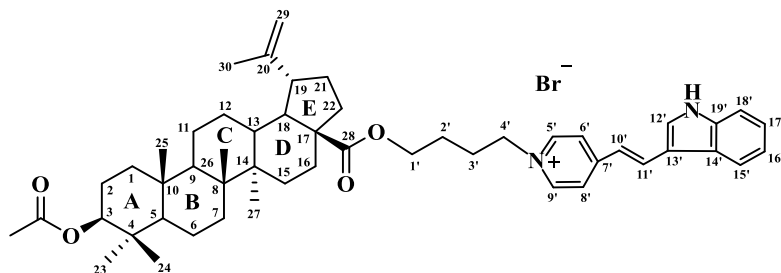
Оранжевые кристаллы, выход 0.68г (84%). Т. пл. 217-219°C, $[\alpha]_D^{23} +5.6^\circ$ (*c* 0.71, CH₃OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1718 (C=O), 2925 (OH), 3439 (NH).

Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 0.53, 0.73, 0.75, 0.77, 0.96 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.69 (с, 3H, C(30)H); 0.58-2.24 (м, 28H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.96-3.05 (м, 2H, C(3)H, C(19)H); 4.04-4.08, 4.30-4.35 (оба м, по 1H, C(1')H); 4.48-4.51 (м, 2H, C(4')H); 4.61, 4.72 (оба уш. с, по 1H, C(29)H); 7.22-7.29 (м, 3H, C(16')H, C(17')H, C(10')H или C(11')H); 7.48-7.49 (м, 1H, C(18')H); 7.88 (с, 1H, C(12')H); 8.02-8.09 (м, 3H, C(15')H, C(6')H, C(8')H); 8.22 (д, 1H, *J* = 16.0, C(10')H или C(11')H); 8.58 (д, 2H, *J* = 6.0, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д., J/Гц): 15.2 (C(27)); 16.0 (C(26)); 16.8 (C(24)); 16.9 (C(25)); 19.6 (C(6)); 19.7 (C(30)); 22.2 (C(11)); 26.8 (C(12)); 26.9 (C(3')); 28.0 (C(2)); 28.5 (C(23)); 29.5 (C(2')); 30.9 (C(15)); 31.8 (C(21)); 33.2 (C(16)); 35.7 (C(7)); 38.1 (C(22)); 38.3 (C(10)); 39.8 (C(13)); 39.9 (C(4)); 40.1 (C(1)); 42.0 (C(8)); 43.6 (C(14)); 48.6 (C(19)); 50.6 (C(18)); 52.0 (C(9)); 56.9 (C(5)); 57.9 (C(17)); 60.6 (C(4')); 64.0 (C(1')); 79.6 (C(3)); 110.6 (C(29)); 113.6 (C(18')); 115.9 (C(13')); 117.8 (C(10') или C(11')); 121.7 (C(15')); 122.9 (C(17')); 123.4 (C(6'), C(8')); 124.6 (C(16')); 126.6 (C(14')); 133.9 (C(12')); 139.2 (C(10') или C(11')); 139.6 (C(19')); 144.2 (C(5'), C(9')); 151.8 (C(20)); 157.4 (C(7')); 177.6 (C(28)).

Найдено (%): С, 72.51; Н, 8.26. Вычислено (%): С, 72.48; Н, 8.32. Масс-спектр, m/z для $C_{49}H_{67}N_2O_3$ $[M-Br]^+$ 731.7. M 731.5.

N-{4-[(3 β -ацетоксилуп-20(29)-ен-28-оил)-бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (16)



Коричневые кристаллы, выход 0.76г (89%). Т. пл. 149-151°C, $[\alpha]_D^{21}$ -20° (c 0.03, $CHCl_3$). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1722 (C=O), 3441 (NH).

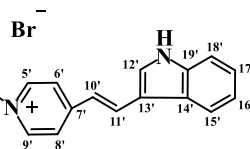
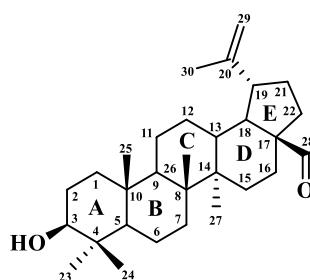
Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 0.65, 0.70, 0.75, 0.77, 0.96 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.68 (с, 3H, C(30)H); 2.00 (с, 3H, COCH₃); 0.81-2.23 (м, 28H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.94-2.97 (м, 1H, C(19)H); 4.23-4.30 (м, 1H, C(3)H); 4.07-4.11, 4.33-4.36 (оба м, по 1H, C(1')H); 4.44-4.51 (м, 2H, C(4')H); 4.60, 4.72 (оба уш. с, по 1H, C(29)H); 7.16 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 7.23-7.25 (м, 2H, C(16')H, C(17')H); 7.48-7.49 (м, 1H, C(18')H); 7.84 (с, 1H, C(12')H); 7.91-7.98 (м, 2H, C(6')H, C(8')H); 8.03-8.04 (м, 1H, C(15')H); 8.15 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 8.51-8.57 (м, 2H, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/Гц$): 15.3 (C(27)); 16.7 (C(26)); 16.9 (C(25), C(24)); 19.1 (C(6)); 19.7 (C(30)); 21.4 (COCH₃); 21.9 (C(11)); 24.4 (C(12)); 26.5 (C(2), C(3')); 28.4 (C(23)); 29.2 (C(2')); 30.6 (C(15)); 31.5 (C(21)); 33.0 (C(16)); 35.3 (C(7)); 37.9 (C(22)); 38.0 (C(10)); 38.6 (C(13)); 39.3 (C(4)); 39.4 (C(1)); 41.8 (C(8)); 43.4 (C(14)); 48.6 (C(19)); 50.4 (C(18)); 51.5 (C(9)); 56.5 (C(5)); 57.7 (C(17)); 60.3 (C(4')); 63.8 (C(1')); 82.3 (C(3)); 110.5 (C(29)); 113.5 (C(18')); 115.5 (C(13')); 117.4 (C(10') или C(11')); 121.4 (C(15')); 122.8 (C(17')); 123.1 (C(6'), C(8')); 124.4 (C(16')); 126.3 (C(14')); 133.8 (C(12')); 139.0 (C(10') или C(11')); 139.2 (C(19')); 143.8 (C(5'), C(9')); 151.3 (C(20)); 156.9 (C(7')); 172.8 (COCH₃); 177.4 (C(28)).

Найдено (%): С, 71.67; Н, 8.11. Вычислено (%): С, 71.73; Н, 8.14. Масс-спектр, m/z для $C_{51}H_{69}N_2O_4$ $[M-Br]^+$ 773.8. M 773.5.

N-{8'-[(3β-гидрокси-луп-20(29)-ен-28-оил)-3',6'-диоксооктан-1'-ил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (18)

Оранжевые



кристаллы, выход 0.74г
(85%). Т. пл. 165-167°C,
[α]_D²³ +1.4° (с 0.70,
CH₃OH). ИК-спектр, ν/см⁻¹:
1721 (C=O), 2943 (OH),
3402 (NH).

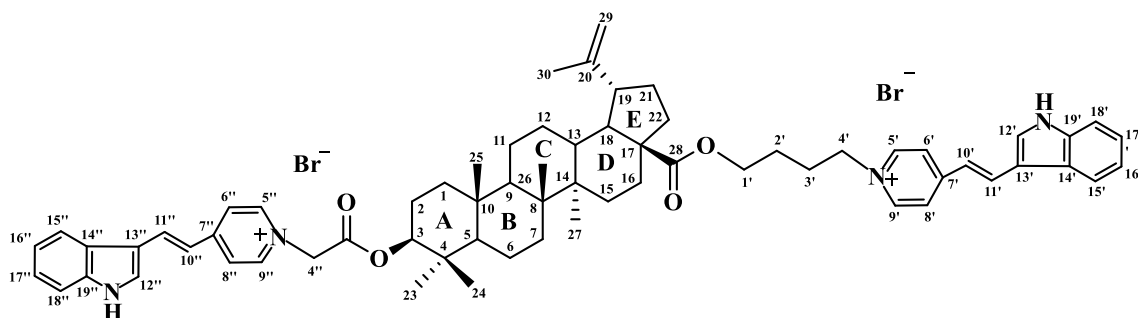
Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 0.71, 0.76, 0.86, 0.91, 0.92 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.64 (с, 3H, C(30)H); 0.62-2.19 (м, 24H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете), 2.91-2.99 (м, 1H, C(19)H); 3.09-3.12 (м, 1H, C(3)H); 3.62-3.65 (м, 6H, C(2'')H, C(3'')H, C(4'')H); 3.92, 4.22 (оба уш. с, по 2H, C(1'')H, C(5'')H); 4.53-4.57 (м, 3H, C(29)H, C(6'')H); 4.66 (уш. с, 1H, C(29)H); 7.10 (д, 1H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H); 7.26-7.27 (м, 2H, C(16')H, C(17')H); 7.48-7.49 (м, 1H, C(18')H); 7.81-7.84 (м, 3H, C(6')H, C(8')H, C(12')H); 7.99-8.01 (м, 1H, C(15')H); 8.09 (д, 1H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H); 8.45 (д, 2H, J = 6.0, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д., J/Гц): 15.2 (C(27)); 16.1 (C(26)); 16.6 (C(24)); 16.7 (C(25)); 19.1 (C(6)); 19.7 (C(30)); 21.7 (C(11)); 26.4 (C(12)); 27.7 (C(2)); 28.5 (C(23)); 30.5 (C(15)); 31.4 (C(21)); 32.9 (C(16)); 35.2 (C(7)); 37.8 (C(22)); 38.0 (C(10)); 39.2 (C(13)); 39.6 (C(1)); 39.7 (C(4)); 41.6 (C(8)); 43.2 (C(14)); 48.0 (C(19)); 50.2 (C(18)); 51.5 (C(9)); 56.4 (C(5)); 57.5 (C(17)); 60.3 (C(6'')); 63.7 (C(1'')); 70.1 (C(4''), C(5'')); 71.1 (C(3'')); 71.4 (C(2'')); 79.3 (C(3)); 110.4 (C(29)); 113.4 (C(18')); 115.3 (C(13')); 117.3 (C(10') или C(11')); 121.2 (C(15')); 122.5 (C(6'), C(8')); 122.6 (C(17')); 124.2 (C(16')); 126.1 (C(14')); 133.5 (C(12')); 138.7 (C(10') или C(11')); 139.0 (C(19')); 144.1 (C(5'), C(9')); 151.2 (C(20)); 156.7 (C(7')); 177.3 (C(28)).

Найдено (%): С, 70.15; Н, 8.16. Вычислено (%): С, 70.24; Н, 8.26. Масс-спектр, m/z для C₅₁H₇₁N₂O₅ [M-Br]⁺ 791.6. M 791.5.

N-[3β-(4-[1H-индол-3-илвинил]-карбоксиметил)-пиридиния бромид]-луп-20(29)-ен-28-оил-N-4-((E)-4-[1H-индол-3-илвинил]-бутил)пиридиний бромид

(21)



Темно-оранжевые кристаллы, выход 1.05г (91%). Т. пл. 232-234°C, $[\alpha]_D^{23} +32^\circ$ (*c* 0.76, CH₃OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1726 (C=O), 3435 (NH).

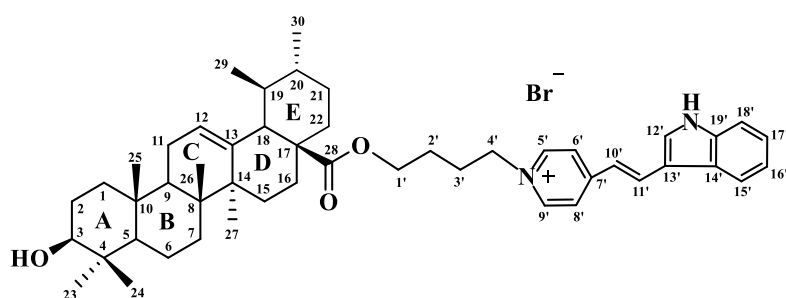
Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 0.55, 0.70, 0.71, 0.72, 0.93 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.65 (с, 3H, C(30)H); 0.56-2.21 (м, 28H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.87-2.99 (м, 1H, C(19)H); 4.02-4.07, 4.24-4.29 (оба м, по 1H, C(1')H); 4.45-4.51 (м, 5H, C(4')H); C(4'')H); C(3)H); 4.58, 4.69 (оба уш. с, по 1H, C(29)H); 7.14-7.28 (м, 6H, C(16')H, C(17')H, C(16'')H, C(17'')H, C(10')H или C(11')H, C(10'')H или C(11'')H); 7.47-7.51 (м, 2H, C(18')H), C(18'')H); 7.84, 7.87 (оба с, по 1H, C(12')H, C(12'')H); 7.93, 7.96 (м, 4H, C(6')H, C(8')H, C(6'')H, C(8'')H); 8.02-8.06 (м, 2H, C(15')H, C(15'')H); 8.14, 8.21 (оба д, по 1H, *J* = 16.0 Hz, C(10')H или C(11')H, C(10'')H или C(11'')H); 8.45, 8.53 (оба д, по 2H, *J* = 6.5, C(5')H, C(9')H, C(5'')H, C(9'')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д., J/Гц): 15.2 (C(27)); 16.7 (C(26)); 16.8 (C(24)); 16.9 (C(25)); 19.2 (C(6)); 19.7 (C(30)); 22.0 (C(11)); 24.4 (C(2)); 26.6 (C(3'), C(12)); 28.4 (C(23)); 29.3 (C(2')); 30.7 (C(15)); 31.6 (C(21)); 33.0 (C(16)); 35.3 (C(7)); 37.9 (C(22)); 38.1 (C(10)); 38.8 (C(4)); 39.3 (C(1)); 39.5 (C(13)); 41.8 (C(8)); 43.5 (C(14)); 48.3 (C(19)); 50.4 (C(18)); 51.6 (C(9)); 56.6 (C(5)); 57.7 (C(17)); 60.4 (C(4'), C(4'')); 63.9 (C(1')); 85.6 (C(3)); 110.5 (C(29)); 113.6 (C(18'), C(18'')); 115.6 (C(13'')); 115.7 (C(13')); 117.6 (C(10') или C(11'), C(10'') или C(11'')); 121.5 (C(15')); 122.6 (C(6''), C(8'')); 122.8 (C(15'')); 122.9 (C(17')); 123.2 (C(6'), C(8'), C(17'')); 124.4 (C(16'')); 124.5 (C(16')); 126.4 (C(14'), C(14'')); 133.9 (C(12')); 134.3 (C(12'')); 139.1 (C(10'))

или C(11'')); 139.3 (C(19'), C(19'')); 139.8 (C(10'') или C(11'')); 143.9 (C(5''), C(9'')); 145.1 (C(5'), C(9')); 151.5 (C(20)); 157.1 (C(7')); 157.8 (C(7'')); 167.2 (C=O); 177.5 (C(28)).

Найдено (%): C, 68.62; H, 7.15. Вычислено (%): C, 68.74; H, 6.99. Масс-спектр, m/z для $C_{66}H_{80}Br_2N_4O_4 [M-HBr_2]^{2+}$ 991.72. M 991.61.

N-{4-[(3β-гидроксиурс-12-ен-28-оил)-бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (24)



Темно-желтые

кристаллы, выход 0.67г (83%).

Т. пл. 194-196°C, $[\alpha]_D^{21} +12.5^\circ$ (с 0.04, DMSO). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1717 (C=O), 2925 (OH), 3442 (NH).

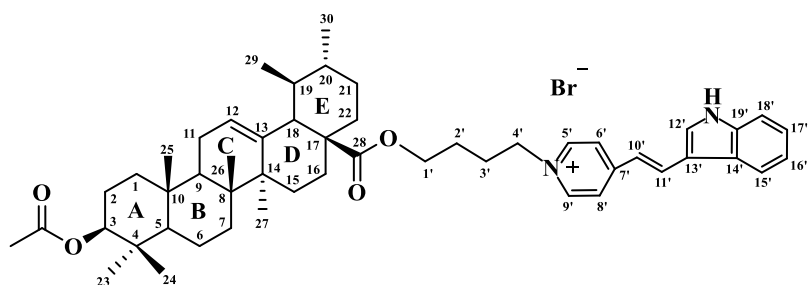
Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 0.54, 0.57, 0.79, 0.80, 0.82, 0.91, 0.99 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 0.82-1.95 (м, 26H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.13 (д, 1H, $J = 11.0$, C(18)H); 2.88-2.91 (м, 1H, C(3)H); 3.93-3.98 (м, 2H, C(1')H); 4.46-4.49 (м, 2H, C(4')H); 5.07 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.23-7.33 (м, 3H, C(16')H, C(17')H, C(10')H или C(11')H); 7.51-7.53 (м, 1H, C(18')H); 7.98 (с, 1H, C(12')H); 8.15-8.19 (м, 3H, C(15')H, C(6')H, C(8')H); 8.30 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 8.84 (д, 2H, $J = 6.5$, C(5')H, C(9')H); 11.99 (с, 1H, NH).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/Гц$): 15.6 (C(25)); 16.4 (C(24)); 17.2 (C(26)); 17.4 (C(29)); 18.4 (C(6)); 21.4 (C(30)); 23.3 (C(2)); 23.7 (C(27)); 24.2 (C(11)); 25.2 (C(16)); 27.3 (C(3')); 28.4 (C(15)); 28.6 (C(23)); 29.5 (C(2')); 30.5 (C(21)); 33.1 (C(7)); 36.8 (C(10)); 36.9 (C(22)); 38.6 (C(4)); 39.4 (C(1)); 40.1 (C(20)); 40.4 (C(19)); 40.6 (C(8)); 42.1 (C(14)); 47.3 (C(9)); 47.9 (C(17)); 52.8 (C(18)); 55.2 (C(5)); 59.1 (C(4')); 63.6 (C(1')); 77.2 (C(3)); 113.1 (C(18')); 114.2 (C(13')); 117.2 (C(10') или C(11')); 120.9 (C(15')); 121.6 (C(17')); 122.4 (C(6'), C(8')); 123.4 (C(16')); 125.3 (C(12),

C(14')); 133.1 (C(12')); 137.3 (C(10') или C(11')); 138.1 (C(13)); 138.5 C(19')); 143.8 (C(5'), C(9')); 155.3 C(7')); 176.8 (C(28)).

Найдено (%): C, 72.31; H, 8.28. Вычислено (%): C, 72.28; H, 8.32. Масс-спектр, m/z для $C_{49}H_{67}N_2O_3$ [M-Br]⁺ 731.6. M 731.5.

N-{4-[(3β-ацетоксиурс-12-ен-28-оил)-бутил]-(Е)-4-[2-(1Н-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (25)



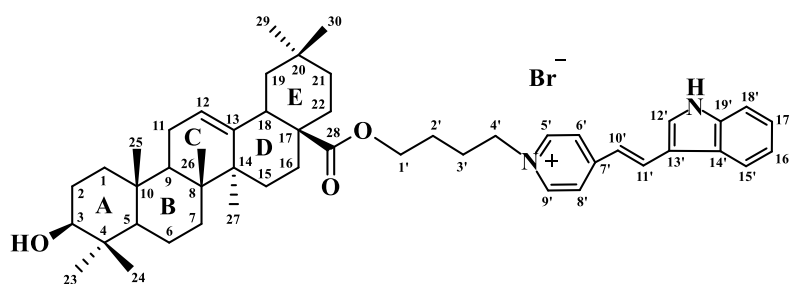
Коричневые кристаллы, выход 0.70г (82%). Т. пл. 174-176°C, $[\alpha]_D^{21} +9.5^\circ$ (c 0.04, CH₃OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1719 (C=O), 3440 (NH).

Спектр ЯМР ¹H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.59, 0.69, 0.73, 0.76, 0.89, 0.97, 1.06 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 1.93 (с, 3H, COCH₃); 0.82-2.06 (м, 26H, т, СН, СН₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.23 (д, 1H, $J = 11.0$, C(18)H); 4.01-4.06 (м, 2H, C(1')H); 4.22-4.24 (м, 1H, C(3)H); 4.47-4.49 (м, 2H, C(4')H); 5.14 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.23-7.28 (м, 3H, C(16')H, C(17')H, C(10')H или C(11')H); 7.49-7.51 (м, 1H, C(18')H); 7.89 (с, 1H, C(12')H); 8.04-8.10 (м, 3H, C(15')H, C(6')H, C(8')H); 8.23 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 8.62 (д, 2H, $J = 6.5$, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 16.2 (C(25)); 17.2 (C(24)); 17.8 (C(26)); 18.1 (C(29)); 19.3 (C(6)); 21.3 (C(30)); 21.7 (COCH₃); 24.2 (C(27)); 24.3 (C(11)); 24.5 (C(2)); 25.4 (C(16)); 26.5 (C(3')); 28.6 (C(23)); 29.1 (C(15)); 30.2 (C(2')); 31.8 (C(21)); 34.2 (C(7)); 38.0 (C(10)); 38.1 (C(22)); 38.6 (C(4)); 39.3 (C(1)); 40.5 (C(19), C(20)); 40.9 (C(8)); 43.3 (C(14)); 48.6 (C(9)); 49.3 (C(17)); 54.4 (C(18)); 56.6 (C(5)); 60.8 (C(4')); 65.1 (C(1')); 82.4 (C(3)); 113.6 (C(18')); 115.9 (C(13')); 117.9 (C(10') или C(11')); 121.8 (C(15')); 122.9 (C(17')); 123.5 (C(6'), C(8')); 124.6 (C(16')); 126.7 (C(12), C(14')); 134.1 (C(12')); 139.3 (C(10') или C(11')); 139.6 (C(13)); 140.1 (C(19')); 144.3 (C(5'), C(9')); 157.4 (C(7')); 172.9 (COCH₃); 180.5 (C(28)).

Найдено (%): С, 71.68; Н, 8.11. Вычислено (%): С, 71.73; Н, 8.14. Масс-спектр, m/z для $C_{51}H_{69}N_2O_4$ $[M-Br]^+$ 773.6. M 773.5.

N-{4-[(3 β -гидроксиолеан-12-ен-28-оил)-бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (28)



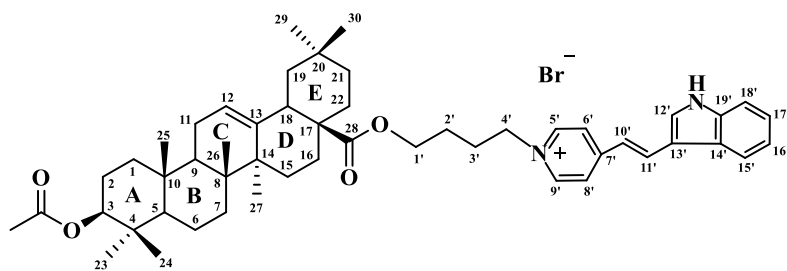
Оранжевые кристаллы, выход 0.67г (83%). Т. пл. 184-186°C, $[\alpha]_D^{21} +15^\circ$ (c 0.04, DMSO). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1716 (C=O), 2928 (OH), 3437 (NH).

Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 0.52, 0.56, 0.72, 0.78, 0.87, 0.88, 1.05 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 0.71-2.01 (м, 26H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.75 (д, 1H, $J = 11.0$, C(18)H); 2.88-2.91 (м, 1H, C(3)H); 3.93-4.04 (м, 2H, C(1')H); 4.47-4.51 (м, 2H, C(4')H); 5.11 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.21-7.33 (м, 3H, C(16')H, C(17')H, C(10')H или C(11')H); 7.51-7.53 (м, 1H, C(18')H); 7.98 (с, 1H, C(12')H); 8.15-8.19 (м, 3H, C(15')H, C(6')H, C(8')H); 8.31 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 8.84 (д, 2H, $J = 6.5$, C(5')H, C(9')H); 11.99 (с, 1H, NH).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/Гц$): 15.5 (C(25)); 16.4 (C(24)); 17.2 (C(26)); 18.4 (C(6)); 23.1 (C(2)); 23.3 (C(11)); 23.9 (C(27)); 25.3 (C(16)); 26.1 (C(29)); 27.2 (C(3')); 28.3 (C(15)); 28.6 (C(23)); 29.5 (C(2')); 30.8 (C(20)); 32.6 (C(21)); 32.8 (C(7)); 33.2 (C(30)); 33.6 (C(22)); 36.9 (C(10)); 38.7 (C(4)); 39.6 (C(1)); 40.2 (C(8)); 41.7 (C(18)); 42.9 (C(14)); 45.8 (C(19)); 46.5 (C(17)); 47.4 (C(9)); 55.2 (C(5)); 58.9 (C(4')); 63.6 (C(1')); 77.2 (C(3)); 113.1 (C(18')); 114.2 (C(13')); 117.2 (C(10') или C(11')); 120.9 (C(15')); 121.6 (C(17')); 122.3 (C(12)); 122.4 (C(6'), C(8')); 123.4 (C(16')); 125.4 (C(14')); 133.1 (C(12')); 137.3 (C(10') или C(11')); 138.1 (C(19')); 143.7 (C(5'), C(9')); 143.9 (C(13)); 155.3 (C(7')); 177.1 (C(28)).

Найдено (%): С, 72.51; Н, 8.27. Вычислено (%): С, 72.48; Н, 8.32. Масс-спектр, m/z для $C_{49}H_{67}N_2O_3$ $[M-Br]^+$ 731.6. M 731.5.

N-{4-[(3 β -ацетоксиолеан-12-ен-28-оил)-бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (29)



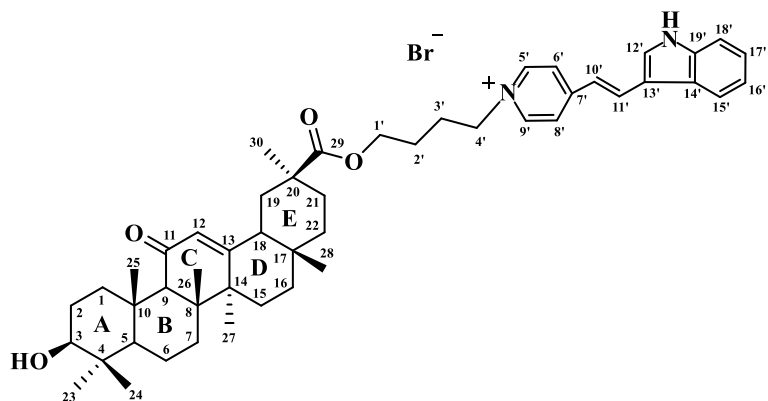
Коричневые кристаллы, выход 0.72г (85%). Т. пл. 162-164°C, $[\alpha]_D^{21} +23.3^\circ$ (*c* 0.03, CH₃OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1722 (C=O), 3443 (NH).

Спектр ЯМР ¹H (δ , м.д., *J*/Гц): 0.56, 0.69, 0.72, 0.75, 0.91, 0.95, 1.11 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 1.95 (с, 3H, COCH₃); 0.71-2.07 (м, 26H, (м, 26H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.86 (д, 1H, *J* = 11.0, C(18)H); 4.02-4.09 (м, 2H, C(1')H); 4.23-4.26 (м, 1H, C(3)H); 4.43-4.52 (м, 2H, C(4')H); 5.17 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.21-7.29 (м, 3H, C(16')H, C(17')H, C(10')H или C(11')H); 7.49-7.50 (м, 1H, C(18')H); 7.89 (с, 1H, C(12')H); 8.02 (д, 2H, *J* = 6.5, C(6')H, C(8')H); 8.08-8.09 (м, 1H, C(15')H); 8.21 (д, 1H, *J* = 16.0, C(10')H или C(11')H); 8.60 (д, 2H, *J* = 6.5, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ , м.д., *J*/Гц): 16.2 (C(25)); 17.2 (C(24)); 17.9 (C(26)); 19.4 (C(6)); 21.3 (COCH₃); 24.2 (C(27), C(16)); 24.3 (C(11)); 24.6 (C(2)); 26.5 (C(3'), C(29)); 28.6 (C(23)); 28.8 (C(15)); 30.2 (C(2')); 31.7 (C(20)); 33.7 (C(30)); 33.8 (C(21)); 33.9 (C(7)); 34.9 (C(22)); 38.1 (C(10)); 38.6 (C(4)); 39.2 (C(1)); 40.7 (C(8)); 42.9 (C(14), C(18)); 47.1 (C(17)); 48.2 (C(9)); 48.6 (C(19)); 56.6 (C(5)); 60.7 (C(4')); 64.9 (C(1')); 82.4 (C(3)); 113.6 (C(18')); 115.9 (C(13')); 117.9 (C(10') или C(11')); 121.7 (C(15')); 122.9 (C(17')); 123.4 (C(6'), C(8')); 123.6 (C(12)); 124.6 (C(16')); 126.7 (C(14')); 134.1 (C(12')); 139.2 (C(10') или C(11')); 139.6 (C(19')); 144.2 (C(5'), C(9')); 145.4 (C(13)); 157.3 (C(7')); 172.8 (COCH₃); 179.4 (C(28)).

Найдено (%): С, 71.69; Н, 8.11. Вычислено (%): С, 71.73; Н, 8.14. Масс-спектр, *m/z* для C₅₁H₆₉N₂O₄ [M-Br]⁺ 773.6. *M* 773.5.

N-{4-[(3β-гидрокси-11-оксо-18β,20β-олеан-12-ен-29-оил)-бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (32)



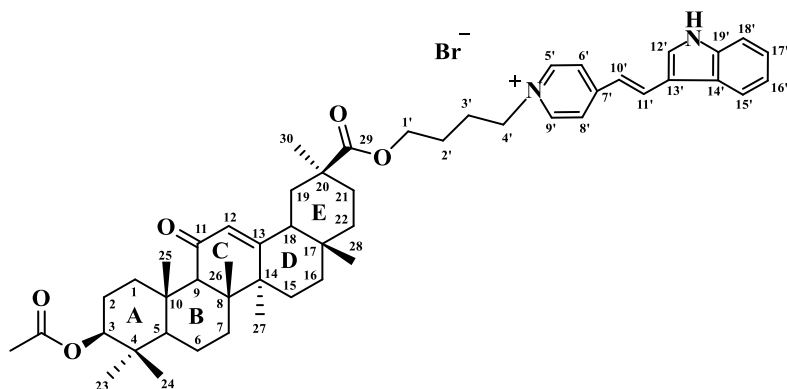
Оранжевые кристаллы, выход 0.67г (81%). Т. пл. 154-156°C, $[\alpha]_D^{21} +75^\circ$ (c 0.04, DMSO). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1721 (C=O), 2927 (OH), 3440 (NH).

Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.66, 0.73, 0.89, 0.98, 0.99, 1.11, 1.33 (все с, по 3H, C(23)H–C(28)H, C(30)H); 0.68-2.11 (м, 23H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.31 (с, 1H, C(9)H); 2.56-2.59 (м, 1H, C(18)H); 2.99-3.02 (м, 1H, C(3)H); 4.06-4.15 (м, 2H, C(1')H); 4.48-4.51 (м, 2H, C(4')H); 5.37 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.22-7.32 (м, 3H, C(16')H, C(17')H, C(10')H или C(11')H); 7.52-7.53 (м, 1H, C(18')H); 7.98 (с, 1H, C(12')H); 8.14-8.16 (м, 3H, C(15')H, C(6')H, C(8')H); 8.27 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 8.81 (д, 2H, $J = 6.5$, C(5')H, C(9')H); 11.99 (с, 1H, NH).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 16.4 (C(24)); 16.6 (C(25)); 17.6 (C(6)); 18.8 (C(26)); 23.4 (C(27)); 25.4 (C(3')); 26.2 (C(15)); 26.5 (C(16)); 27.4 (C(2)); 27.8 (C(22)); 28.2 (C(23)); 28.6 (C(28)); 28.7 (C(30)); 30.7 (C(2')); 31.9 (C(17), C(21)); 32.5 (C(7)); 37.1 (C(10)); 37.8 (C(1)); 38.9 (C(4)); 39.8 (C(18)); 43.3 (C(19)); 43.9 (C(20)); 45.3 (C(8)); 48.5 (C(14)); 54.5 (C(5)); 58.8 (C(4')); 61.6 (C(9)); 63.6 (C(1')); 77.1 (C(3)); 113.1 (C(18')); 114.1 (C(13')); 117.3 (C(10') или C(11')); 120.9 (C(15')); 121.6 (C(17')); 122.4 (C(6'), C(8')); 123.4 (C(16')); 125.4 (C(14')); 127.8 (C(12)); 132.9 (C(12')); 137.2 (C(10') или C(11')); 138.1 (C(19')); 143.7 (C(5'), C(9')); 155.1 (C(7')); 169.9 (C(13)); 176.2 (C(29)); 199.5 (C(11)).

Найдено (%): С, 71.32; Н, 8.17. Вычислено (%): С, 71.25; Н, 7.93. Масс-спектр, m/z для C₄₉H₆₅N₂O₄ [M-Br]⁺ 745.5. M 745.5.

N-{4-[(3β-ацетокси-11-оксо-18β,20β-олеан-12-ен-29-оил)-бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (33)



Темно-оранжевые

кристаллы, выход 0.68г (79%).

Т. пл. 144-146°C, $[\alpha]_D^{21} +103.3^\circ$

(*c* 0.03, CHCl₃). ИК-спектр,

$\nu/\text{см}^{-1}$: 1725 (C = O), 3443 (NH).

Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 0.81, 0.86, 0.88, 1.05, 1.11, 1.17, 1.39 (все с, по 3H, C(23)H–C(28)H, C(30)H); 2.04 (с, 3H, COCH₃); 0.83-2.08 (м, 23H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.42 (с, 1H, C(9)H); 2.73-2.77 (м, 1H, C(18)H); 4.13-4.26 (м, 2H, C(1')H); 4.43-4.49 (м, 3H, C(4')H), C(3)H); 5.50 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.16 (д, 1H, *J* = 16.0, C(10')H или C(11')H); 7.24-7.31 (м, 2H, C(16')H, C(17')H); 7.48-7.51 (м, 1H, C(18')H); 7.84 (с, 1H, C(12')H); 7.95 (д, 2H, *J* = 6.5, C(6')H, C(8')H); 8.03-8.05 (м, 1H, C(15')H); 8.14 (д, 1H, *J* = 16.0, C(10')H или C(11')H); 8.54 (д, 2H, *J* = 6.5, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д., J/Гц): 17.1 (C(24)); 17.2 (C(25)); 18.3 (C(6)); 19.4 (C(26)); 21.4 (COCH₃); 23.9 (C(27)); 24.4 (C(2)); 26.6 (C(3')); 27.3 (C(15)); 27.5 (C(16)); 28.6 (C(23)); 28.8 (C(22)); 29.2 (C(28)); 29.3 (C(30)); 30.7 (C(2')); 31.9 (C(21)); 32.9 (C(17)); 33.6 (C(7)); 38.1 (C(10)); 38.8 (C(1)); 38.9 (C(4)); 39.8 (C(18)); 42.2 (C(19)); 44.5 (C(20)); 45.2 (C(8)); 46.6 (C(14)); 56.1 (C(5)); 60.3 (C(4')); 62.9 (C(9)); 64.5 (C(1')); 82.1 (C(3)); 113.5 (C(18')); 115.5 (C(13')); 117.6 (C(10') или C(11')); 121.4 (C(15')); 122.7 (C(17')); 123.3 (C(6'), C(8')); 124.4 (C(16')); 126.3 (C(14')); 128.8 (C(12)); 133.7 (C(12')); 138.9 (C(10') или C(11')); 139.3 (C(19')); 143.8 (C(5'), C(9')); 157.0 (C(7')); 172.3 (C(13)); 172.8 (COCH₃); 177.9 (C(29)); 201.9 (C(11)).

Найдено (%): C, 70.61; H, 8.12. Вычислено (%): C, 70.57; H, 7.78. Масс-спектр, *m/z* для C₅₁H₆₇N₂O₅ [M-Br]⁺ 787.5. *M* 787.5.

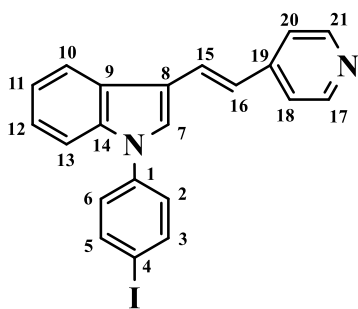
3.1.2 Синтез аддукта метилбетулоната и F16 с фенилэтинильным линкером

39

Синтез соединения 38

К суспензии (Е)-4-[2-(1-индол-3-ил)винил]пиридина (**2**) (220 мг, 1 ммоль), K_2CO_3 (105 мг, 0.8 ммоль) добавляли 1-бром-4-иодбензол (2 ммоль) или 1,4-дииодбензол (2 ммоль), CuI (12 мг, 0.06 ммоль), пиперидин-2-карбоновую кислоту (15 мг, 0.12 ммоль) в сухом ДМФА (5 мл) и перемешивали при $110^\circ C$ в течение 24 часов. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали при пониженном давлении. Остаток хроматографировали на SiO_2 (гексан – EtOAc 15:1 → 1:1) и перекристаллизовывали с EtOAc, получили чистый продукт **38**.

1-Йодо-4-{(Е)-4-[2-(1Н-индол-3-ил)винил]пиридин}фенил (**38**)



Оранжево-желтые кристаллы, выход 0.21г (50%). Т. пл. $186-188^\circ C$, $[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ (c 0.17, $CHCl_3$). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1633 (CH=CH), 1593, 1491, 1456 (Ph).

Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 7.03 (д, 1H, $J = 16.5$, C(15)H, или C(16)H); 7.20-7.54 (м, 9H, C(2)H, C(6)H, C(7)H, C(11)H, C(12)H, C(13)H, C(18)H, C(20)H, C(15)H или C(16)H); 7.81 (д, 2H, $J = 6.5$, C(3)H, C(5)H); 7.98 (уш. с, 1H, C(10)H); 8.43 (уш. с, 2H, C(17)H, C(21)H).

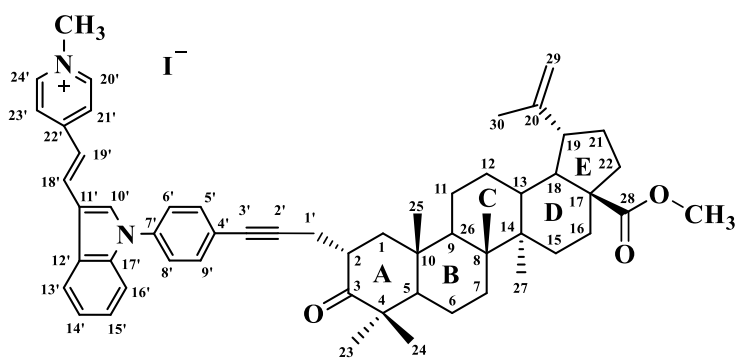
Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/Гц$): 91.8 (C(4)); 111.2 (C(13)); 116.1 (C(8)); 120.7 (C(11)); 121.0, (C(10)); 122.1 (C(18), C(20)); 123.0 (C(15) или C(16)); 124.0, (C(12)); 126.4 (C(2), C(6)); 126.7 (C(7)); 127.2 (C(9)); 128.6 (C(15) или C(16)); 136.8 (C(1)); 138.9 (C(14)); 139.2 (C(3), C(5)); 147.0 (C(19)); 149.4 (C(17), C(21)).

Найдено (%): C, 60.16; H, 4.12. Вычислено (%): C, 59.73; H, 3.58. Масс-спектр, m/z для $C_{21}H_{15}IN_2$ $[M+H]^+$ 423.0353. M 423.0330.

Синтез соединения **39** реакцией кросс-сочетания по Соногашира

Смесь тритерпеноида **35** (0.11 г, 0.2 ммоль), гетероциклического соединения **38** (0.084 г, 0.2 ммоль), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.007 г, 0.01 ммоль) и CuI (0.004 г, 0.02 ммоль) растворяли в безводном Et₃N-ДМФА (4 мл, 1:1). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере аргона, добавляли воду и экстрагировали EtOAc (3×10 мл). Объединенные органические экстракты сушили с помощью MgSO₄ и концентрировали при пониженном давлении. К раствору полученного светло-коричневого продукта (0.086 г, 0.1 ммоль) в сухом ДМФА (2 мл) добавляли CH₃I (0.06 мл, 1 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 12 часов. После упаривания растворителя при пониженном давлении и хроматографической очистки остатка на силикагеле [CH₂Cl₂-MeOH (30:1 → 10:1)] получили соединение **39**.

Метил 2-[[**(E)**-4-(1H-индол-3-ил-винил)-N-метил-пиридиний иодид]фенилпропинил]-3-оксолуп-20(29)ен-28-оат (**39**)



Оранжевые кристаллы, выход 0.067г (71%). Т. пл. 196-198°C, $[\alpha]_D^{19} -13.3^\circ$ (*c* 0.06, CHCl₃). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1716 (C=O), 1636 (CH=CH), 1609, 1509, 1458 (Ph).

Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 1.00, 1.01, 1.09, 1.10, 1.19 (все с, по 3H, C(23)H-C(27)H); 1.68 (с, 3H, C(30)H); 1.13-2.29 (м, 21H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете); 2.40-2.48 (м, 2H, C(1)H_a, C(1')H_b); 2.80 (дд, 1H, J₁ = 15.0, J₂ = 5.0, C(1')H_a); 2.99-3.01 (м, 2H, C(2)H, C(19)H); 3.68 (с, 3H, OCH₃), 4.58, 4.72 (оба уш. с, по 1H, C(29)H); 4.80 (с, 3H, N⁺CH₃); 7.20 (д, 1H, J = 16.0, C(18')H или C(19')H); 7.31-7.33 (м, 2H, C(14')H, C(15')H); 7.44-7.52 (м, 5H, C(5')H, C(6')H,

C(8')H, C(9')H, C(16')H); 7.96-8.00 (м, 3H, C(21')H, C(23')H, C(10')H); 8.07-8.09 (м, 2H, C(13')H, C(18')H или C(19')H); 8.49 (д, 2H, $J = 6.5$, C(20')H, C(24')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 14.7 (C(27)); 16.1 (C(26)); 16.2 (C(24)); 19.3 (C(6)); 19.4 (C(30)); 20.6 (C(1')); 21.2 (C(11)); 21.7 (C(25)); 25.1 (C(23)); 25.4 (C(12)); 29.6 (C(15)); 30.5 (C(21)); 32.1 (C(16)); 34.1 (C(7)); 36.9 (C(22)); 37.5 (C(10)); 38.2 (C(13)); 40.8 (C(8)); 41.7 (C(2)); 42.5 (C(14)); 47.0 (C(1), C(19)); 47.8 (N^+CH_3); 48.4 (C(4)); 49.4 (C(18)); 50.1 (C(9)); 51.3 (OCH_3); 56.5 (C(17)); 57.4 (C(5)); 80.6 (C(3')); 90.5 (C(2')); 109.7 (C(4'), (C(29))); 111.5 (C(16')); 115.4 (C(11')); 118.1 (C(18') или (C(19'))); 121.1 (C(13')); 122.7 (C(21'), (C(23'))); 122.8 (C(15')); 124.0 (C(6'), (C(8'))); 124.2 (C(14')); 126.4 (C(12')); 133.1 (C(5'), (C(9'))); 133.4 (C(10')); 135.8 (C(18') или (C(19'))); 137.1 (C(7'), (C(17'))); 143.9 (C(20'), (C(24'))); 150.5 (C(20)); 154.3 (C(22')); 176.6 (C(28)); 215.8 (C(3)).

Найдено (%): C, 71.26; H, 7.19. Вычислено (%): C, 71.32; H, 7.16. Масс-спектр, m/z для $\text{C}_{56}\text{H}_{67}\text{IN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{I}]^+$ 815.5146. M 815.5176.

3.2 Синтез конъюгатов полигидроксилированных тритерпеноидов лупановой, урсановой и олеановой структуры с катионным соединением F16

3.2.1 Восстановление бензиловых эфиров 42 и 43 NaBH₄ с добавлением CeCl₃·7H₂O. Общая методика.

К раствору соединения **42** или **43** (0.4 ммоль) в смеси безводных ТГФ – MeOH (1:2, 7.5 мл), охлажденному до -30°C в атмосфере аргона, при перемешивании через канюлю добавляли раствор CeCl₃·7H₂O (190 мг, 0.5 ммоль) в смеси безводных ТГФ – MeOH (1:1, 2 мл). Затем небольшими порциями в течение 5 мин добавляли NaBH₄ (30 мг, 0.8 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч до завершения реакции (контроль ТСХ). Затем растворитель упаривали при пониженном давлении, реакционную смесь нейтрализовали 10%-ным водным раствором HCl и экстрагировали EtOAc (3×10 мл). Органическую фазу последовательно промывали насыщенным раствором NaHCO₃ и H₂O, сушили над безводным MgSO₄ и растворитель упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле [гексан – EtOAc (30:1 → 5:1)] с получением соединений **44**, **45**.

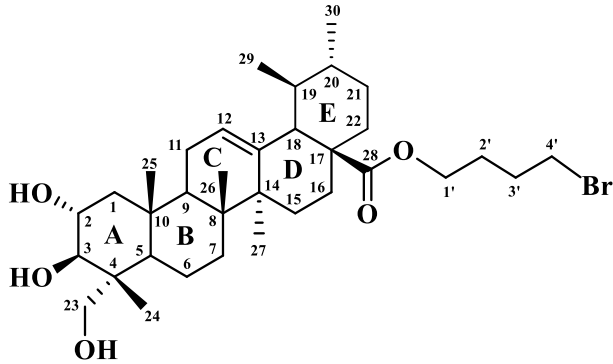
Спектры ЯМР ¹H, ¹³C и спектральные свойства соединений **44** и **45** идентичны описанным в литературе [160].

3.2.2 Синтез бромалкиловых эфиров оксигенированных тритерпеноидов 53, 53а, 62, 66. Общая методика.

К раствору азиатиковой кислоты, соединений **52**, **61** или **65** (1.0 ммоль) в смеси безводных ДМФА – CH₃CN (3:1, 8 мл) при перемешивании при комнатной температуре добавляли безводный K₂CO₃ (138 мг, 1.0 ммоль) и 1,4-дибромбутан (1.19 мл, 10.0 ммоль). Смесь перемешивали при 50°C в течение 3 ч до исчезновения исходного вещества по данным анализа методом ТСХ, затем смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали в холодную H₂O и экстрагировали CHCl₃ (3×30 мл). Органическую фазу промывали H₂O, сушили над безводным MgSO₄ и растворитель упаривали при пониженном давлении.

Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле [гексан – EtOAc (30:1 → 1:1)] с получением чистых соединений **53**, **53a**, **62**, **66**.

4-Бромбутил-2 α ,3 β ,23-тригидрокси-урс-12-ен-28-оат (53)



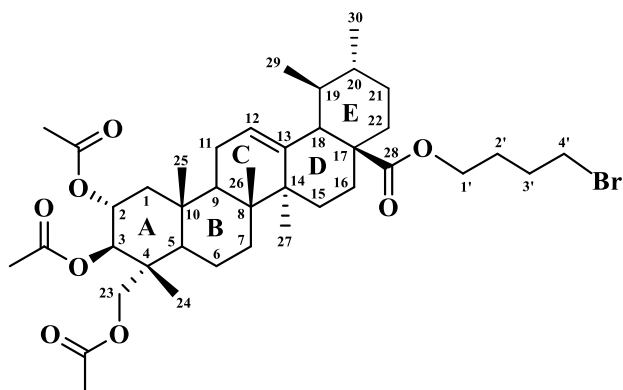
Белые кристаллы, выход 0.42г (68%). Т. пл. 196-198°C, $[\alpha]_D^{22} +36.7^\circ$ (*c* 0.24, CHCl₃). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1720 (C=O), 2923 (OH).

Спектр ЯМР ¹H (δ , м.д., J/Гц): 0.73, 0.77, 0.86, 0.95, 1.00, 1.08 (все с, по 3H, C(24)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 1.04-1.99 (м, 24H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.22 (д, 1H, *J* = 11.0, C(18)H); 3.39-3.44 (м, 2H, C(4')H); 3.34, 3.56 (оба д, по 1H, *J* = 10.0, C(23)H); 3.72-3.77 (м, 1H, C(3)H); 3.90-3.96 (м, 1H, C(2)H); 3.91-4.07 (м, 2H, C(1')H); 5.24 (уш. с, 1H, C(12)H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ , м.д., J/Гц): 13.1 (C(24)); 17.1 (C(25)); 17.2 (C(29), C(26)); 18.2 (C(6)); 21.2 (C(30)); 23.4 (C(27)); 23.7 (C(11)); 24.2 (C(16)); 27.3 (C(3')); 27.9 (C(15)); 29.5 (C(2')); 30.6 (C(21)); 32.6 (C(7)); 33.1 (C(4')); 36.7 (C(22)); 38.1 (C(10)); 38.9 (C(19)); 39.1 (C(20)); 39.6 (C(8)); 42.1 (C(4)); 42.8 (C(14)); 46.4 (C(1)); 47.4 (C(5), C(9)); 48.1 (C(17)); 52.8 (C(18)); 63.2 (C(1')); 68.7 (C(2), C(23)); 78.8 (C(3)); 125.3 (C(12)); 138.4 (C(13)); 177.5 (C(28)).

Найдено (%): C, 65.51; H, 8.83. Вычислено (%): C, 65.47; H, 8.89.

4-Бромбутил-2 α ,3 β ,23-триацетокси-урс-12-ен-28-оат (53a)



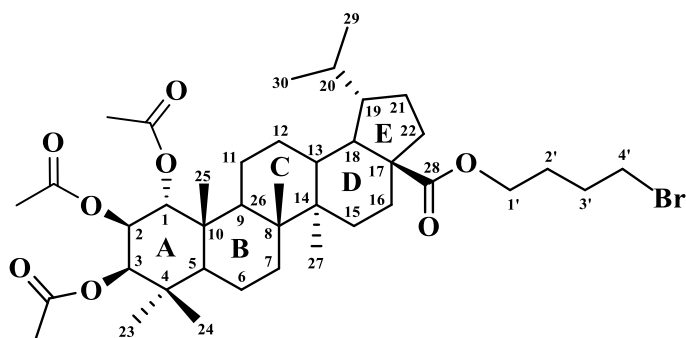
Белые кристаллы, выход 0.66г (88%). Т. пл. 156-158°C, $[\alpha]_D^{19} +25.29^\circ$ (*c* 0.51, CHCl₃). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1745 (C=O).

Спектр ЯМР ¹H (δ , м.д., J/Гц): 0.77, 0.87, 0.90, 0.96, 1.09, 1.12 (все с, по 3H, C(24)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 1.99, 2.03, 2.09 (все с, по 3H, COCH₃); 1.04-2.14 (м, 24H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.24 (д, 1H, *J* = 11.0, C(18)H); 3.42-3.45 (м, 2H, C(4')H); 3.58, 3.86 (оба д, по 1H, *J* = 11.5, C(23)H); 4.01-4.08 (м, 2H, C(1')H); 5.08 (д, 1H, *J* = 10.0, C(3)H); 5.16-5.18 (м, 1H, C(2)H); 5.26 (уш. с, 1H, C(12)H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ , м.д., J/Гц): 13.9 (C(24)); 16.9 (C(25)); 17.0 (C(26)); 17.1 (C(29)); 17.9 (C(6)); 20.7 (COCH₃); 20.8 (COCH₃); 21.0 (COCH₃); 21.1 (C(30)); 23.4 (C(27), C(11)); 24.2 (C(16)); 27.3 (C(3')); 27.9 (C(15)); 29.5 (C(2')); 30.6 (C(21)); 32.6 (C(7)); 32.9 (C(4')); 36.7 (C(22)); 37.8 (C(10)); 38.9 (C(19)); 39.1 (C(20)); 39.6 (C(8)); 41.9 (C(4)); 42.1 (C(14)); 43.8 (C(1)); 47.6 (C(5), C(9)); 48.1 (C(17)); 52.8 (C(18)); 63.2 (C(1')); 65.3 (C(23)); 69.9 (C(2)); 74.9 (C(3)); 125.1 (C(12)); 138.4 (C(13)); 170.3 (COCH₃); 170.4 (COCH₃); 170.8 (COCH₃); 177.4 (C(28)).

Найдено (%): С, 64.12; Н, 8.13. Вычислено (%): С, 64.07; Н, 8.20.

4-Бромбутил-1 α ,2 β ,3 β -триацетоксилуп-20,29-дигидробетулинат (62)



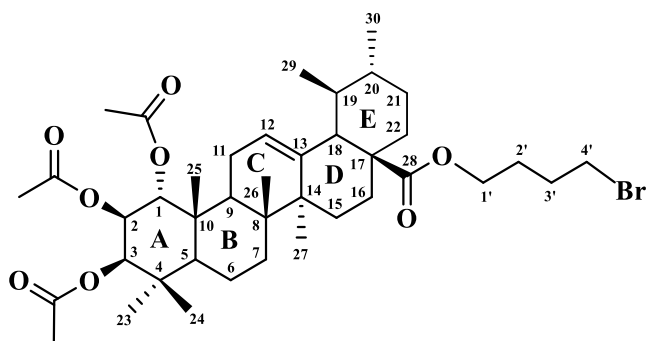
Белые кристаллы, выход 0.54г (76%). Т. пл. 162-164°C, $[\alpha]_D^{22} -1.33^\circ$ (*c* 0.56, CHCl₃). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1749 (C=O).

Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.73, 0.84 (оба д, по 3H, $J = 6.4$, C(29)H, C(30)H); 0.91, 0.94, 0.95, 1.02, 1.16 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.13-2.24 (м, 26H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 1.99, 2.06, 2.15 (все с, по 3H, COCH₃); 3.43 (т, 2H, $J = 6.4$, C(4')H); 4.07-4.11 (м, 2H, C(1')H); 4.83, 4.87 (оба д, по 1H, $J = 4.0$, C(1)H, C(3)H); 5.15 (т, 1H, $J = 4.0$, C(2)H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 14.5 (C(30), C(27)); 14.6 (C(26)); 16.4 (C(24)); 17.4 (C(25)); 17.7 (C(6)); 20.8 (COCH₃); 21.0 (COCH₃); 21.1 (COCH₃); 21.2 (C(11)); 22.8 (C(21)); 23.0 (C(29)); 26.8 (C(12)); 27.5 (C(3')); 28.8 (C(23)); 29.5 (C(2'), C(15)); 29.7 (C(20)); 32.0 (C(16)); 33.0 (C(4')); 33.7 (C(7)); 37.4 (C(10), C(22)); 38.2 (C(13)); 40.2 (C(4)); 40.8 (C(8)); 41.5 (C(9)); 43.1 (C(14)); 44.2 (C(19)); 48.8 (C(18)); 49.6 (C(5)); 56.9 (C(17)); 62.7 (C(1')); 69.6 (C(2)); 74.0 (C(1)); 74.8 (C(3)); 169.2 (COCH₃); 169.4 (COCH₃); 170.5 (COCH₃); 176.2 (C(28)).

Найдено (%): C, 63.94; H, 8.38. Вычислено (%): C, 63.90; H, 8.45. Масс-спектр, m/z для C₄₀H₆₃BrO₈Na [M+Na]⁺ 773.3674. M 773.3604.

4-Бромбутил-1 α ,2 β ,3 β -триацетокси-урс-12-ен-28-оат (66)



Белые кристаллы, выход 0.58г (77%). Т. пл. 92-94°C, $[\alpha]_D^{19} +6.79^\circ$ (c 0.28, CHCl₃). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1728 (C=O).

Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.81, 0.83, 0.94, 0.95, 1.05, 1.11, 1.27 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 2.01, 2.08, 2.09 (все с, по 3H, COCH₃); 0.89-2.06 (м, 22H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.22 (д, 1H, $J = 11.0$, C(18)H); 3.43 (т, 2H, $J = 6.6$, C(4')H); 4.00-4.07 (м, 2H, C(1')H); 4.84-4.87 (м, 2H, C(1)H, C(3)H); 5.17-5.21 (м, 2H, C(2)H, C(12)H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 14.1 (C(25)); 16.9 (C(29)); 17.5 (C(26)); 17.7 (C(24)); 17.8 (C(6)); 20.7 (COCH₃); 20.8 (COCH₃); 21.1 (C(30)); 21.2 (COCH₃); 23.2 (C(11)); 23.5 (C(27)); 24.2 (C(16)); 27.3 (C(3')); 27.8 (C(15)); 29.5 (C(2')); 29.7

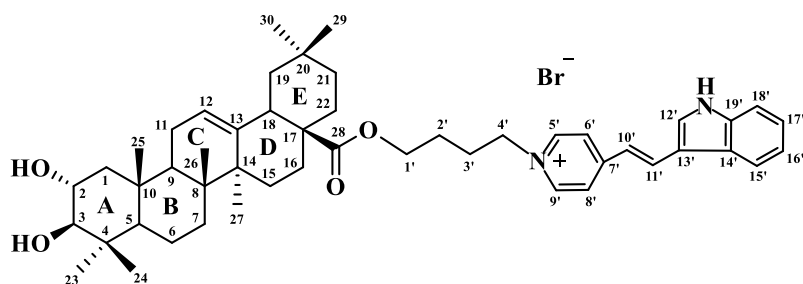
(C(23)); 30.7 (C(21)); 32.5 (C(7)); 33.1 (C(4')); 36.7 (C(22)); 37.2 (C(4)); 38.5 (C(9)); 38.8 (C(20)); 39.1 (C(19)); 39.5 (C(8)); 39.8 (C(10)); 42.7 (C(14)); 48.1 (C(17)); 49.7 (C(18)); 52.8 (C(5)); 63.2 (C(1')); 69.5 (C(2)); 73.9 (C(1)); 74.7 (C(3)); 125.1 (C(12)); 138.3 (C(13)); 169.2 (C=O); 169.5 (C=O); 170.5 (C=O); 171.5 (C(28)).

Найдено (%): С, 64.11; Н, 8.14. Вычислено (%): С, 64.07; Н 8.20.

3.2.3 Синтез конъюгатов 50, 51, 54, 54а, 63 и 67. Общая методика.

Смесь соответствующих бромидов 48, 49, 53, 53а, 62, 66 (1.0 ммоль) и 3-[2-(4-пиридил)-винил]индола (1.0 ммоль) в сухом ДМФА (12 мл) перемешивали при 85°C в атмосфере аргона в течение 12 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали при пониженном давлении. Продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле [CH₂Cl₂ – MeOH (30:1 → 10:1)], с получением чистых соединений 50, 51, 54, 54а, 63 и 67.

N-{4-[(2,3-дигидрокси-олеан-12-ен-28-оил)-бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиновый бромид (50)



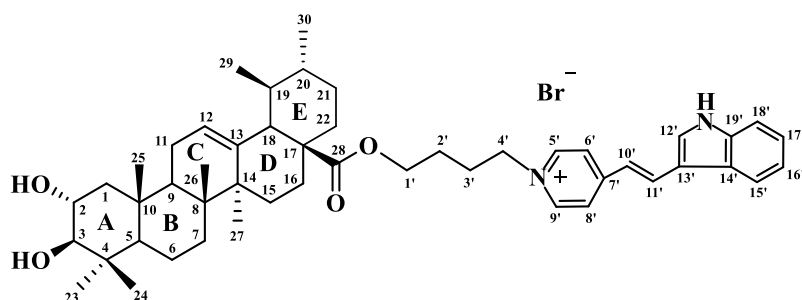
Темно-оранжевые кристаллы, выход 0.69г (83%). Т. пл. 206-208°C, $[\alpha]_D^{18} +35^\circ$ (с 0.02, CH₃OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1716 (C=O), 2920 (OH), 3370 (NH).

Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 0.60, 0.66, 0.86, 0.86, 0.89, 0.89, 1.09 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 0.72-2.00 (м, 24H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.79-2.85 (м, 2H, C(3)H, C(18)H); 3.47-3.53 (м, 1H, C(2)H); 3.99-4.12 (м, 2H, C(1')H); 4.40-4.43 (м, 2H, C(4')H); 5.21 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.11 (д, 1H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H); 7.22-7.24 (м, 2H, C(16')H, C(17')H); 7.44-7.46 (м, 1H, C(18')H); 7.80 (с, 1H, C(12')H); 7.88 (д, 2H, J = 6.4, C(6')H, C(8')H); 7.97-8.00 (м, 1H, C(15')H); 8.10 (д, 1H, J = 16.0, C(10')H или C(11')H); 8.48 (д, 2H, J = 6.4, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 17.2 (C(25)); 17.4 (C(24)); 17.8 (C(26)); 19.3 (C(6)); 23.9 (C(16)); 24.1 (C(30)); 24.4 (C(11)); 26.2 (C(3')); 26.4 (C(27)); 28.5 (C(2')); 29.0 (C(23)); 29.1 (C(15)); 31.4 (C(20)); 33.5 (C(22), (C(7))); 33.6 (C(29)); 34.6 (C(21)); 38.9 (C(10)); 40.1 (C(4)); 40.3 (C(8)); 42.4 (C(18)); 42.7 (C(14)); 46.7 (C(19)); 47.5 (C(1)); 47.8 (C(17)); 48.5 (C(9)); 56.2 (C(5)); 60.3 (C(4')); 64.2 (C(1')); 69.2 (C(2)); 84.2 (C(3)); 113.4 (C(18')); 115.3 (C(13')); 117.2 (C(10') или (C(11'))); 121.3 (C(15')); 122.7 (C(17')); 123.0 (C(8'), (C(6'))); 123.3 (C(12)); 124.3 (C(16')); 126.1 (C(14')); 133.8 (C(12')); 139.0 (C(10') или (C(11'))); 139.1 (C(19')); 143.6 (C(5'), (C(9'))); 144.7 (C(13)); 156.8 (C(7')); 179.2 (C(28)).

Найдено (%): С, 71.12; Н, 8.10. Вычислено (%): С, 71.08; Н, 8.16. Масс-спектр, m/z для $\text{C}_{49}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}-\text{Br}]^+$ 747.5182. M 747.5095.

N-{4-[(2,3-дигидрокси-урс-12-ен-28-оил)-бутил]-(Е)-4-[2-(1Н-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (51)



Оранжевые кристаллы, выход 0.69г (84%). Т. пл. 219-221°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{18} +9.1^\circ$ (c 0.03, CH_3OH). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1717 (C=O), 2921 (ОН), 3370 (NH).

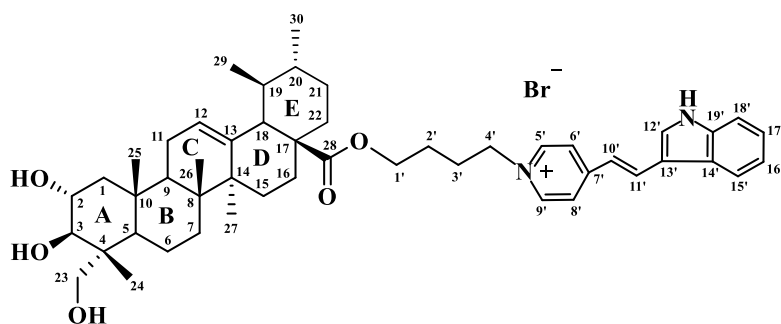
Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.65, 0.67, 0.89, 0.91, 0.97, 1.10, 1.30 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 0.75-2.09 (м, 24H, CH, CH_2 в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.22 (д, 1H, $J = 11.0$, C(18)H); 2.85 (д, 1H, $J = 10.0$, C(3)H); 3.50-3.54 (м, 1H, C(2)H); 4.01-4.13 (м, 2H, C(1')H); 4.49-4.52 (м, 2H, C(4')H); 5.21 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.26-7.29 (м, 3H, C(10')H или C(11')H, C(16')H, C(17')H); 7.49-7.50 (м, 1H, C(18')H); 7.90 (с, 1H, C(12')H); 8.06-8.09 (м, 3H, C(6')H, C(8')H, C(15')H); 8.25 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 8.63 (д, 2H, $J = 6.0$, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 17.4 (C(25)); 17.5 (C(29)); 17.7 (C(24)); 18.2 (C(26)); 19.6 (C(6)); 21.6 (C(30)); 24.1 (C(27)); 24.6 (C(11)); 25.4 (C(16)); 26.5

(C(3')); 29.2 (C(23)); 29.3 (C(15)); 29.5 (C(2')); 31.8 (C(21)); 34.3 (C(7)); 38.2 (C(10), (C(22))); 39.2 (C(4)); 40.5 (C(19), (C(20))); 41.0 (C(8)); 43.4 (C(14)); 48.3 (C(1)); 48.5 (C(17), (C(9))); 54.5 (C(18)); 56.7 (C(5)); 60.7 (C(4')); 64.7 (C(1')); 69.5 (C(2)); 84.5 (C(3)); 113.6 (C(18')); 115.8 (C(13')); 117.8 (C(10') или (C(11'))); 121.7 (C(15')); 122.9 (C(17')); 123.4 (C(8'), (C(6'))); 124.5 (C(16')); 126.7 (C(12)); 127.0 (C(14')); 134.0 (C(12')); 139.2 (C(10') или (C(11'))); 139.7 (C(13)); 139.9 (C(19')); 144.4 (C(5'), (C(9'))); 157.5 (C(7')); 179.2 (C(28)).

Найдено (%): С, 71.13; Н, 8.10. Вычислено (%): С, 71.08; Н, 8.16. Масс-спектр, m/z для $C_{49}H_{67}N_2O_4$ $[M-Br]^+$ 747.5019. M 747.5095.

N-{4-[(2 α ,3 β ,23-тригидрокси-урс-12-ен-28-оил)-бутил]-(Е)-4-[2-(1Н-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (54)



Оранжевые кристаллы, выход 0.69г (82%). Т. пл. 249-251°C, $[\alpha]_D^{18} +10^\circ$ (c 0.02, CH_3OH). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1712 (C=O), 2924 (OH), 3379 (NH).

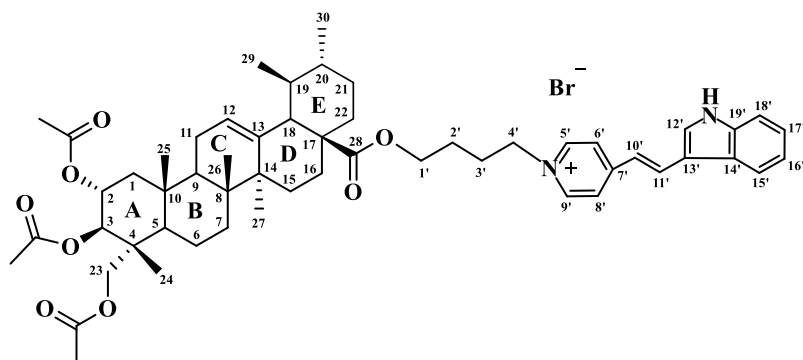
Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 0.63, 0.70, 0.81, 0.90, 0.93, 1.04 (все с, по 3H, C(24)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 1.18-2.00 (м, 24H, CH, CH_2 в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.15 (д, 1H, $J = 11.0$, C(18)H); 3.35 (д, 1H, $J = 10.0$, C(2)H); 3.23-3.48 (оба д, по 1H, $J = 11.0$, C(23)H); 3.65-3.70 (м, 1H, C(3)H); 3.99-4.04 (м, 2H, C(1')H); 4.41-4.44 (м, 2H, C(4')H); 5.17 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.07 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 7.22-7.24 (м, 2H, C(16')H, C(17')H); 7.45-7.47 (м, 1H, C(18')H); 7.79 (с, 1H, C(12')H); 7.86 (д, 2H, $J = 6.5$, C(6')H, C(8')H); 7.96-7.97 (м, 1H, C(15')H); 8.07 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 8.48 (д, 2H, $J = 6.5$, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/Гц$): 13.4 (C(24)); 17.5 (C(25)); 17.6 (C(26)); 17.8 (C(29)); 18.8 (C(6)); 21.5 (C(30)); 24.0 (C(27)); 24.9 (C(11)); 26.0 (C(16)); 28.6 (C(3)); 28.8 (C(15)); 30.3 (C(2)); 31.2 (C(21)); 33.2 (C(7)); 37.6 (C(22)); 38.7 (C(10));

39.7 (C(19)); 39.8 (C(20)); 40.3 (C(8)); 42.9 (C(4)); 43.0 (C(14)); 46.9 (C(9), (C(1))); 48.1 (C(17), (C(5))); 53.7 (C(18)); 60.1 (C(4')); 63.9 (C(1')); 69.1 (C(2), (C(23'))); 80.0 (C(3)); 113.3 (C(18')); 115.1 (C(13')); 117.0 (C(10')); 121.1 (C(15')); 122.5 (C(17')); 122.9 (C(6'), (C(8'))); 124.1 (C(16')); 125.9 (C(12)); 126.1 (C(14')); 133.7 (C(12')); 138.8 (C(10') или (C(11'))); 138.8 (C(19')); 139.2 (C(13)); 143.3 (C(9')); 143.3 (C(5')); 156.5 (C(7')); 178.8 (C(28)).

Найдено (%): С, 69.78; Н, 8.06. Вычислено (%): С, 69.73; Н, 8.00. Масс-спектр, m/z для $C_{49}H_{67}N_2O_5$ $[M-Br]^+$ 763.5036. M 763.5044.

N-{4-[(2 α ,3 β ,23-триацетокси-урс-12-ен-28-оил)-бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (54a)



Коричневые кристаллы, выход 0.78г (81%). Т. пл. 197-199°C, $[\alpha]_D^{26} +8^\circ$ (c 0.01, $CHCl_3$). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1742 (C=O), 3370 (NH).

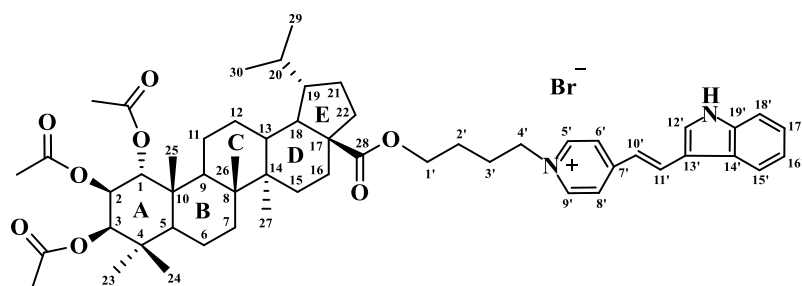
Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 0.63, 0.70, 0.88, 0.97, 0.99, 1.10 (все с, по 3H, C(24)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 1.89, 1.98, 2.03 (все с, по 3H, $COCH_3$); 1.01-2.06 (м, 24H, CH, CH_2 в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 2.23 (д, 1H, $J = 11.0$, C(18)H); 3.50-3.63 (оба д, по 1H, $J = 11.5$, C(23)H); 4.01-4.11 (м, 2H, C(1')H); 4.47-4.49 (м, 2H, C(4')H); 4.94 (д, 1H, $J = 10.0$, C(3)H); 5.04-5.09 (м, 1H, C(2)H); 5.2 (уш. с, 1H, C(12)H); 7.22-7.31 (м, 3H, C(16')H, C(17')H, C(10')H или C(11')H); 7.49-7.51 (м, 1H, C(18')H); 7.89 (с, 1H, C(12')H); 8.02-8.03 (м, 2H, C(6')H, C(8')H); 8.08-8.09 (м, 1H, C(15')H); 8.19-8.23 (м, 1H, C(10')H или C(11')H); 8.59 (уш. с, 2H, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/Гц$): 14.3 (C(24)); 17.7 (C(25)); 17.8 (C(26)); 18.1 (C(29)); 19.1 (C(6)); 20.8 ($COCH_3$); 20.9 ($COCH_3$); 21.1 ($COCH_3$); 21.7 (C(30)); 24.1 (C(27)); 24.5 (C(11)); 25.4 (C(16)); 26.5 (C(3')); 29.2 (C(3')); 29.5 (C(2')); 31.8

(C(21)); 33.8 (C(7)); 38.1 (C(22)); 39.0 (C(10)); 40.4 (C(20), (C(19))); 40.9 (C(8)); 43.2 (C(4)); 43.4 (C(14)); 44.8 (C(1)); 48.6 (C(9), (C(5))); 49.5 (C(17)); 54.4 (C(18)); 60.7 (C(4')); 64.7 (C(1')); 66.2 (C(23)); 76.3 (C(2)); 79.6 (C(3)); 113.7 (C(18')); 115.8 (C(13')); 117.9 (C(10')); 121.7 (C(15')); 122.9 (C(17')); 123.4 (C(8'), (C(6'))); 124.6 (C(16')); 126.5 (C(12)); 126.6 (C(14')); 134.0 (C(12')); 139.1 (C(11')); 139.5 (C(13)); 139.9 (C(19')); 144.2 (C(9'), (C(5'))); 157.3 (C(7')); 172.2 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 172.3 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 172.5 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 179.1 (C(28)).

Найдено (%): С, 68.16; Н, 7.63. Вычислено (%): С, 68.10; Н, 7.59. Масс-спектр, m/z для $\text{C}_{55}\text{H}_{73}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M}-\text{Br}]^+$ 889.5448. M 889.5361.

N-{4-[(1 α ,2 β ,3 β -триацетоксилуп-20,29-дигидробетулиноил)бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)винил]}пиридиниум бромид (63)



Коричневые кристаллы, выход 0.63г (84%). Т. пл. 208-210°C, $[\alpha]_D^{26}$ -27° (c 0.01, CHCl_3). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3393 (NH), 1745 (C=O).

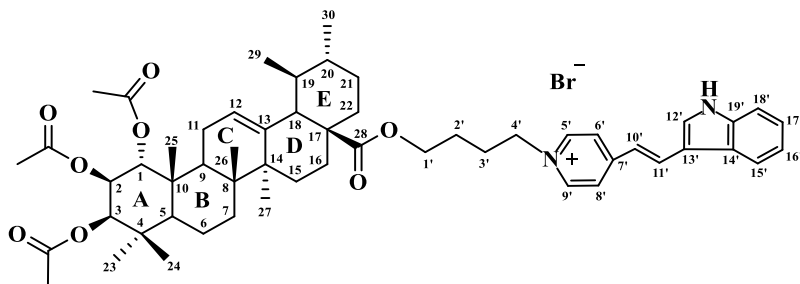
Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.66, 0.75 (оба д, по 3H, $J = 6.4$, C(29)H, C(30)H); 0.71, 0.73, 0.78, 0.87, 0.99 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 0.83-2.15 (м, 26H, CH, CH_2 в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 1.81, 1.86, 2.04 (все с, по 3H, COCH_3); 3.94-4.01, 4.14-4.20, (оба м, по 1H, C(1')H); 4.37-4.41 (м, 2H, C(4')H); 4.61-4.64 (м, 2H, м, C(1)H, C(3)H); 5.02 (с, 1H, C(2)H); 7.08 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 7.17-7.19 (м, 2H, C(16')H), C(17')H); 7.39-7.41 (м, 1H, C(18')H); 7.75 (с, 1H, C(12')H); 7.85 (д, 2H, $J = 6.5$, C(6')H, C(8')H); 7.93-7.95 (м, 1H, C(15')H); 8.06 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 8.45 (д, 2H, $J = 6.5$, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 15.1 (C(26), (C(27), (C(30))); 17.0 (C(24)); 17.8 (C(25)); 18.6 (C(6)); 20.9 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 21.0 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 21.1 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 22.2 (C(11)); 23.6 (C(21)); 23.5 (C(29)); 26.4 (C(12)); 27.8 (C(3')); 28.9 (C(2')); 29.1 (C(23)); 30.5 (C(15)); 30.7 (C(20)); 32.7 (C(16)); 34.7 (C(7)); 38.0 (C(10)); 38.2 (C(22)); 39.1

(C(13)); 41.1 (C(4)); 41.7 (C(8)); 42.5 (C(9)); 44.1 (C(14)); 45.2 (C(19)); 49.8 (C(18)); 50.7 (C(5)); 57.9 (C(17)); 60.2 (C(4')); 63.5 (C(1')); 70.2 (C(2)); 75.2 (C(1)); 76.3 (C(3)); 113.5 (C(18')); 115.4 (C(13')); 117.2 (C(10') или (C(11'))); 121.3 (C(15')); 122.7 (C(17')); 123.0 (C(6'), (C(8'))); 124.3 (C(16')); 126.1 (C(14')); 133.8 (C(12')); 138.9 (C(10') или (C(11'))); 139.1 (C(19')); 143.7 (C(5'), (C(9'))); 156.7 (C(7')); 170.8 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 170.9 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 172.2 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 177.4 (C(28)).

Найдено (%): С, 67.99; Н, 7.83. Вычислено (%): С, 67.96; Н, 7.78. Масс-спектр, m/z для $\text{C}_{55}\text{H}_{73}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M}-\text{Br}]^+$ 891.5567. M 891.5518.

N-{4-[(1 α ,2 β ,3 β -триацетокси-урс-12-ен-28-оил)-бутил]-(E)-4-[2-(1H-индол-3-ил)-винил]}пиридиний бромид (67)



Коричневые кристаллы, выход 0.75г (78%). Т. пл. 188-190°C, $[\alpha]_D^{26}$ 0° (c 0.01, CHCl_3). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1746 (C=O), 3391 (NH).

Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.72, 0.84, 0.86, 0.95, 0.96, 1.13, 1.17 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H, C(29)H, C(30)H); 0.89-2.09 (м, 22H, CH, CH_2 в пентациклическом скелете, C(2')H, C(3')H); 1.85, 1.95, 2.07 (все с, по 3H, COCH_3); 2.22 (д, 1H, $J = 11.0$, C(18)H); 4.00-4.14 (м, 2H, C(1')H); 4.45-4.48 (м, 2H, C(4')H); 4.72 (уш. с, 2H, C(1)H, C(3)H); 5.10, 5.17 (оба с, по 1H, C(2)H, C(12)H); 7.17 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 7.25-7.29 (м, 2H, C(16')H, C(17')H); 7.48-7.50 (м, 1H, C(18')H); 7.84 (с, 1H, C(12')H); 7.94 (д, 2H, $J = 6.5$, C(6')H, C(8')H); 8.03-8.04 (м, 1H, C(15')H); 8.16 (д, 1H, $J = 16.0$, C(10')H или C(11')H); 8.54 (д, 2H, $J = 6.5$, C(5')H, C(9')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 14.7 (C(25)); 17.5 (C(29)); 18.1 (C(26)); 18.3 (C(24)); 18.7 (C(6)); 21.0 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 21.1 (C(30)); 21.6 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 21.5 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 24.1 (C(11)); 24.2 (C(27)); 25.0 (C(16)); 26.1 (C(3')); 28.7 (C(15)); 29.1 (C(2')); 29.4 (C(23)); 31.5 (C(21)); 33.5 (C(7)); 37.7 (C(22)); 37.9 (C(4)); 39.5 (C(9)); 39.9 (C(20)); 40.0 (C(19)); 40.5 (C(8)); 40.7 (C(10)); 43.8 (C(14)); 49.3 (C(17)); 50.8 (C(18)); 54.0

(C(5)); 60.3 (C(4')); 64.3 (C(1')); 70.1 (C(2)); 75.1 (C(1)); 76.2 (C(3)); 113.5 (C(18')); 115.3 (C(13')); 117.2 (C(10') или (C(11'))); 121.3 (C(15')); 122.7 (C(17')); 123.0 (C(6'), (C(8'))); 124.3 (C(16')); 125.8 (C(12)); 126.1 (C(14')); 133.9 (C(12')); 139.0 (C(10') или (C(11'))); 139.1 (C(13)); 139.7 (C(19')); 143.7 (C(5'), (C(9'))); 156.8 (C(7')); 170.7 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 170.9 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 172.2 ($\underline{\text{COCH}}_3$); 178.9 (C(28)).

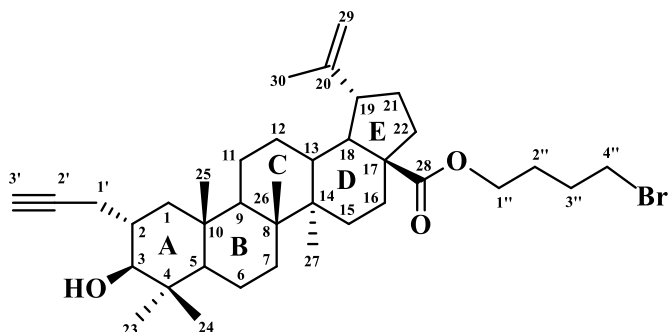
Найдено (%): С, 68.16; Н, 7.64. Вычислено (%): С, 68.10; Н, 7.59. Масс-спектр, m/z для $\text{C}_{55}\text{H}_{73}\text{N}_2\text{O}_8$ [M-Br]⁺ 889.5418. M 889.5361.

3.3 Синтез флуоресцентно-меченых конъюгатов бетулиновой кислоты с трифенилфосфониевым катионом

3.3.1 Синтез бромалкилового эфира C-2 пропилильного производного бетулиновой кислоты 74

К раствору соединения **73** (494.8 мг, 1.0 ммоль), полученному из бетулиновой кислоты по методу [152], в смеси безводных ДМФА – MeCN (10:1, 6 мл) добавили K_2CO_3 (138.2 мг, 1.0 ммоль) и 1,4-дибромбутан (1.19 мл, 10.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 50°C, в течение 3 ч [контроль ТСХ гексан – EtOAc (5:1)]. После завершения реакции добавили H_2O (15 мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 (3 × 20 мл). Органическую фазу сушили над $MgSO_4$, продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле [гексан – EtOAc (30:1→10:1)], получили соединение **74**.

4''-Бромбутил-2 α -пропаргил-3 β -гидроксилуп-20(29)-ен-28-бетулиноат (74)



Белые кристаллы, выход 0.33г (52%). Т. пл. 190-192°C, $[\alpha]_D^{23} -3.7^\circ$ (c 0.29, $CHCl_3$). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1730 (C=O), 2221 (C≡C), 3423 (OH).

Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., J/Гц): 0.79, 0.87, 0.93, 0.99, 0.99 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.69 (с, 3H, C(30)H); 0.78-2.00 (м, 28H, CH, CH_2 в пентациклическом скелете, C(2'')H, C(3'')H, C(3')H); 2.19-2.44 (м, 2H, C(1')H); 3.02 (м, 2H, C(3)H, C(19)H); 3.46 (т, 2H, $J = 8.0$, C(4'')H); 4.10-4.13 (м, 2H, C(1'')H); 4.61, 4.75 (оба с, по 1H, C(29)H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., J/Гц): 14.7 (C(27)); 16.0 (C(25)); 16.2 (C(24)); 17.0 (C(26)); 18.5 (C(6)); 19.3 (C(30)); 21.0 (C(11)); 22.4 (C(1')); 25.5 (C(12)); 27.5 (C(2'')); 28.3 (C(23)); 29.5 (C(3'')); 29.6 (C(15)); 30.6 (C(21)); 32.2 (C(16)); 33.1 (C(4'')); 34.3 (C(7)); 34.8 (C(2)); 37.1 (C(22)); 37.3 (C(4)); 38.3 (C(13)); 39.1 (C(10));

40.7 (C(8)); 42.5 (C(14)); 44.8 (C(1)); 47.0 (C(19)); 49.4 (C(18)); 50.5 (C(9)); 55.4 (C(17)); 56.5 (C(5)); 62.9 (C(1'')); 70.0 (C(3')); 81.5 (C(2'')); 83.0 (C(3)); 109.7 (C(29)); 150.5 (C(20)); 176.1 (C(28)).

Найдено (%): С, 70.50; Н, 9.10. Вычислено (%): С, 70.57; Н, 9.12.

3.3.2 Синтез соединений **68-71**. Общая методика.

К раствору 4-иодбензальдегида или 4-метилбензальдегида (1.0 ммоль) в пирроле (1.6 мл, 23.0 ммоль) добавили InCl_3 (0.05 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере аргона. После перемешивания в течение 6 ч добавили порошкообразный NaOH (200 мг, 5.0 ммоль) и реакцию смесь дополнительно перемешивали в течение 45 мин. Затем реакцию смесь фильтровали на фильтре Шотта с небольшим количеством силикагеля SiO_2 , промывая EtOAc (10-15 мл). Избыток пиррола упарили при пониженном давлении и полученные дипиррометаны **68** или **70** (62% и 72% соответственно) использовали в следующей стадии после их очистки методом колоночной хроматографии на силикагеле [гексан – EtOAc (30:1→10:1)].

К раствору соединения **68** или **70** (1.0 ммоль) в 50 мл CHCl_3 , охлажденному до 0°C, добавили раствор DDQ (227 мг, 1.0 ммоль) в CHCl_3 (10 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин. Затем к реакционной смеси добавили Et_3N (2 мл, 14.5 ммоль) и сразу после этого $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2 мл, 15.8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали еще 3 ч при комнатной температуре. После завершения реакции добавили 0.2 М раствор NaOH (80 мл), органический слой отделили, а водный слой экстрагировали CHCl_3 (3 × 20 мл). Объединенную органическую фазу промыли водой и сушили над безводным MgSO_4 . Продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле [гексан – EtOAc (30:1→10:1)]. В результате получили флуорофоры **69** и **71** с выходом 28% и 50% соответственно.

Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C и спектральные свойства соединений **68-71** идентичны описанным в литературе [183, 184, 188].

3.3.3 Синтез моно-йодида **72**

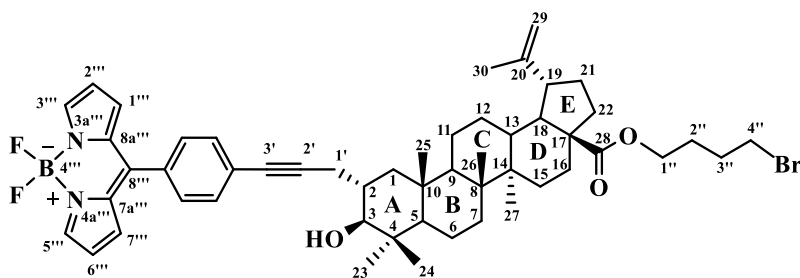
К раствору соединения **71** (282.1 мг, 1.0 ммоль), в смеси сухих растворителей CH_2Cl_2 – MeOH (1:1, 60 мл), добавили раствор ICl (162.4 мг, 1.0 ммоль) в MeOH (10 мл). Полученную смесь перемешивали при кипячении в течение 30 минут в атмосфере аргона [контроль ТСХ (гексан–EtOAc, 10:1)]. После охлаждения растворитель упаривали при пониженном давлении. Оставшееся твердое вещество растворили в CH_2Cl_2 , промыли H_2O , сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и сконцентрировали досуха. После очистки продукта колоночной хроматографией на силикагеле [гексан – EtOAc (100:1)] получили моно-йодид **72** (68 %).

Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C и фотофизические свойства соединения **72** идентичны описанным в литературе [185].

3.3.4 Синтез соединений **75** и **76**. Общая методика.

Пропаргил бромид **74** (1.0 ммоль) и йод-производное BODIPY **69** или **72** (1.0 ммоль) растворили в смеси сухих растворителей Et_3N – ДМФА (1:1.5, 5 мл). Затем к смеси поочередно добавили CuI (38.1 мг, 0.2 ммоль) и $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (39.3 мг, 0.056 ммоль). Полученную реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 1-3 часов в атмосфере аргона [контроль ТСХ гексан–EtOAc (5:1)] и после завершения реакции катализатор отделяли фильтрованием. К фильтрату добавили H_2O (15 мл) и экстрагировали EtOAc (3×10 мл). После упаривания растворителя и очистки методом колоночной хроматографии на силикагеле [гексан–EtOAc (30:1→10:1)] получили соединения **75** и **76**.

4''-Бромбутил-2 α -пропинил-[3'-(4,4-дифтор-4-бора-3 α ,4 α -диаза-*s*-индацен-8-фенил-ил)]-3 β -гидроксиуп-20(29)-ен-28-бетулиноат (75)



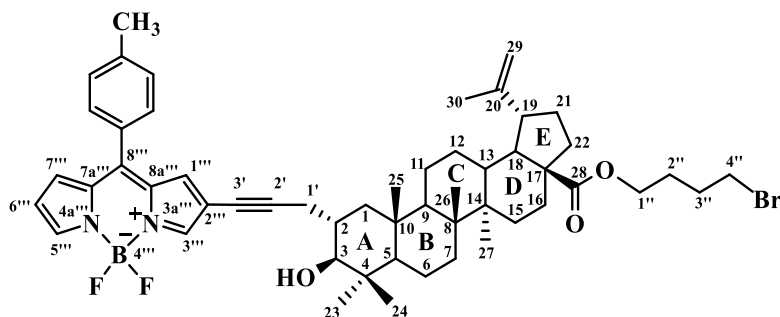
Оранжевые кристаллы, выход 0.72г (80%). Т. пл. 188-190°C, $[\alpha]_D^{23} -20^\circ$ (*c* 0.01, CHCl₃). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1730 (C=O), 2221 (C \equiv C), 3468 (OH).

Спектр ЯМР ¹H (δ , м.д., J/Гц): 0.83, 0.92, 0.96, 1.00, 1.03 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.70 (с, 3H, C(30)H); 0.78-2.27 (м, 28H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2'')H, C(3'')H); 2.58 (дд, 1H, $J_1 = 16.0$, $J_2 = 8.0$, C(1')H_b); 2.78 (дд, 1H, $J_1 = 16.0$, $J_2 = 4.0$, C(1')H_a); 3.00-3.08 (м, 2H, C(3)H, C(19)H); 3.48 (т, 2H, $J = 12.0$, C(4'')H); 4.10-4.16 (м, 2H, C(1'')H); 4.61, 4.75 (оба с, по 1H, C(29)H); 6.57 (д, 2H, $J = 2.8$, C(2''')H, C(6''')H); 6.96 (д, 2H, $J = 4.0$, C(1''')H, C(7''')H); 7.52-7.58 (м, 4H, CH в бензольном кольце); 7.96 (с, 2H, C(3''')H, C(5''')H).

Спектр ЯМР ¹³C (δ , м.д., J/Гц): 14.8 (C(27)); 16.0 (C(25)); 16.2 (C(24)); 17.0 (C(26)); 18.5 (C(6)); 19.4 (C(30)); 21.0 (C(11)); 23.6 (C(1')); 25.6 (C(12)); 27.5 (C(2'')); 28.4 (C(23)); 29.5 (C(3'')); 29.6 (C(15)); 30.6 (C(21)); 32.2 (C(16)); 33.0 (C(4'')); 34.3 (C(7)); 35.5 (C(2)); 37.0 (C(22)); 37.5 (C(4)); 38.3 (C(13)); 39.2 (C(10)); 40.8 (C(8)); 42.5 (C(14)); 45.3 (C(1)); 47.0 (C(19)); 49.4 (C(18)); 50.6 (C(9)); 55.5 (C(17)); 56.6 (C(5)); 62.9 (C(1'')); 81.4 (C(3')); 81.9 (C(3)); 92.3 (C(2')); 109.6 (C(29)); 118.6 (C(2'''), C(6''')); 127.0 (C=C \equiv); 130.5, (2CH в бензольном кольце); 131.4 (C(1'''), C(7''')); 131.7 (2CH в бензольном кольце); 132.8 (C(7a'''), C(8a''')); 134.7 (C(8''')); 144.2 (C(3'''), C(5''')); 146.7 (C=C(8''')–C \equiv CH); 150.6 (C(20)); 176.0 (C(28)).

Найдено (%): С, 69.65; Н 7.40. Вычислено (%): С, 69.72; Н 7.43.

4''-Бромбутил-2 α -пропинил-[3'-(4,4-дифтор-4-бора-3 α ,4 α -диаза-*s*-индацен-8-метилфенил-2-ил)]-3 β -гидроксиуп-20(29)-ен-28-бетулиноат (76)



Бордовые кристаллы, выход 0.54г (60%). Т. пл. 160-162°C, $[\alpha]_D^{23} +40^\circ$ (c 0.01, CHCl_3). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1735 (C=O), 2221 (C \equiv C), 3500 (OH).

Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.80, 0.89, 0.94, 1.00, 1.00 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.70 (с, 3H, C(30)H); 0.75-2.25 (м, 28H, CH, CH₂ в пентациклическом скелете, C(2'')H, C(3'')H); 2.50 (с, 3H, Ph-CH₃), 2.57-2.58 (м, 2H, C(1')H); 3.04-3.02 (м, 2H, C(3)H, C(19)H); 3.48 (т, 2H, $J = 12.0$, C(4'')H); 4.11-4.16 (м, 2H, C(1'')H); 4.62, 4.76 (оба с, по 1H, C(29)H); 6.58 (д, 1H, $J = 4.0$, C(6''')H); 6.95 (с, 1H, C(1''')H); 7.00 (д, 1H, $J = 4.0$, C(7''')H); 7.37, 7.49 (оба д, по 2H, $J = 8.0$, CH в бензольном кольце); 7.96 (с, 2H, C(3''')H, C(5''')H).

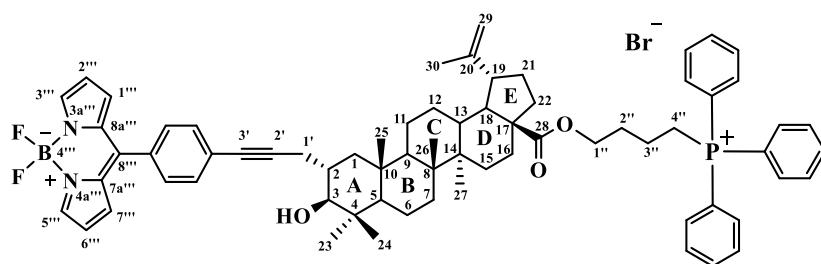
Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 14.8 (C(27)); 16.1 (C(25)); 16.2 (C(24)); 17.0 (C(26)); 18.5 (C(6)); 19.4 (C(30)); 21.0 (C(11)); 21.5 (Ph-CH₃); 23.5 (C(1')); 25.5 (C(12)); 27.5 (C(2'')); 28.3 (C(23)); 29.5 (C(3'')); 29.6 (C(15)); 30.6 (C(21)); 32.2 (C(16)); 33.0 (C(4'')); 34.3 (C(7)); 35.5 (C(2)); 37.1 (C(22)); 37.5 (C(4)); 38.1 (C(13)); 39.2 (C(10)); 40.8 (C(8)); 42.5 (C(14)); 45.2 (C(1)); 47.1 (C(19)); 49.4 (C(18)); 50.5 (C(9)); 55.4 (C(17)); 56.6 (C(5)); 62.9 (C(1'')); 74.6 (C(3'')); 81.6 (C(3)); 91.3 (C(2'')); 109.7 (C(29)); 115.1 (C(6''')); 118.8 (C(2''')); 129.3, 130.6 (оба уш. с, по 2CH в бензольном кольце); 130.8 (C(8''')); 132.1 (C(1''), C(7''')); 134.0 (C(8a''')); 135.4 (C(7a''')); 141.7 (=C(8''')–C=CH); 144.6 (C(3''')); 145.7 (C(5''')); 147.5 (CH=C–CH₃); 150.5 (C(20)); 176.1 (C(28)).

Найдено (%): С, 69.90; Н 7.50. Вычислено (%): С, 69.97; Н 7.53.

3.3.5 Синтез BODIPY-меченых конъюгатов бетулиновой кислоты с трифенилфосфониевым катионом 77 и 78. Общая методика.

Смесь бромида 75 или 76 (0.4 ммоль) и Ph_3P (2.0 ммоль) растворили в ацетонитриле (26 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 26–30 ч до завершения реакции (контроль ТСХ). Раствор охладили и концентрировали при пониженном давлении. Полученный твердый продукт обработали горячим гексаном (2×10 мл) для удаления избытка трифенилфосфина, затем растворили в небольшом количестве EtOAc (2–4 мл) и высадили гексаном (12 мл). Осадок отфильтровывали, получив соединение 77 или 78.

Бромид 4''-трифенилфосфониобутил-2 α -пропинил-[3'-(4,4-дифтор-4-бора-3 α ,4 α -диаза-s-индацен-8-фенил-ил)]-3 β -гидроксилуп-20(29)-ен-28-бетулиноата (77)



Оранжевые

кристаллы, выход 0.37г (81%). Т. пл. 150-152°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} 0^\circ$ (c 0.01, CHCl_3). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1735 (C=O), 2219 (C≡C), 3439 (OH).

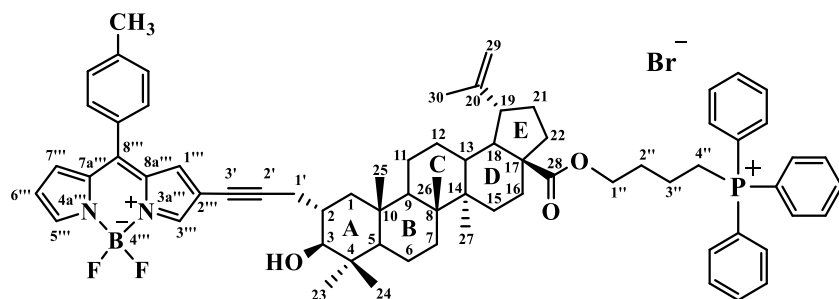
Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.81, 0.84, 0.88, 0.94, 1.01 (все с, по 3H, C(23)H–C(27)H); 1.65 (с, 3H, C(30)H); 0.76-2.12 (м, 28H, CH, CH_2 в пентациклическом скелете, C(2'')H, C(3'')H); 2.55 (дд, 1H, $J_1 = 16.0$, $J_2 = 8.0$, C(1')H_b); 2.78 (дд, 1H, $J_1 = 16.0$, $J_2 = 4.0$, C(1')H_a); 2.88-2.94 (м, 1H, C(19)H); 3.06 (д, 1H, $J = 12.0$, C(3)H); 4.00 (т, 2H, $J = 28.0$, C(4'')H); 4.11-4.16 (м, 2H, C(1'')H); 4.57, 4.68 (оба с, по 1H, C(29)H); 6.56 (д, 2H, $J = 4.0$, C(2''')H, C(6''')H); 6.94 (д, 2H, $J = 4.0$, C(1''')H, C(7''')H); 7.45-7.89 (м, 19H, 4Ph); 7.93 (с, 2H, C(3''')H, C(5''')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 14.7 (C(27)); 16.0 (C(25)); 16.3 (C(24)); 17.0 (C(26)); 18.5 (C(6)); 19.3 (C(30)); 19.6 (C(3'')); 21.0 (C(11)); 22.6 (д, $J = 51.0$, C(4'')); 23.6 (C(1')); 25.5 (C(12)); 28.4 (C(23)); 29.4 (C(2'')); 29.6 (C(15)); 30.5 (C(21)); 32.0 (C(16)); 34.2 (C(7)); 35.5 (C(2)); 36.9 (C(22)); 37.4 (C(4)); 38.1 (C(13)); 39.2 (C(10));

40.7 (C(8)); 42.4 (C(14)); 45.3 (C(1)); 46.9 (C(19)); 49.3 (C(18)); 50.5 (C(9)); 55.5 (C(17)); 56.4 (C(5)); 62.8 (C(1'')); 81.3 (C(3')); 81.7 (C(3)); 92.5 (C(2')); 109.7 (C(29)); 118.6 (д, 3С, $J_{C,P} = 85.0$, Ph); 118.6 (C(2''), C(6'')); 127.1 ($=C-C\equiv$); 128.6 (д, 2СН, $J_C = 12.0$, Ar); 130.6 (д, 6СН, $J_{C,P} = 13.0$, Ph); 131.7 (C(1''), C(7'')); 132.0 (д, 2СН, $J_C = 10.0$, Ar), 132.7 (C(7a''), C(8a'')); 133.7 (д, 6СН, $J_{C,P} = 9.0$, Ph), 134.7 (C(8'')); 135.1 (уш. с, 3СН, Ph), 144.1 (C(3''), C(5'')); 146.7 ($=C(8'')-C=CH$); 150.4 (C(20)); 175.9 (C(28)).

Найдено (%): С, 72.63; Н, 7.08. Вычислено (%): С, 72.60; Н, 7.05. Масс-спектр, m/z для $C_{70}H_{81}BBrF_2N_2O_3P$ $[M-Br]^+$ 1077.6074. M 1077.6040.

Бромид 4''-трифенилфосфониобутил-2 α -пропинил-[3'-(4,4-дифтор-4-бора-3 α ,4 α -диаза-*s*-индацен-8-метилфенил-2-ил)]-3 β -гидроксиуп-20(29)-ен-28-бетулиноата (78)



Бордовые кристаллы, выход 0.36г (78%). Т. пл. 208-210°C, $[\alpha]_D^{23} 0^\circ$ (c 0.01, $CHCl_3$). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1735 (C=O), 2220 (C \equiv C), 3468 (OH).

Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 0.78, 0.81, 0.83, 0.93, 0.98, (все с, по 3Н, C(23)H–C(27)H); 1.65(с, 3Н, C(30)H); 0.71-2.13 (м, 29Н, СН, СН₂, в пентациклическом скелете, C(1')H_b, C(2'')H, C(3'')H); 2.48 (с, 3Н, Ph-CH₃), 2.57 (дд, 1Н, $J_1 = 16.0$, $J_2 = 4.0$, C(1')H_a); 2.89-2.93 (м, 1Н, C(19)H); 3.01 (д, 1Н, $J = 8.0$, C(3)H); 3.95 (с, 2Н, C(4'')H); 4.11-4.16 (м, 2Н, C(1'')H); 4.58, 4.68 (оба с, по 1Н, C(29)H); 6.57 (д, 1Н, $J = 4.0$, C(6'')H); 6.94 (с, 1Н, C(1'')H); 6.99 (с, 1Н, C(7'')H); 7.35, 7.47 (оба д, по 2Н, $J = 8.0$, СН в бензольном кольце); 7.70-7.89 (м, 15Н, 3Ph), 7.92 (д, 2Н, $J = 8.0$, C(3'')H, C(5'')H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д., $J/Гц$): 14.8 (C(27)); 16.0 (C(25)); 16.3 (C(24)); 17.0 (C(26)); 18.5 (C(6)); 19.3 (C(30)); 19.6 (C(3'')); 20.9 (C(11)); 21.5 (Ph-CH₃); 22.5 (д, $J = 40$ Hz, C(4'')); 23.5 (C(1')); 25.4 (C(12)); 27.4 (C(2'')); 28.3 (C(23)); 29.6 (C(15));

30.5 (C(21)); 32.0 (C(16)); 34.2 (C(7)); 35.2 (C(2)); 37.0 (C(22)); 37.4 (C(4)); 38.2 (C(13)); 39.1 (C(10)); 40.7 (C(8)); 42.4 (C(14)); 45.1 (C(1)); 47.0 (C(19)); 49.3 (C(18)); 50.4 (C(9)); 55.3 (C(17)); 56.4 (C(5)); 62.8 (C(1'')); 74.5 (C(3'')); 81.5 (C(3)); 91.4 (C(2'')); 109.8 (C(29)); 115.1 (C(2''')); 118.6 (д, 3C, $J_{C,P} = 68.0$, Ph); 118.8 (C(6''')); 129.3 (уш. с, 2CH, Ar); 130.6 (д, 8CH, $J_{C,P} = 12.0$, Ph), 130.7 (C(8''')); 132.1 (C(1'''), C(7''')); 133.8 (д, 6CH, $J_{C,P} = 11.0$, Ph), 134.0 (C(8a''')); 135.1 (уш. с, 3CH, Ph), 135.4 (C(7a''')); 141.7 ($=C(8''')-\underline{C}=CH$); 144.6 (C(3''')); 145.6 (C(5''')); 147.5 ($CH=C-\underline{C}-CH_3$); 150.4 (C(20)); 176.0 (C(28)).

Найдено (%): C, 72.78; H, 7.17. Вычислено (%): C, 72.75; H, 7.14. Масс-спектр, m/z для $C_{71}H_{83}BBrF_2N_2O_3P$ $[M-Br]^+$ 1091.6282. M 1091.6197.

3.4 Биологические исследования конъюгатов «тритерпеноид-F16»

3.4.1 Исследование цитотоксической активности конъюгатов 5, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 33 в отношении лейкозных клеток (U937, Jurkat, K562). Общая методика.

Жизнеспособность клеток после обработки тестируемыми соединениями изучали методом проточной цитометрии. Жизнеспособность (живые/мертвые) оценивали путем окрашивания клеток 7-ААД (7-аминоактиномицином D) (Biolegend). После обработки клетки собирали, промывали 1 или 2 раза фосфатно-солевым буфером (PBS) и центрифугировали при 400 g в течение 5 мин. Осадки клеток ресуспендировали в 200 мл буфера для окрашивания проточной цитометрии (PBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} , 2.5% FBS) и окрашивали 5 $\mu\text{л}$ раствора 7-ААД в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Образцы были получены с помощью системы проточной цитометрии NovoCyte™ 2000 (ACEA), оснащенной аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Эмиссия 7-ААД собиралась через фильтр 675/30 нм в канале FL4.

3.4.2 Исследование цитотоксической активности конъюгата 18 в отношении карциномы молочной железы MCF-7

Для анализа цитотоксического действия клетки MCF-7 высевали в 96-луночные планшеты Nunc (Thermo Scientific) в концентрации 12×10^4 клеток/мл (12×10^3 клеток в 100 $\mu\text{л}$ питательной среды на лунку) и при концентрации 35×10^3 клеток/мл (3.5×10^3 клеток в 100 $\mu\text{л}$ питательной среды на лунку) для клеток HF. Добавление БК или конъюгата 18 проводили в трехкратной повторности из свежеприготовленных растворов исходного конъюгата (5-10 мМ) в растворе Хэнкса в концентрациях 0.01-100 $\mu\text{М}$. Конечная концентрация ДМСО в свежеприготовленном растворе конъюгата не превышала 1% и не была токсичной для клеток. Все обработки проводили через 24 часа после посева клеток на чашки. Инкубация клеток с конъюгатами продолжалась 48 часов. Цитотоксичность определяли методом определения количества клеток в монослое культуры с

использованием красителя кристаллического фиолетового (КФ). Метод основан на связывании КФ с нуклеопротеинами в фиксированных клетках, причем количество связанного красителя линейно коррелировало с количеством жизнеспособных клеток. Для этого после инкубации среду с планшетов удаляли, клетки окрашивали 0.2%-ным спиртовым раствором КФ, инкубировали с красителем, промывали водой и сушили. Через 24 часа в каждую лунку добавляли SDS (додецилсульфат натрия). Цитотоксичность соединений определяли по соотношению оптических плотностей за вычетом измеренного фонового поглощения в обработанных и необработанных культурах через 48 часов после добавления соединений с использованием микропланшетного спектрофлуориметра Infinite 200 (TECAN, Грёдиг, Австрия). Величина оптической плотности была прямо пропорциональна количеству жизнеспособных клеток. Количество жизнеспособных клеток оценивали с использованием анализа исключения трипанового синего после трипсинизации клеточной культуры.

3.4.3 Исследование цитотоксического действия конъюгата 18 на клеточные циклы карциномы молочной железы MCF-7 и здоровых клеток фибробластов

Для анализа клеточного цикла клетки высевали в колбы Т-25 или чашки Петри Р-35 для культивирования (Корнинг, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, США) в концентрации 12×10^4 клеток/мл для MCF-7 и в концентрации 35×10^3 клеток/мл для HF. Конъюгат и БК добавляли в концентрациях 1 и 5 μM соответственно через 24 ч после посева клеток и инкубировали в течение 24 или 48 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . После инкубации клетки собирали трипсином вместе со средой и промывали ледяным буфером PBS (pH 7.4). Затем полученные клетки ресуспендировали в буфере PBS, в пробирки добавляли 2 объема 70% холодного этанола и смешивали с клетками медленным перемешиванием. После фиксации этанолом при 20°C в течение ночи клетки центрифугировали ($1,0 \times 1000$ об/мин, 3 мин) и супернатант отбрасывали. Затем каждый образец клеток ресуспендировали в PBS и окрашивали флуоресцентным

ДНК-связывающим красителем иодидом пропидия (10 г/мл). Затем к каждому образцу добавляли 50 г/мл РНКазы А (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и полученные образцы инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Распределение клеток между фазами G0/G1, S и G2/M клеточного цикла оценивали с использованием BD Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США), а полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения ModFit LT 4.1.

3.4.4 Исследование цитотоксической активности олеаноловой и урсоловой кислот и конъюгатов 24, 28, 50 и 51 в отношении клеток карцином (H1299, A549, MCF7, BT474). Общая методика.

Для проведения МТТ-анализа 3500 клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты. Через сутки после посева добавляли тритерпеноиды или их производные, растворенные в ДМСО. ДМСО использовали в качестве контроля. Через 48 ч после посева клеток в каждую лунку добавляли по 10 μ л раствора тиазолилового синего (5 мг/мл) (Paneko, Россия) и клетки выдерживали 3 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. После удаления тиазолсодержащей среды добавляли 150 μ л изопропилового спирта (с добавлением 40 мМ HCl и 0,1% NP-40) для растворения соли МТТ-формаза. Поглощение при 570 и 630 нм (эталон) измеряли с использованием микропланшетного считывателя BioRad iMark (BioRad, Геркулес, Калифорния, США). Для эксперимента использовали четыре биологических повтора. Результаты обрабатывались с помощью программного обеспечения Excel (номер версии: 14.0.6023.1000 (32-разрядная версия)). Значения IC₅₀ были рассчитаны с помощью онлайн-калькулятора ААТ Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>, по состоянию на 15 мая 2023 г.) и представлены как среднее значение \pm SEM.

3.4.5 Исследование внутриклеточного распределения конъюгата **15 (F-1) и его структурного трифенилфосфониевого аналога **78** (B-4) в эндотелиальных клетках мышцы. Общая методика.**

Исследование митохондриальной локализации конъюгатов **15** и **78** проводили методом конфокальной микроскопии. Всего за 3 дня до начала экспериментов клетки субкультивировали на круглых покровных стеклах. Полученные клетки отмывали от питательной среды и помещали в полный раствор Хэнкса. Затем к образцам добавляли 200 нМ MitoTracker DeepRed FM (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс, США) и тестируемое соединение (в конечной концентрации 200 нМ). Образцы инкубировали 30 мин при 37°C в темноте, затем клетки дважды промывали свежим раствором Хэнкса. Конфокальные изображения получали с помощью микроскопа DMI6000 (Leica, Германия), оснащенного масляно-иммерсионным объективом с 63-кратным увеличением. Флуоресценцию MitoTracker DeepRed FM измеряли на длинах волн (Ex/Em) 638/650 нм; конъюгат **15** при 450/550 нм; конъюгат **78** при 514/560 нм. Максимумы указаны для излучения (окно 20 нм). Колокализацию оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ 1.52p (Fiji) (НИН, Бетесда, Мэриленд, США).

Заключение

Получен новый тип митохондриально-направленных катионных производных природных тритерпеновых кислот в качестве потенциальных 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 митохондрий 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 ранее неопisanного 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

7-ААД – 7-аминоактиномицин D

A549 – модель легочного эпителия альвеолярного типа II

$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ – эфират трифторида бора

BODIPY – 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен

CCl_4 – четыреххлористый углерод

CH_2Cl_2 – дихлорметан

COSY – гомоядерная корреляционная спектроскопия

DCC – N,N'-дициклогексилкарбодимид

DDQ – 2,3-дихлор-5,6-дициано-*p*-бензохинон

DEPT – неискаженное усиление переноса поляризации

DLC – делокализованный липофильный катион

DMAP – 4-диметиламинопиридин

DMEM – широко используемая базовая среда для поддержания роста многих различных клеток млекопитающих

DNP – 2,4-динитрофенол

DOX – доксорубицин

DQA – катион деквалиния

ER – эстроген

Et_3N – триэтиламин

F16 – (E)-4(1H-индол-3-илвинил)-N-метилпиридиний йодид

FBS – эмбриональная телячья сыворотка, добавка для культивирования эукариотических клеток *in vitro*

H1299 – клеточная линия немелкоклеточной карциномы легких человека

Her2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа, присутствующий в тканях, участвует в регуляции деления и дифференцировки клеток

HF – незлокачественные клетки фибробласты человека

HMBC – гетероядерная корреляционная спектроскопия через несколько

связей

HSQC – гетероядерная корреляционная спектроскопия

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

Jurkat – Т-лимфобластный лейкоз

K562 – хронический миелоидный лейкоз

MCF-7 – аденокарцинома молочной железы

m-CPBA – *m*-хлорнадбензойная кислота

MitoTracker DeepRed FM – флуоресцентный краситель на основе карбоцианина, который позволяет визуализировать митохондрии в живых клетках

NBS – N-бромсукцинимид

NOESY – спектроскопия на основе эффекта Оверхаузера

PARP – поли(АДФ-рибоза)-полимеразы

PBS – фосфатно-солевой буфер

SDS – додецилсульфат натрия

TPP – трифенилфосфин

U937 – лейкомическая моноцитарная лимфома

АК – азиатиковая кислота

АТФ – аденозин трифосфат

АФК – активные формы кислорода

БК – бетулиновая кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамид

КК – коросолевая кислота

Кристаллический фиолетовый – основной трифенилметановый краситель, применяется в качестве кислотно-основного индикатора и для различных окрасок препаратов в биологии

Митоканы – противоопухолевые препараты, нацеленные на митохондрии

МК – маслиновая кислота

ОК – олеаноловая кислота

Раствор Хэнкса – раствор неорганических солей и глюкозы в очищенной воде, простерилизованный через фильтры с размером пор 0.22 мкм, содержит соли кальция и магния

ТГФ – тетрагидрофуран

Трипановый синий – прямой азокраситель, используемый для селективного окрашивания клеток и тканей

УК – урсоловая кислота

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.]. – DOI 10.3322/caac.21492. // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – V. 68. – P. 394-424.
2. Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities / S.R.Y. Cajal, M. Sese, C. Capdevila [et al.]. – DOI 10.1007/s00109-020-01874-2. // *J. Mol. Med.* – 2020. – V. 98. – P. 161-177.
3. The role of clonal communication and heterogeneity in breast cancer / A.M. Pardillos, A.V. Chiva, G.B. Vargas [et al.]. – DOI 10.1186/s12885-019-5883-y. // *BMC Cancer.* – 2019. – V. 19. – P. 666-691.
4. Mitochondrial gateways to cancer / L. Galluzzi, E. Morselli, O. Kepp [et al.]. – DOI 10.1016/j.mam.2009.08.002. // *Mol. Aspects Med.* – 2010. – V. 31. – P. 1-20.
5. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria / E.A. Liberman, V.P. Topaly, L.M. Tsofina [et al.]. – DOI 10.1038/2221076a0. // *Nature.* – 1969. – V. 222. – P. 1076-1078.
6. Belosludtsev, K.N. Diabetes mellitus, mitochondrial dysfunction and Ca²⁺-dependent permeability transition pore / K.N. Belosludtsev, N.V. Belosludtseva, M.V. Dubinin. – DOI 10.3390/ijms21186559. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – P. 6559-6591.
7. Fulda, S. Targeting mitochondria for cancer therapy / S. Fulda, L. Galluzzi, G. Kroemer. – DOI 10.1038/nrd3137. // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2010. – V. 9. – P. 447-464.
8. A Novel conjugate of bis[(((4-bromophenyl)amino)quinazoline)], a EGFR-TK ligand, with a fluorescent Ru(II)-bipyridine complex exhibits specific subcellular localization in mitochondria / R. Ilmi, E. Tseriotou, P. Stylianou [et al.]. – DOI 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00608. // *Mol. Pharm.* – 2019. – V. 16. – P. 4260-4273.
9. TPP-based mitocans: a potent strategy for anticancer drug design / J. Wang, J. Li, Y. Xiao [et al.]. – DOI 10.1039/c9md00572b. // *RSC Med. Chem.* – 2020. – V. 11. – P. 858-875.

10. Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology / M.F. Ross, G.F. Kelso, F.H. Blaikie [et al.]. – DOI 10.1007/s10541-005-0104-5. // *Biochemistry (Mosc)*. – 2005. – V. 70. – P. 222-230.
11. Yousif L.F. Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: Strategies and applications / L.F. Yousif, K.M. Stewart, S.O. Kelley. – DOI 10.1002/cbic.200900185. // *Chembiochem*. – 2009. – V. 10. – P. 1939-1950.
12. Mitochondria-targeting drug conjugates for cytotoxic, anti-oxidizing and sensing purposes: Current strategies and future perspectives / G. Battogtokha, Y.S. Choia, D.S. Kang [et al.]. – DOI 10.1016/j.apsb.2018.05.006. // *Acta Pharm. Sin. B*. – 2018. – V. 8. – P. 862-880.
13. Medicinal chemistry targeting mitochondria: From new vehicles and pharmacophore groups to old drugs with mitochondrial activity / M. Cataláni, I. Olmedo, J. Faúndez, J.A. Jara. – DOI 10.3390/ijms21228684. // *Int. J. Mol. Sci*. – 2020. – V. 21. – P. 8684-8709.
14. Modica-Napolitano, J.S. Treatment strategies that enhance the efficacy and selectivity of mitochondria-targeted anticancer agents / J.S. Modica-Napolitano, V. Weissig. – DOI 10.3390/ijms160817394. // *Int. J. Mol. Sci*. – 2015. – V. 16. – P. 17394-17421.
15. Mitocans revisited: Mitochondrial targeting as efficient anti-cancer therapy / L. Dong, V. Gopalan, O. Holland, J. Neuzil. – DOI 10.3390/ijms21217941. // *Int. J. Mol. Sci*. – 2020. – V. 21. – P. 7941-7962.
16. Транспорт ионов и электрический потенциал митохондриальных мембран / Е.А. Либерман, В.П. Топалы, Л.М. Цофина [и др.]. // *Биохимия*. – 1969. – Т. 34, № 5. – С. 1083-1087.
17. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles / L.L. Grinius, A.A. Jasaitis, Yu.P. Kadziauskas [et al.]. – DOI 10.1016/0005-2728(70)90153-2. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1970. – V. 216. – P. 1-12.

18. Murphy, M.P. Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria / M.P. Murphy. – DOI 10.1016/s0167-7799(97)01068-8. // Trends Biotechnol. – 1997. – V. 15. – P. 326-330.
19. Murphy, M.P. Drug delivery to mitochondria: The key to mitochondrial medicine / M.P. Murphy, R.A.J. Smith. – DOI 10.1016/s0169-409x(99)00069-1. // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2000. – V. 41. – P. 235-250.
20. Dequalinium, a topical antimicrobial agent, displays anticarcinoma activity based on selective mitochondrial accumulation / M.J. Weiss, J.R. Wong, C.S. Ha [et al.]. – DOI 10.2307/30054. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1987. – V. 84. – P. 5444-5448.
21. Effect of dequalinium on respiration and the inner membrane permeability of rat liver mitochondria / K.N. Belosludtsev, N.V. Belosludtseva, K.S. Tenkov [et al.]. – DOI 10.1134/S1990747818020034. // Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. – 2018. – V. 12, № 2. – P. 121-127.
22. Study of the selective cytotoxic properties of cationic, lipophilic mitochondrial-specific compounds in gynecologic malignancies / J.E. Christman, D.S. Miller, P. Coward [et al.]. – DOI 10.1016/0090-8258(90)90402-7. // Gynecol. Oncol. – 1990. – V. 39. – P. 72-79.
23. Rhodamine 123 inhibits bioenergetic function in isolated rat liver mitochondria / J.S. Modica-Napolitano, M.J. Weiss, L.B. Chen, J.R. Aprille. – DOI 10.1016/0006-291x(84)91453-0. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – V. 118, № 3. – P. 717-723.
24. Fantin, V.R. F16, a mitochondriotoxic compound, triggers apoptosis or necrosis depending on the genetic background of the target carcinoma cell / V.R. Fantin, P. Leder. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-03-0899. // Cancer Res. – 2004. – V. 64. – P. 329-336.
25. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth / V.R. Fantin, M.J. Berardi, L. Scorrano [et al.]. – DOI 10.1016/s1535-6108(02)00082-x. // Cancer Cell. – 2002. – V. 2. – P. 29-42.

26. MKT-077, a novel rhodacyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation / K. Koya, Y. Li, H. Wang [et al.]. // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56. – P. 538-543.
27. Selective damage to carcinoma mitochondria by the rhodacyanine MKT-077 / J.S. Modica-Napolitano, K. Koya, E. Weisberg [et al.]. // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56. – P. 544-550.
28. A phase I and pharmacokinetic study of the mitochondrial-specific rhodacyanine dye analog MKT 077 / C.D. Britten, E.K. Rowinsky, S.D. Baker [et al.]. // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – V. 6. – P. 42-49.
29. Phase I trial of the selective mitochondrial toxin MKT 077 in chemo-resistant solid tumours / D.J. Propper, J.P. Braybrooke, D.J. Taylor [et al.]. – DOI 10.1023/A:1008336904585. // *Ann. Oncol.* – 1999. – V. 10. – P. 923-927.
30. A double-blind, placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant mitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease / B.J. Snow, F.L. Rolfe, M.M. Lockhart [et al.]. – DOI 10.1002/mds.23148. // *Mov. Disord.* – 2010. – V. 25. – P. 1670-1674.
31. The mitochondria-targeted anti-oxidant mitoquinone decreases liver damage in a phase II study of hepatitis C patients / E.J. Gane, F. Weilert, D.W. Orr [et al.]. – DOI 10.1111/j.1478-3231.2010.02250.x. // *Liver Int.* – 2010. – V. 30. – P. 1019-1026.
32. Koltover, V.K. (2010). Antioxidant biomedicine: from free radical chemistry to systems biology mechanisms / V.K. Koltover. – DOI 10.1007/s11172-010-0042-2. // *Russ. Chem. Bull.* – 2010. – V. 59, № 1. – P. 37-42.
33. Sheu, S.S. Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction / S.S. Sheu, D. Nauduri, M.W. Anders. – DOI 10.1016/j.bbadis.2005.10.007. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1762. – P. 256-265.
34. Triphenylphosphonium (TPP)-based antioxidants: A new perspective on antioxidant design / J.Y. Wang, J.Q. Li, Y.M. Xiao [et al.]. – DOI 10.1002/cmdc.201900695. // *ChemMedChem.* – 2020. – V. 15. – P. 404-410.
35. Mitochondria-targeted antioxidants, an innovative class of antioxidant compounds for neurodegenerative diseases: Perspectives and limitations / M. Fields, A.

Marcuzzi, A. Gonelli [et al.]. – DOI 10.3390/ijms24043739. // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – V. 24. – P. 3739.

36. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: Antioxidant and antiapoptotic properties / G.F. Kelso, C.M. Porteous, C.V. Coulter [et al.]. – DOI 10.1074/jbc.M009093200. // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, № 7. – P. 4588-4596.

37. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: Synthesis and *in vitro* studies / Y.N. Antonenko, A.V. Avetisyan, L.E. Bakeeva [et al.]. – DOI 10.1134/S0006297908120018. // Biochemistry (Mosc). – 2008. – V. 73, № 12. – P. 1273-1287.

38. Skulachev, V.P. A biochemical approach to the problem of aging: «Megaproject» on membrane-penetrating ions. The first results and prospects / V.P. Skulachev. – DOI 10.1134/S0006297907120139. // Biochemistry (Mosc). – 2007. – V. 72, № 12. – P. 1385-1396.

39. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach / V.P. Skulachev, V.N. Anisimov, Yu.N. Antonenko [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbabi.2008.12.008. // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1787. – P. 437-461.

40. Skulachev, V.P. Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress / V.P. Skulachev. – DOI 10.1016/j.bbrc.2013.10.063. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2013. – V. 441. – P. 275-279.

41. SkQ1 ophthalmic solution for dry eye treatment: Results of a phase 2 safety and efficacy clinical study in the environment and during challenge in the controlled adverse environment model / A. Petrov, N. Perekhvatova, M. Skulachev [et al.]. – DOI 10.1007/s12325-015-0274-5. // Adv. Ther. – 2016. – V. 33. – P. 96-115.

42. Doughan, A.K. Mitochondrial redox cycling of mitoquinone leads to superoxide production and cellular apoptosis / A.K. Doughan, S.I. Dikalov. – DOI 10.1089/ars.2007.1693. // Antioxid. Redox Signal. – 2007. – V. 9, № 11. – P. 1825-1836.

43. A mitochondria-targeted derivative of ascorbate: MitoC / P.G. Finichiu, D.S. Larsen, C. Evans [et al.]. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.160. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – V. 89. – P. 668-678.
44. Selective targeting of an antioxidant to mitochondria / R.A.J. Smith, C.M. Porteous, C.V. Coulter, M.P. Murphy. – DOI 10.1046/j.1432-1327.1999.00543.x. // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – V. 263. – P. 709-716.
45. Mitochondria-targeted vitamin E derivative decreases hepatic oxidative stress and inhibits fat deposition in mice / G. Mao, G.A. Kraus, I. Kim [et al.]. – DOI 10.3945/jn.110.121715. // *J. Nutr.* – 2010. – V. 140. – P. 1425-1431.
46. Robertson, L. Synthesis of N-arylpyridinium salts bearing a nitron spin trap as potential mitochondria-targeted antioxidants / L. Robertson, R.C. Hartley. – DOI 10.1016/j.tet.2009.04.083. // *Tetrahedron.* – 2009. – V. 65. – P.5284-5292.
47. Xu, Y. Synthesis and ESR studies of a novel cyclic nitron spin trap attached to a phosphonium group—a suitable trap for mitochondria-generated ROS? / Y. Xu, B. Kalyanaraman. – DOI 0.1080/10715760600911147. // *Free Radic. Res.* – 2007. – V. 41, № 1. – P. 1-7.
48. Mitochondria-targeted spin traps: Synthesis, superoxide spin trapping, and mitochondrial uptake / M. Hardy, F. Poulhès, E. Rizzato [et al.]. – DOI 10.1021/tx500032e. // *Chem. Res. Toxicol.* – 2014. – V. 27. – P. 1155-1165.
49. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: Studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from *p*-phenyl-N-tert-butylnitron / M.P. Murphy, K.S. Echtay, F.H. Blaikie [et al.]. – DOI 10.1074/jbc.M308529200. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 48534-48545.
50. Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: Role of mitochondrial superoxide / A. Dhanasekaran, S. Kotamraju, C. Karunakaran [et al.]. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.016. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – V. 39. – P. 567-583.
51. A mitochondria-targeted macrocyclic Mn (II) superoxide dismutase mimetic / G.F. Kelso, A. Maroz, H.M. Cochemé [et al.]. – DOI 10.1016/j.chembiol.2012.08.005. // *Chem. Biol.* – 2012. – V. 19. – P. 1237-1246.

52. Synthesis and characterization of a triphenylphosphonium-conjugated peroxidase mimetic: Insights into the interaction of ebselen with mitochondria / A. Filipovska, G.F. Kelso, S.E. Brown [et al.]. – DOI 10.1074/jbc.M501148200. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 24113-24126.
53. Gorlach, S. Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs / S. Gorlach, J. Fichna, U. Lewandowska. – DOI 10.1016/j.canlet.2015.07.004. // *Cancer Lett.* – 2015. – V. 366. – P. 141-149.
54. Ralph, S.J. Mitochondria as targets for cancer therapy / S.J. Ralph, J. Neuzil. – DOI 10.1002/mnfr.200800044. // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2009. – V. 53. – P. 9-28.
55. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy / P. Costantini, E. Jacotot, D. Decaudin, G. Kroemer. – DOI 10.1093/jnci/92.13.1042. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2000. – V. 92, № 13. – P. 1042-1053.
56. Wen, S. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach / S. Wen, D. Zhu, P. Huang. – DOI 10.4155/fmc.12.190. // *Future Med. Chem.* – 2013. – V. 5, №1. – P. 53-67.
57. Why mitochondria are excellent targets for cancer therapy / Z. Tatarkova, S. Kuka, M. Petráš [et al.]. // *Klin. Onkol.* – 2012. – V. 25, № 6. – P. 421-426.
58. Gogvadze, V. Targeting mitochondria in fighting cancer / V. Gogvadze. – DOI 10.2174/138161211798764933. // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – V. 17. – P. 4034-4046.
59. Mitocans: Mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents / S.J. Ralph, P. Low, L. Dong [et al.]. – DOI 10.2174/157489206778776952. // *Recent. Pat. Anticancer Drug Discov.* – 2006. – V. 1, № 3. – P. 327-346
60. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria / J. Neuzil, L.F. Dong, J. Rohlena [et al.]. – DOI 10.1016/j.mito.2012.07.112. // *Mitochondrion.* – 2012. – V. 13. –P. 199-208.
61. Application prospects of triphenylphosphine-based mitochondria-targeted cancer therapy / X. Cheng, D. Feng, J. Lv [et al.]. – DOI 10.3390/cancers15030666. // *Cancers.* – 2023. – V. 15. – P. 666.

62. A multi-mitochondrial anticancer agent that selectively kills cancer cells and overcomes drug resistance / Y.B. Peng, Z.L. Zhao, T. Liu [et al.]. – DOI 10.1002/cmdc.201600538. // *ChemMedChem*. – 2017. – V. 12. – P. 250-256.
63. A selective mitochondrial-targeted chlorambucil with remarkable cytotoxicity in breast and pancreatic cancers / M. Millard, J.D. Gallagher, B.Z. Olenyuk, N. Neamati. – DOI 10.1021/jm4012438. // *J. Med. Chem.* – 2013. – V. 56. – P. 9170-9179.
64. Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435/DOX cells / M. Han, M.R. Vakili, H. Soleymani Abyaneh [et al.]. – DOI 10.1021/mp500038g. // *Mol. Pharm.* – 2014. – V. 11. – P. 2640-2649.
65. Delivery of mitochondriotropic doxorubicin derivatives using self-assembling hyaluronic acid nanocarriers in doxorubicin-resistant breast cancer / H.N. Liu, N.N. Guo, W.W. Guo [et al.]. – DOI 10.1038/aps.2018.9. // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2018. – V. 39. – P. 1681-1692.
66. Marrache, S. Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance / S. Marrache, R.K. Pathak, S. Dhar. – DOI 10.1073/pnas.1405244111. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – V. 111. – P. 10444-10449.
67. Mitochondrial targeting of metformin enhances its activity against pancreatic cancer / S. Boukalova, J. Stursa, L. Werner [et al.]. – DOI 10.1158/1535-7163.MCT-15-1021. // *Mol. Cancer Ther.* – 2016. – V. 15. – P. 2875-2886.
68. Selective disruption of respiratory supercomplexes as a new strategy to suppress Her2^{high} breast cancer / K. Rohlenova, K. Sachaphibulkij, J. Stursa [et al.]. – DOI 10.1089/ars.2016.6677. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2017. – V. 26, № 2. – P. 84-103.
69. Mitochondrion-targeted platinum complexes suppressing lung cancer through multiple pathways involving energy metabolism / Z. Zhu, Z. Wang, C. Zhang [et al.]. – DOI 10.1039/C8SC04871A. // *Chem. Sci.* – 2019. – V. 10. – P. 3089-3095.
70. Mani, S. Natural Agents Targeting Mitochondria in Cancer / S. Mani, G. Swargiary, K.K. Singh. – DOI 10.3390/ijms21196992. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – P. 6992.

71. Mitochondrial-targeted curcuminoids: A strategy to enhance bioavailability and anticancer efficacy of curcumin / C.A. Reddy, V. Somepalli, T. Golakoti [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0089351. // PLoS One. – 2014. – V.9, № 3. – P. e89351.
72. A novel selective mitochondrial-targeted curcumin analog with remarkable cytotoxicity in glioma cells / L. Shi, L.L. Gao, S.Z. Cai [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejmech.2021.113528. // Eur. J. Med. Chem. – 2021. – V. 221. – P. 113528.
73. Mitochondria-targeted curcumin loaded CTPP–PEG–PCL self-assembled micelles for improving liver fibrosis therapy / L. Zhang, X. Pan, L. Xu [et al.]. – DOI 10.1039/d0ra09589c. // RSC Adv. – 2021. – V. 11. – P. 5348.
74. Colorectal cancer: Chemopreventive role of curcumin and resveratrol / V.B. Patel, S. Misra, B.B. Patel, A.P.N. Majumdar. – DOI 10.1080/01635581.2010.510259. // Nutr. Cancer. – 2010. – V. 62, № 7. – P. 958-967.
75. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma / R. Wilken, M.S. Veena, M.B. Wang, E.S. Srivatsan. – DOI 10.1186/1476-4598-10-12. // Mol. Cancer. – 2011. – V. 10. – P. 1-19.
76. Curcumin inhibits aerobic glycolysis and induces mitochondrial-mediated apoptosis through hexokinase II in human colorectal cancer cells *in vitro* / K. Wang, H. Fan, Q. Chen [et al.]. – DOI 10.1097/CAD.000000000000132. // Anticancer Drugs. – 2015. – V. 26, № 1. – P. 15-24.
77. Redox properties and cytotoxicity of synthetic isomeric mitochondriotropic derivatives of the natural polyphenol quercetin / A. Mattarei, N. Sassi, C. Durante [et al.]. – DOI 10.1002/ejoc.201100573. // Eur. J. Org. Chem. – 2011. – V. 2011. – P. 5577-5586.
78. Cytotoxicity of a mitochondriotropic quercetin derivative: Mechanisms / N. Sassi, L. Biasutto, A. Mattarei [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbabi.2012.03.007. // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – V. 1817. – P. 1095-1106.
79. A mitochondriotropic derivative of quercetin: a strategy to increase the effectiveness of polyphenols / A. Mattarei, L. Biasutto, E. Marotta [et al.]. – DOI 10.1002/cbic.200800162. // ChemBioChem. – 2008. – V. 9. – P. 2633-2642.

80. The anti-cancer effects of mitochondrial-targeted triphenylphosphonium–resveratrol conjugate on breast cancer cells / L. Jiang, H. Yu, C. Wang [et al.]. – DOI 10.3390/ph15101271. // *Pharmaceuticals*. – 2022. – V. 15. – P. 1271.
81. Development of mitochondria-targeted derivatives of resveratrol / L. Biasutto, A. Mattarei, E. Marotta [et al.]. – DOI 10.1016/j.bmcl.2008.08.100. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – V. 18. – P. 5594-5597.
82. Shankar, S. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential / S. Shankar, G. Singh, R.K. Srivastava. – DOI 10.2741/2432. // *Front Biosci.* – 2007. – V. 12. – P. 4839-4854.
83. Cytotoxicity of mitochondria-targeted resveratrol derivatives: Interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase / N. Sassi, A. Mattarei, M. Azzolini [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbabi.2014.06.010. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1837. – P. 1781-1789.
84. Gallic acid-mitochondria targeting sequence-H₃R₉ induces mitochondria-targeted cytoprotection / Y. Bae, G.Y. Kim, F. Jessa [et al.]. – DOI 10.4196/kjpp.2022.26.1.15. // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* – 2022. – V. 26, № 1. – P. 15-24.
85. Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in syngenic mice / J.A. Jara, V. Castro-Castillo, J. Saavedra-Olavarría [et al.]. – DOI 10.1021/jm500174v. // *J. Med. Chem.* – 2014. – V. 57. – P. 2440-2454.
86. Novel gallate triphenylphosphonium derivatives with potent antichagasic activity / L.A. Cortes, L. Castro, B. Pesce [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0136852. // *PLoS One.* – 2015. – V. 10, № 8. – P. e0136852.
87. Derivatives of alkyl gallate triphenylphosphonium exhibit antitumor activity in a syngeneic murine model of mammary adenocarcinoma / L. Peredo-Silva, S. Fuentes-Retamal, C. Sandoval-Acuña [et al.]. – DOI 10.1016/j.taap.2017.06.017. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2017. – V. 329. – P. 334-346.
88. Mitochondria-targeted honokiol confer a striking inhibitory effect on lung cancer via inhibiting complex I activity / J. Pan, Y. Lee, G. Cheng [et al.]. – DOI 10.1016/j.isci.2018.04.013. // *iScience.* – 2018. – V. 3. – P. 192-207.

89. Honokiol inhibits lung tumorigenesis through inhibition of mitochondrial function / J. Pan, Q. Zhang, Q. Liu [et al.]. – DOI 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0091. // *Cancer Prev. Res.* – 2014. – V. 7, № 11. – P. 1149-1159.
90. Fulda, S. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: A mini-review / S. Fulda, K.M. Debatin. – DOI 10.1016/j.cdp.2006.03.007. // *Cancer Detect. Prev.* – 2006. – V. 30. – P. 217-223.
91. Targets involved in the anti-cancer activity of quercetin in breast, colorectal and liver neoplasms / A. Maugeri, A. Calderaro, G.T. Patanè [et al.]. – DOI 10.3390/ijms24032952. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24. – P. 2952.
92. Semisynthetic quercetin derivatives with potent antitumor activity in colon carcinoma / A. Mukherjee, S. Mishra, N.K. Kotla [et al.]. – DOI 10.1021/acsomega.9b00143. // *ACS Omega.* – 2019. – V. 4. – P. 7285-7298.
93. Mitochondria-targeted resveratrol derivatives act as cytotoxic pro-oxidants / N. Sassi, A. Mattarei, M. Azzolini [et al.]. – DOI 10.2174/13816128113199990034. // *Curr. Pharm. Des.* – 2014. – V. 20, № 2. – P. 172-179.
94. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human breast cancer cells by lauryl gallate / A. Calcabrini, J.M. García-Martínez, L. González [et al.]. – DOI 10.1093/carcin/bgl044. // *Carcinogenesis.* – 2006. – V.27, № 8. – P.1699-1712.
95. Mitochondrially targeted vitamin E succinate efficiently kills breast tumour-initiating cells in a complex II-dependent manner / B. Yan, M. Stantic, R. Zabalova [et al.]. – DOI 10.1186/s12885-015-1394-7. // *BMC Cancer.* – 2015. – V. 15. – P. 401.
96. Vitamin E analogs, a novel group of "mitocans," as anticancer agents: the importance of being redox-silent / J. Neuzil, M. Tomasetti, Y. Zhao [et al.]. – DOI 10.1124/mol.106.030122. // *Mol. Pharmacol.* – 2007. – V. 71, № 5. – P. 1185-1199.
97. Vitamin E analogues as a novel group of mitocans: Anti-cancer agents that act by targeting mitochondria / J. Neuzil, L.F Dong, L. Ramanathapuram [et al.]. – DOI 10.1016/j.mam.2007.02.003. // *Mol. Aspects Med.* – 2007. – V. 28. – P. 607-645.
98. Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II / L.F. Dong, V.J.A. Jameson, D. Tilly

[et al.]. – DOI 10.1074/jbc.M110.186643. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286, № 5. – P. 3717-3728.

99. Mitochondrially targeted α -tocopheryl succinate is antiangiogenic: potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing / J. Rohlena, L.F. Dong, K. Kluckova [et al.]. – DOI 10.1089/ars.2011.4192. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – V. 15, № 12. – P. 2923-2935.

100. α -Tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II / L.F. Dong, P. Low, J.C. Dyason [et al.]. – DOI 10.1038/onc.2008.69. // *Oncogene.* – 2008. – V. 27. – P. 4324-4335.

101. Csuk, R. Betulinic acid and its derivatives: A patent review (2008–2013) / R. Csuk. – DOI 10.1517/13543776.2014.927441. // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2014. – V. 24, № 8. – P. 913-923.

102. Cichewicz, R.H. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection / R.H. Cichewicz, S.A. Kouzi. – DOI 10.1002/med.10053. // *Med. Res. Rev.* – 2004. – V. 24, № 1. – P. 90-114.

103. The Potential of Triterpenoids in the Treatment of Melanoma / J. Sarek, M. Kvasnica, M. Vlk [et al.]. – DOI 10.5772/19582. // *Research on Melanoma – A Glimpse into Current Directions and Future Trends* / InTech; edited by M. Murph. – Rijeka, 2011. – Ch. 7. – P. 125-158.

104. Betulinic acid derivatives as anticancer agents: Structure activity relationship / R. Mukherjee, V. Kumar, S.K. Srivastava [et al.]. – DOI 10.2174/187152006776930846. // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2006. – V. 6, № 3. – P. 271-279.

105. Betulinic acid: Recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy / M. Ali-Seyed, I. Jantan, K. Vijayaraghavan, S.N.A. Bukhari. – DOI 10.1111/cbdd.12682. // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2016. – V. 87. – P. 517-536.

106. Betulinic acid and its derivatives as potential antitumor agents / D.M. Zhang, H.G. Xu, L. Wang [et al.]. – DOI 10.1002/med.21353. // *Med. Res. Rev.* – 2015. – V. 35, № 6. – P. 1127-1155.

107. Betulinic acid induces apoptosis in differentiated PC12 cells Via ROS-mediated mitochondrial pathway / X. Wang, X. Lu, R. Zhu [et al.]. – DOI 10.1007/s11064-016-2147-y. // *Neurochem. Res.* – 2017. – V. 42. – P. 1130-1140.
108. Tan, Y.M. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation / Y.M. Tan, R. Yu, J.M. Pezzuto. // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – V. 9. – P. 2866-2875.
109. Fulda, S. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers / S. Fulda, G. Kroemer. – DOI 10.1016/j.drudis.2009.05.015. // *Drug Discov. Today.* – 2009. – V. 14, № 17-18. – P. 885-890.
110. Fulda, S. Mitochondria as therapeutic targets for the treatment of malignant disease / S. Fulda, G. Kroemer. – DOI 10.1089/ars.2011.4078. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – V. 15, № 12. – P. 2937-2949.
111. Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents / H. Chen, Y. Gao, A. Wang [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejmech.2015.01.031. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2015. – V. 92. – P. 648-655.
112. Down-regulation of AKT signalling by ursolic acid induces intrinsic apoptosis and sensitization to doxorubicin in soft tissue sarcoma. / V.H. Villar, O. Vögler, F. Barceló [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0155946. // *PLoS One.* – 2016. – V.11, №5. – P. e0155946.
113. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies / M.K. Shanmugam, X. Dai, A.P. Kumar [et al.]. – DOI 10.1016/j.bcp.2013.03.006. // *Biochem. Pharmacol.* – 2013. – V. 85. – P. 1579-1587.
114. Effect of betulin and betulonic acid on isolated rat liver mitochondria and liposomes / M.V. Dubinin, A.A. Semenova, A.I. Ilzorkina [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbamem.2020.183383. // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* – 2020. – V. 1862. – P. 183383.
115. Synthesis of lupane triterpenoids with triphenylphosphonium substituents and studies of their antitumor activity / A.Yu. Spivak, D.A. Nedopekina, E.R. Shakurova [et

- al.]. – DOI 10.1007/s11172-013-0028-y. // *Russ. Chem. Bull.* – 2013. – V. 62, № 1. – P. 188-198.
116. Triphenylphosphonium cations of betulinic acid derivatives: synthesis and antitumor activity / A.Yu. Spivak, D.A. Nedopekina, R.R. Khalitova [et al.]. – DOI 10.1007/s00044-016-1771-z. // *Med. Chem. Res.* – 2017. – V. 26. – P. 518-531.
117. Design, synthesis, and cancer cell growth inhibitory activity of triphenylphosphonium derivatives of the triterpenoid betulin / O.V. Tsepaeva, A.V. Nemtarev, T.I. Abdullin [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jnatprod.7b00105. // *J. Nat. Prod.* – 2017. – V. 80, № 8. – P. 2232-2239.
118. Mitochondria-targeted betulinic and ursolic acid derivatives: synthesis and anticancer activity / D.A. Nedopekina, R.R. Gubaidullin, V.N. Odinokov [et al.]. – DOI 10.1039/c7md00248c. // *Med. Chem. Commun.* – 2017. – V. 8. – P. 1934-1945.
119. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium conjugated glycyrrhetic acid derivatives as potent anticancer drugs / L. Jin, L. Dai, M. Ji, H. Wang. – DOI 10.1016/j.bioorg.2018.12.036. // *Bioorg. Chem.* – 2019. – V. 85. – P. 179-190.
120. Mitochondria-targeted lupane triterpenoid derivatives and their selective apoptosis-inducing anticancer mechanisms / Y. Ye, T. Zhang, H. Yuan [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jmedchem.7b00679. // *J. Med. Chem.* – 2017. – V. 60. – P. 6353-6363.
121. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium conjugated C-3 modified betulin: Synthesis, antitumor properties and mechanism of action / G. Xu, X. Xu, J. Liu [et al.]. – DOI 10.1002/cmdc.202100659. // *ChemMedChem.* – 2022. – V. 17. – P. e202100659.
122. Design, synthesis and preliminary evaluation of the cytotoxicity and antibacterial activity of novel triphenylphosphonium derivatives of betulin / M. Grymel, A. Lalik, A. Kazek-Kęsik [et al.]. – DOI 10.3390/molecules27165156. // *Molecules.* – 2022. – V. 27. – P. 5156.
123. Conjugation of natural triterpenic acids with delocalized lipophilic cations: Selective targeting cancer cell mitochondria / A.Y. Spivak, D.A. Nedopekina, R.R. Gubaidullin [et al.]. – DOI 10.3390/jpm11060470. // *J. Pers. Med.* – 2021. – V. 11. – P. 470.

124. Novel triphenylphosphonium amphiphilic conjugates of glycerolipid type: Synthesis, cytotoxic and antibacterial activity, and targeted cancer cell delivery / O.V. Tsepaeva, A.V. Nemtarev, T.N. Pashirova [et al.]. – DOI 10.1039/D2MD00363E. // RSC Med. Chem. – 2023. – V. 14. – P. 454-469.
125. Rhodamine B conjugates of triterpenoic acids are cytotoxic mitocans even at nanomolar concentrations / S. Sommerwerk, L. Heller, C. Kerzig [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejmech.2016.12.040. // Eur. J. Med. Chem. – 2017. – V. 127. – P. 1-9.
126. Transformation of asiatic acid into a mitocanic, bimodal-acting rhodamine B conjugate of nanomolar cytotoxicity / M. Kahnt, J. Wiemann, L. Fischer (née Heller) [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejmech.2018.09.066. // Eur. J. Med. Chem. – 2018. – V. 159. – P. 143-148.
127. Ugi multicomponent-reaction: Syntheses of cytotoxic dehydroabietylamine derivatives / J. Wiemann, L. Fischer (née Heller), J. Kessler [et al.]. – DOI 10.1016/j.bioorg.2018.09.014. // Bioorg. Chem. – 2018. – V. 81. – P. 567-576.
128. Wolfram, R.K. Targeting mitochondria: Esters of rhodamine B with triterpenoids are mitocanic triggers of apoptosis / R.K. Wolfram, L. Heller, R. Csuk. – DOI 10.1016/j.ejmech.2018.04.031. // Eur. J. Med. Chem. – 2018. – V. 152. – P. 21-30.
129. Homopiperazine-rhodamine B adducts of triterpenoic acids are strong mitocans / R.K. Wolfram, L. Fischer (née Heller), R. Kluge [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejmech.2018.06.051. // Eur. J. Med. Chem. – 2018. – V. 155. – P. 869-879.
130. Mitocanic Di- and Triterpenoid rhodamine B conjugates / S. Hoenke, I. Serbian, H.P. Deigner, R. Csuk. – DOI 10.3390/molecules25225443. // Molecules. – 2020. – V. 25. – P. 5443.
131. Serbian, I. Synthesis of some steroidal mitocans of nanomolar cytotoxicity acting by apoptosis / I. Serbian, S. Hoenke, R. Csuk. – DOI 10.1016/j.ejmech.2020.112425. // Eur. J. Med. Chem. – 2020. – V. 199. – P. 112425.
132. Type and position of linkage govern the cytotoxicity of oleanolic acid rhodamine B hybrids / N. Heise, S. Hoenke, V. Simon [et al.]. – DOI 10.1016/j.steroids.2021.108876. // Steroids. – 2021. – V. 172. – P. 108876.

133. Rhodamine 101 conjugates of triterpenoic amides are of comparable cytotoxicity as their rhodamine B analogs / N.V. Heise, D. Major, S. Hoenke [et al.]. – DOI 10.3390/molecules27072220. // *Molecules*. – 2022. – V. 27. – P. 2220.
134. Madecassic acid – A new scaffold for highly cytotoxic agents / O. Kraft, A.K. Hartmann, S. Hoenke [et al.]. – DOI 10.3390/ijms23084362. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23. – P. 4362.
135. Asiatic acid as a leading structure for derivatives combining sub-nanomolar cytotoxicity, high selectivity, and the ability to overcome drug resistance in human preclinical tumor models / O. Kraft, A.K. Hartmann, S. Brandt [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejmech.2023.115189. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2023. – V. 250. – P. 115189.
136. Converting bile acids into mitocans / B. Brandes, S. Hoenke, C. Schultz [et al.]. – DOI 10.1016/j.steroids.2022.109148. // *Steroids*. – 2023. – V. 189. – P. 109148.
137. An improved partial synthesis of corosolic acid and its conversion to highly cytotoxic mitocans / N.V. Heise, S. Hoenke, I. Serbian, R. Csuk. – DOI 10.1016/j.ejmcr.2022.100073. // *Eur. J. Med. Chem. Rep.* – 2022. – V. 6. – P. 100073.
138. Ursolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2012-2016) / H. Hussain, I.R. Green, I. Ali [et al.]. – DOI 10.1080/13543776.2017.1344219. // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2017. – V. 27, № 9. – P. 1061-1072.
139. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types / J.H. Kessler, F.B. Mullauer, G.M. de Roo, J.P. Medema. – DOI 10.1016/j.canlet.2006.11.003. // *Cancer Lett.* – 2007. – V. 251. – P. 132-145.
140. Lin, C. Oleanolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review / C. Lin, X. Wen, H. Sun. – DOI 10.1080/13543776.2016.1182988. // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2016. – V. 26, № 6. – P. 643-655.
141. Mullauer, F.B. Betulinic acid, a natural compound with potent anti-cancer effects / F.B. Mullauer, J.H. Kessler, J.P. Medema. – DOI 10.1097/CAD.0b013e3283357c62. // *Anti-Cancer Drugs*. – 2010. – V. 21, № 3. – P. 215-227.
142. Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells / A.K. Pathak,

- M. Bhutani, A.S. Nair [et al.]. – DOI 10.1158/1541-7786.MCR-06-0348. // *Mol. Cancer Res.* – 2007. – V. 5, № 9. – P. 943-955.
143. Zhang, X. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression (Review) / X. Zhang, J. Hu, Y. Chen. – DOI 10.3892/mmr.2016.5792. // *Mol. Med. Rep.* – 2016. – V. 14. – P. 4489-4495.
144. Kamble, S.M. Multifunctional pentacyclic triterpenoids as adjuvants in cancer chemotherapy: a review / S.M. Kamble, S.N. Goyal, C.R. Patil. – DOI 10.1039/c4ra02784a. // *RSC Adv.* – 2014. – V. 4. – P. 33370-33382.
145. Conjugated 5-fluorouracil with mitochondria-targeting lipophilic cation: design, synthesis and biological evaluation / J. Wang, X.Y. Fan, L.Y. Yang [et al.]. – DOI 10.1039/c6md00268d. // *Med. Chem. Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 2016-2019.
146. A novel bifunctional mitochondria-targeted anticancer agent with high selectivity for cancer cells / H. He, D.W. Li, L.Y. Yang [et al.]. – DOI 10.1038/srep13543. // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 13543.
147. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности / С.А. Кузнецова, Н.Ю. Васильева, Г.С. Калачева [и др.]. // *J. Siberian Federal Univ. Chem.* – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 151-165.
148. Anti-AIDS Agents. 34. Synthesis and structure–activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents / I.C. Sun, H.K. Wang, Y. Kashiwada [et al.]. – DOI 10.1021/jm980391g. // *J. Med. Chem.* – 1998. – V. 41, № 23. – P. 4648-4657.
149. Microwave-assisted solvent-free synthesis of some dimethine cyanine dyes, spectral properties and TD-DFT/PCM calculations / X.H. Zhang, L.Y. Wang, G.H. Zhai [et al.]. // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2007. – V. 28, № 12. – P. 2382-2388.
150. Indole-based cyanine as a nuclear RNA-selective two-photon fluorescent probe for live cell imaging / L. Guo, M.S. Chan, D. Xu [et al.]. – DOI 10.1021/cb500927r. // *ACS Chem. Biol.* – 2015. – V. 10, № 5. – P. 1171-1175.
151. Nedopekina, D. Effective Synthesis of a Novel Betulinic Acid Conjugate with Mitochondria-Targeting Cation F16 / D. Nedopekina, E. Davletshin, A. Spivak. – DOI 10.3390/ecsoc-25-11638. // *Chem. Proc.* – 2022. – V. 8. – P. 97.

152. Effective synthesis of novel C(2)-propargyl derivatives of betulinic and ursolic acids and their conjugation with β -D-glucopyranoside azides via click chemistry / A.Y. Spivak, R.R. Gubaidullin, Z.R. Galimshina [et al.]. – DOI 10.1016/j.tet.2016.01.024. // Tetrahedron. – 2016. – V. 72. – P. 1249-1256.
153. Homo- and Cross Coupling of C-2 Propargyl Substituted Triterpenoic Acids: Synthesis of Novel Symmetrical and Unsymmetrical Triterpene 1,3-Diynes / R.R. Gubaidullin, R.R. Khalitova, D.A. Nedopekina, A.Yu. Spivak. – DOI 10.1002/slct.201803522. // ChemistrySelect. – 2018. – V. 3. – P. 13526-13529.
154. Dimethylaminopyridine derivatives of lupane triterpenoids cause mitochondrial disruption and induce the permeability transition / T.C. Bernardo, T. Cunha-Oliveira, T.L. Serafim [et al.]. – DOI 10.1016/j.bmc.2013.09.066. // Bioorg. Med. Chem. – 2013. – V. 21. – P. 7239-7249.
155. Effect of F16-betulin conjugate on mitochondrial membranes and its role in cell death initiation / M.V. Dubinin, A.A. Semenova, D.A. Nedopekina [et al.]. – DOI 10.3390/membranes11050352. // Membranes. – 2021. – V. 11. – P. 352.
156. Mitochondria-targeted prooxidant effects of betulinic acid conjugated with delocalized lipophilic cation F16 / M.V. Dubinin, A.A. Semenova, A.I. Ilzorkina [et al.]. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.036. // Free Radic. Biol. Med. – 2021. – V. 168 – P. 55-69.
157. 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 [et al.]. – DOI 10.3390/biomedicines10112903. // Biomedicines. – 2022. – V. 10. – P. 2903.
158. Pentacyclic triterpene acid conjugated with mitochondria-targeting cation F16: Synthesis and evaluation of cytotoxic activities / A.Yu. Spivak, D.A. Nedopekina, R.R. Gubaidullin [et al.]. – DOI 10.1007/s00044-021-02702-z. // Med. Chem. Res. – 2021. – V. 30. – P. 940-951.
159. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae) / J.E. Angeh, X. Huang, I.

- Sattler [et al.]. – DOI 10.1016/j.jep.2006.09.002. // J. Ethnopharmacol. – 2007. – V. 110. – P. 56-60.
160. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure–activity relationships, and X-ray crystallographic studies / X. Wen, H. Sun, J. Liu [et al.]. – DOI 10.1021/jm8000949. // J. Med. Chem. – 2008. – V. 51, № 12. – P. 3540-3554.
161. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae) / J.D. Djoukeng, E. Abou-Mansour, R. Tabacchi [et al.]. – DOI 10.1016/j.jep.2005.05.008. // J. Ethnopharmacol. – 2005. – V. 101. – P. 283-286.
162. Pentacyclic triterpene derivatives possessing polyhydroxyl ring A inhibit Gram-positive bacteria growth by regulating metabolism and virulence genes expression / L. Huang, H. Luo, Q. Li [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejmech.2015.01.015. // Eur. J. Med. Chem. – 2015. – V. 95. – P. 64-75.
163. Antibacterial triterpenoids from *Dillenia papuana* and their structure-activity relationships / A. Nick, A.D. Wright, T. Rali, O. Sticher. – DOI 10.1016/0031-9422(95)00491-O. // Phytochemistry. – 1995. – V. 40, № 6. – P. 1691-1695.
164. Pharmacological review on Asiatic acid and its derivatives: A potential compound / J. Lv, A. Sharma, T. Zhang [et al.]. – DOI 10.1177/2472630317751840. // SLAS Technol. – 2018. – V. 23, № 2. – P. 111-127.
165. Pharmacological Properties, Molecular Mechanisms and Pharmaceutical Development of Asiatic acid: A Pentacyclic Triterpenoid of Therapeutic Promise / M.F. Nagoor Meeran, S.N. Goyal, K. Suchal [et al.]. – DOI 10.3389/fphar.2018.00892. // Front. Pharmacol. – 2018. – V. 9. – P. 892.
166. On the influence of the rhodamine substituents onto the cytotoxicity of mitocanic maslinic acid rhodamine conjugates / M. Kozubek, T.C. Denner, M. Eckert [et al.]. – DOI 10.1016/j.rechem.2022.100708. // Results Chem. – 2023. – V. 5. – P. 100708.
167. James, J.T. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban / J.T. James, I.A. Dubery. – DOI 10.3390/molecules14103922. // Molecules. – 2009. – V. 14. – P. 3922-3941.

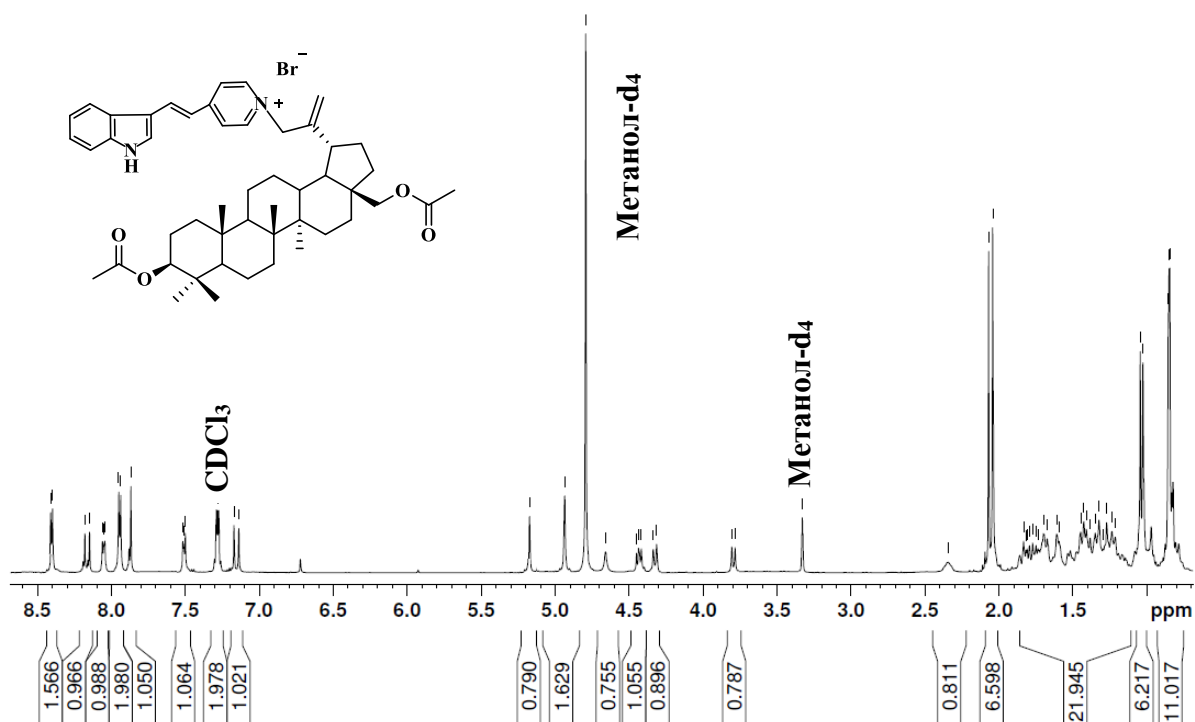
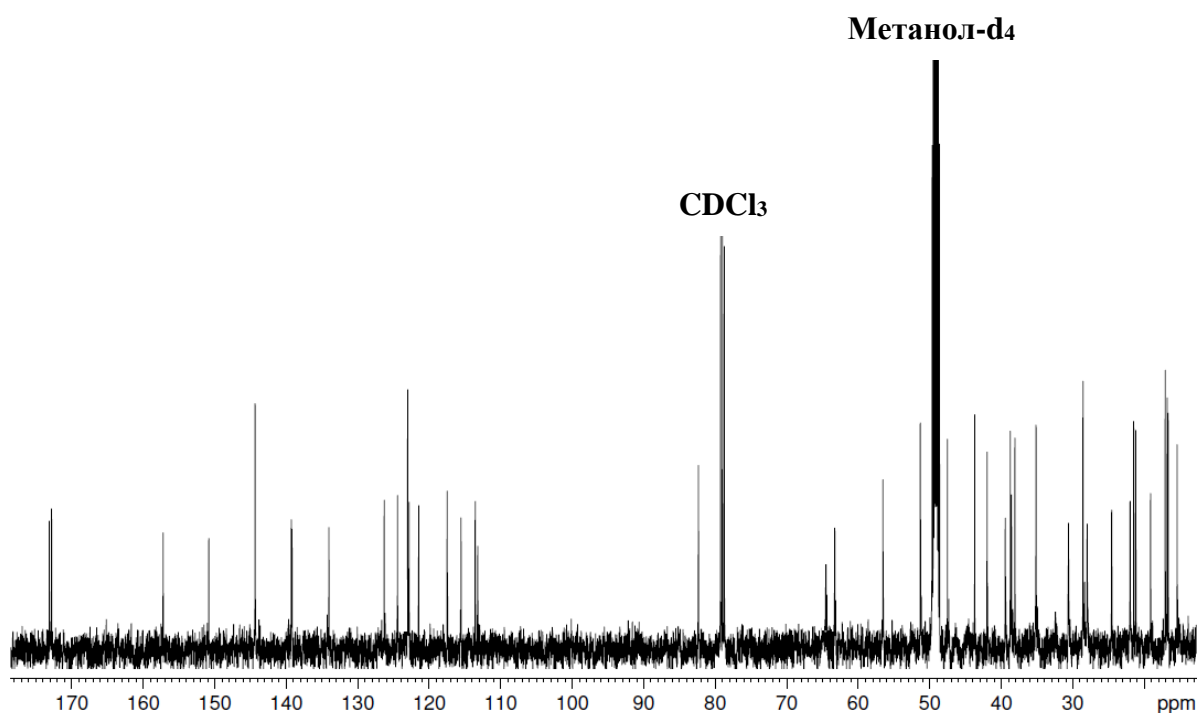
168. Mitochondria-Targeting 1,5-Diazacyclooctane-Spacered Triterpene Rhodamine Conjugates Exhibit Cytotoxicity at Sub-Nanomolar Concentration against Breast Cancer Cells / N. Heise, S. Becker, T. Mueller [et al.]. – DOI 10.3390/ijms241310695. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24. – P. 10695.
169. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties / A.T. Nelson, A.M. Camelio, K.R. Claussen [et al.]. – DOI 10.1016/j.bmcl.2015.07.029. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2015. – V. 25. – P. 4342-4346.
170. Straightforward partial synthesis of four diastereomeric 2,3-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acids from oleanolic acid / S. Sommerwerk, L. Heller, I. Serbian, R. Csuk. – DOI 10.1016/j.tet.2015.09.037. // *Tetrahedron.* – 2015. – V. 71. – P. 8528-8534.
171. Synthesis and Biological Evaluation of Heterocyclic Ring-Fused Betulinic Acid Derivatives as Novel Inhibitors of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption / J. Xu, Z. Li, J. Luo [et al.]. – DOI 10.1021/jm201540h. // *J. Med. Chem.* – 2012. – V. 55. – P. 3122-3134.
172. Stereoselectivity of sodium borohydride reduction of saturated steroidal ketones utilizing conditions of Luche reduction / E. Stastná, I. Cerný, V. Pouzar, H. Chodounská. – DOI 10.1016/j.steroids.2010.04.010. // *Steroids.* – 2010. – V. 75. – P. 721-725.
173. Cerium(III) Chloride-Mediated Stereoselective Reduction of a 4-Substituted Cyclohexanone Using NaBH₄ / P. Maity, M. Gujjar, R. Vellingiri [et al.]. – DOI 10.1021/acs.oprd.9b00458. // *Org. Process Res. Dev.* – 2019. – V. 23. – P. 2754-2757.
174. 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 [et al.]. – DOI 10.1007/s10600-023-04137-x. // *Chem. Nat. Compd.* – 2023. – V. 59, № 5. – P. 865-871.
175. 18 β -Glycyrrhetic Acid Derivatives Possessing a Trihydroxylated A Ring Are Potent Gram-Positive Antibacterial Agents / L.R. Huang, X.J. Hao, Q.J. Li [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b00641. // *J. Nat. Prod.* – 2016. – V. 79, № 4. – P. 721-731.

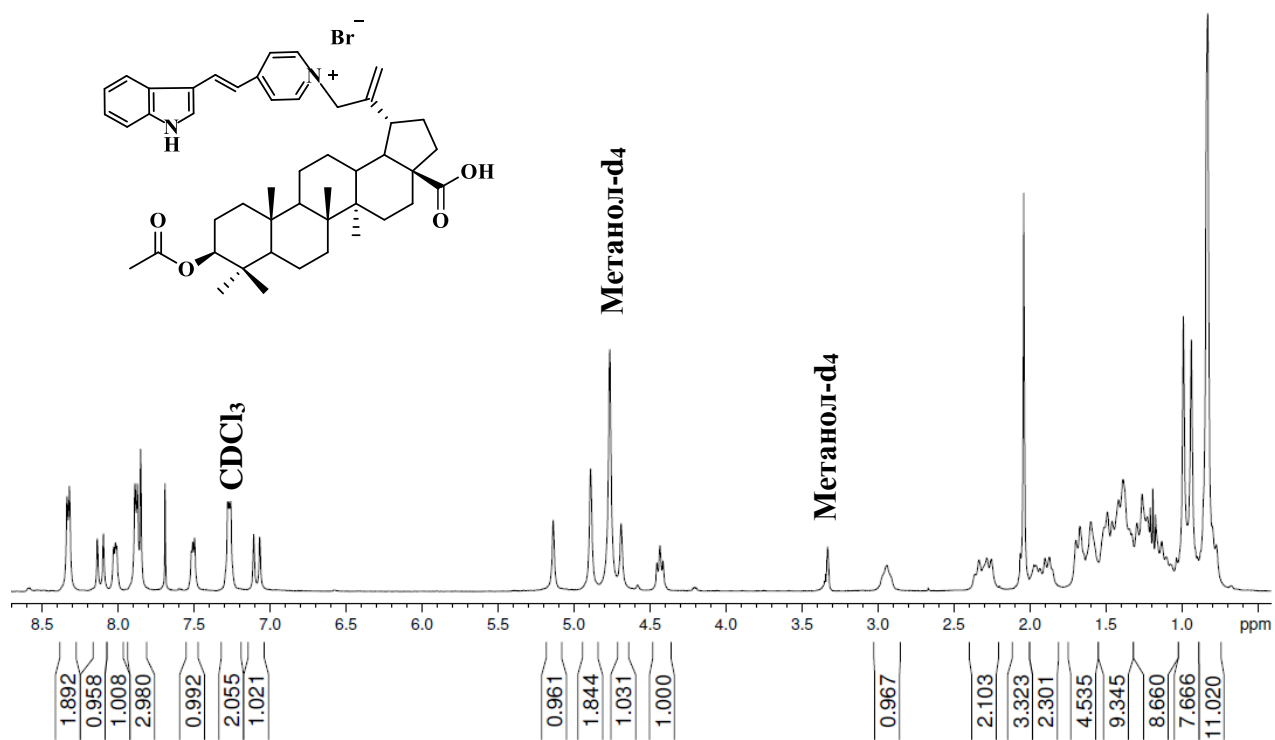
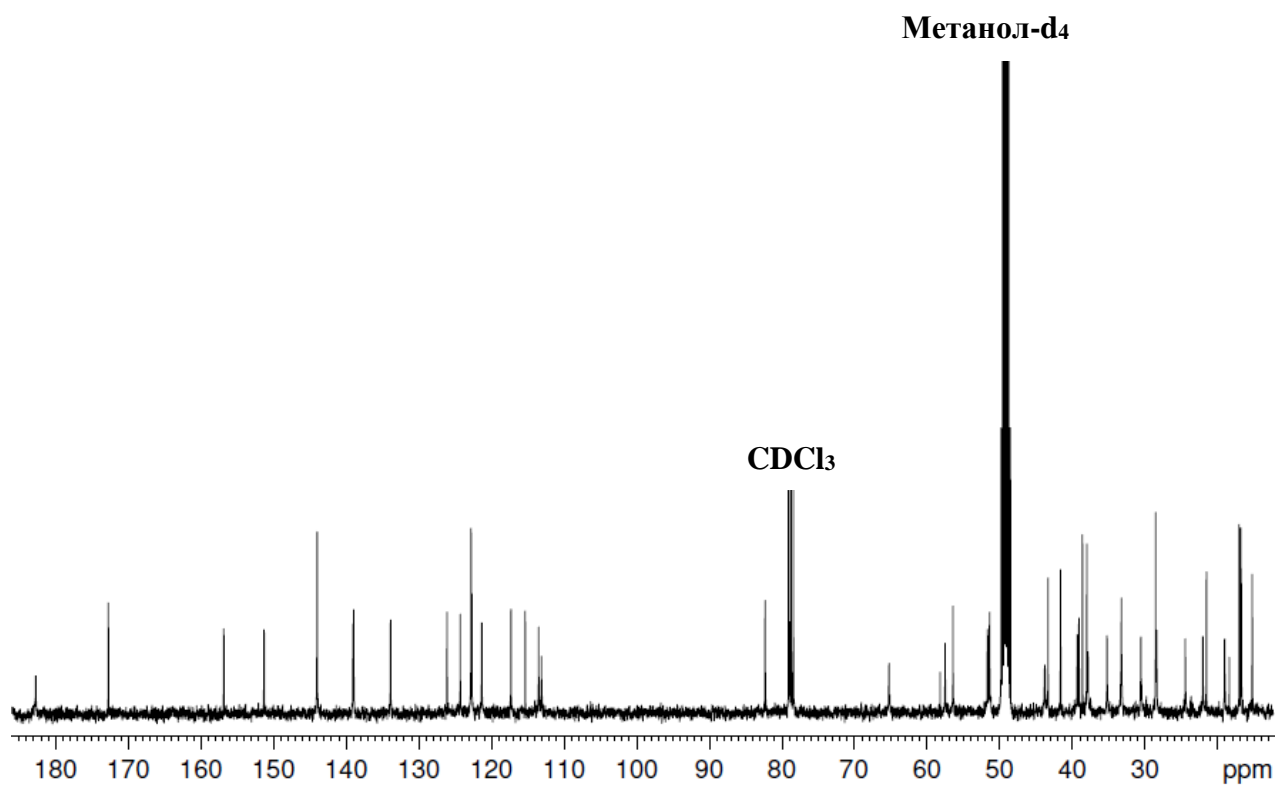
176. Conjugation of Triterpenic Acids of Ursane and Oleanane Types with Mitochondria-Targeting Cation F16 Synergistically Enhanced Their Cytotoxicity against Tumor Cells / M.V. Dubinin, D.A. Nedopekina, A.I. Ilzorkina [et al.]. – DOI 10.3390/membranes13060563. // *Membranes*. – 2023. – V. 13. – P. 563.
177. Synthetic approach for rapid preparation of BODIPY conjugates and their use in imaging of cellular drug uptake and distribution / S. Krajcovicova, J. Stankova, P. Dzubak [et al.]. – DOI 10.1002/chem.201706093. // *Chem. Eur. J.* – 2018. – V. 24. – P. 4957-4966.
178. Design, synthesis and cytotoxicity of BODIPY FL labelled triterpenoids / B. Brandes, S. Hoenke, L. Fischer, R. Csuk. – DOI 10.1016/j.ejmech.2019.111858. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2020. – V. 185. – P. 111858.
179. Betulinic Acid Decorated with Polar Groups and Blue Emitting BODIPY Dye: Synthesis, Cytotoxicity, Cell-Cycle Analysis and Anti-HIV Profiling / D. Kodr, J. Stanková, M. Rumlová [et al.]. – DOI 10.3390/biomedicines9091104. // *Biomedicines*. – 2021. – V. 9. – P. 1104.
180. Design, Synthesis, and Photophysical Properties of BODIPY-Labeled Lupane Triterpenoids / R.R. Gubaidullin, D.A. Nedopekina, A.A. Tukhbatullin [et al.]. – DOI 10.3390/ecsoc-24-08102. // *Chem. Proc.* – 2021. – V. 3. – P. 11.
181. 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 [et al.]. – DOI 10.1007/s10600-022-03869-6. // *Chem. Nat. Compd.* – 2022. – V. 58, № 6. – P. 1062-1068.
182. Loudet, A. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties / A. Loudet, K. Burgess. – DOI 10.1021/cr078381n. // *Chem. Rev.* – 2007. – V. 107, № 11. – P. 4891-4932.
183. Synthesis and catalytic properties of trans-A₂B₂-type metalloporphyrins in cyclohexane oxidation / Y. Xie, F. Zhang, P. Liu [et al.]. – DOI 10.1139/cjc-2013-0400. // *Can. J. Chem.* – 2014. – V. 92. – P. 49-53.

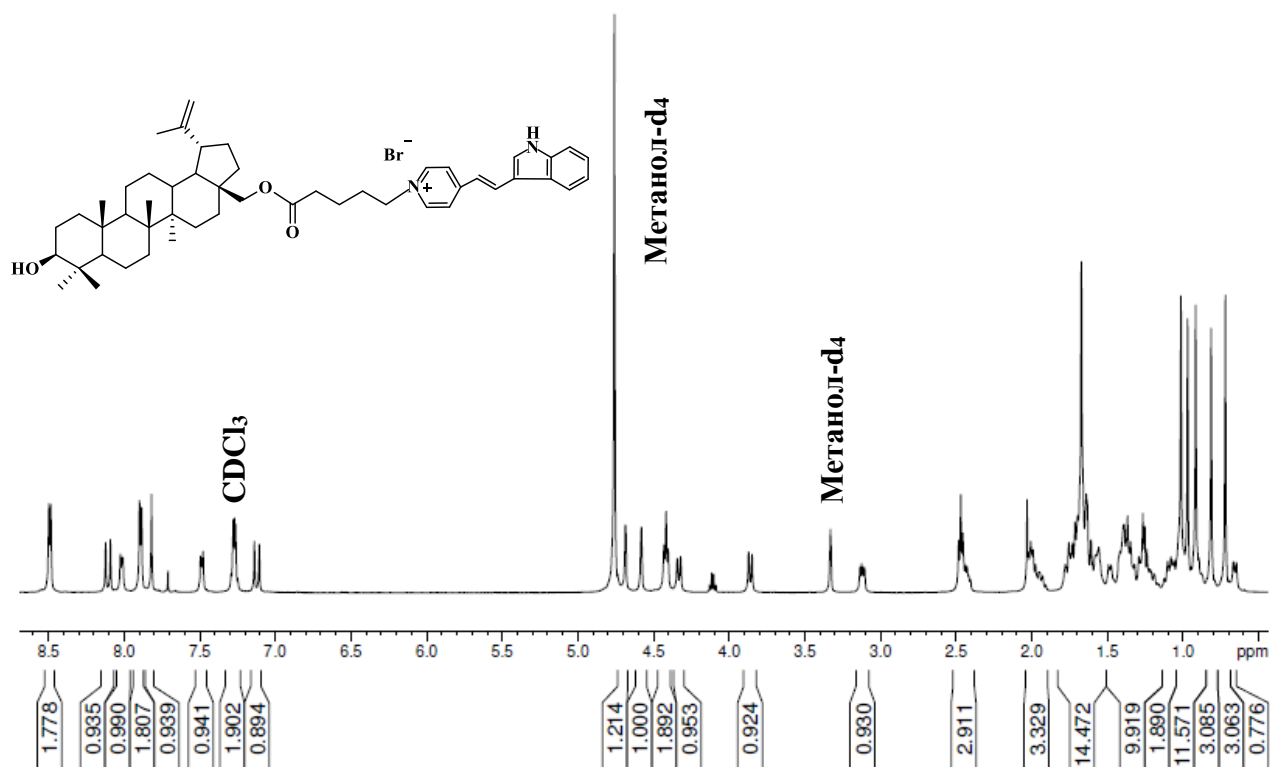
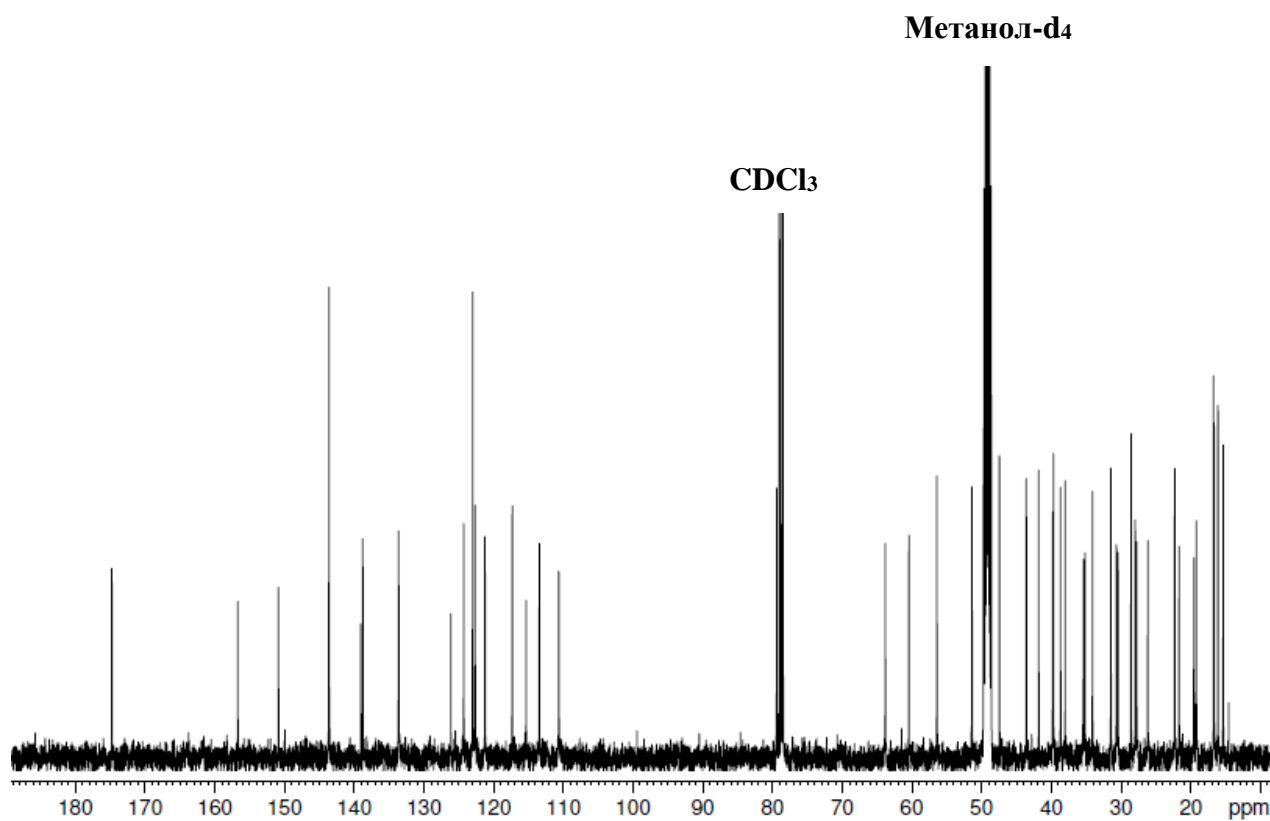
184. Corrole-BODIPY Dyads: Synthesis, Structure, and Electrochemical and Photophysical Properties / B. Basumatary, A. Raja Sekhar, R.V. Ramana Reddy, J. Sankar. – DOI 10.1021/ic502919s. // *Inorg. Chem.* – 2015. – V. 54. – P. 4257-4267.
185. Synthesis and functionalization of new polyhalogenated BODIPY dyes. Study of their photophysical properties and singlet oxygen generation / M.J. Ortiz, A.R. Agarrabeitia, G. Durán-Sampedro [et al.]. – DOI 10.1016/j.tet.2011.11.070. // *Tetrahedron.* – 2012. – V. 68. – P. 1153-1162.
186. Boron dipyrromethene analogs with phenyl, styryl, and ethynylphenyl substituents: synthesis, photophysics, electrochemistry, and quantum-chemical calculations / W. Qin, T. Rohand, W. Dehaen [et al.]. – DOI 10.1021/jp073547+. // *J. Phys. Chem.* – 2007. – V. 111, № 35. – P. 8588-8597.
187. 2- and 3-Monohalogenated BODIPY Dyes and Their Functionalized Analogues: Synthesis and Spectroscopy / V. Leen, T. Leemans, N. Boens, W. Dehaen. – DOI 10.1002/ejoc.201100324. // *Eur. J. Org. Chem.* – 2011. – V. 2011. – P. 4386-4396.
188. Synthesis, structure, photophysical, electrochemical properties and antibacterial activity of brominated BODIPYs / D. Prasannan, D. Raghav, S. Subramaniam [et al.]. – DOI 10.1039/C6RA12258B. // *RSC Adv.* – 2016. – V. 6. – P. 80808-80824.
189. A Concise Semi-Synthetic Approach to Betulinic Acid from Betulin / D.S.H.L. Kim, Z. Chen, V.T. Nguyen [et al.]. – DOI 10.1080/00397919708006099. // *Synth. Commun.* – 1997. – V. 27, № 9. – P. 1607-1612.
190. Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes / C. Genet, A. Strehle, C. Schmidt [et al.]. – DOI 10.1021/jm900872z. // *J. Med. Chem.* – 2010. – V.53, № 1. – P. 178-190.

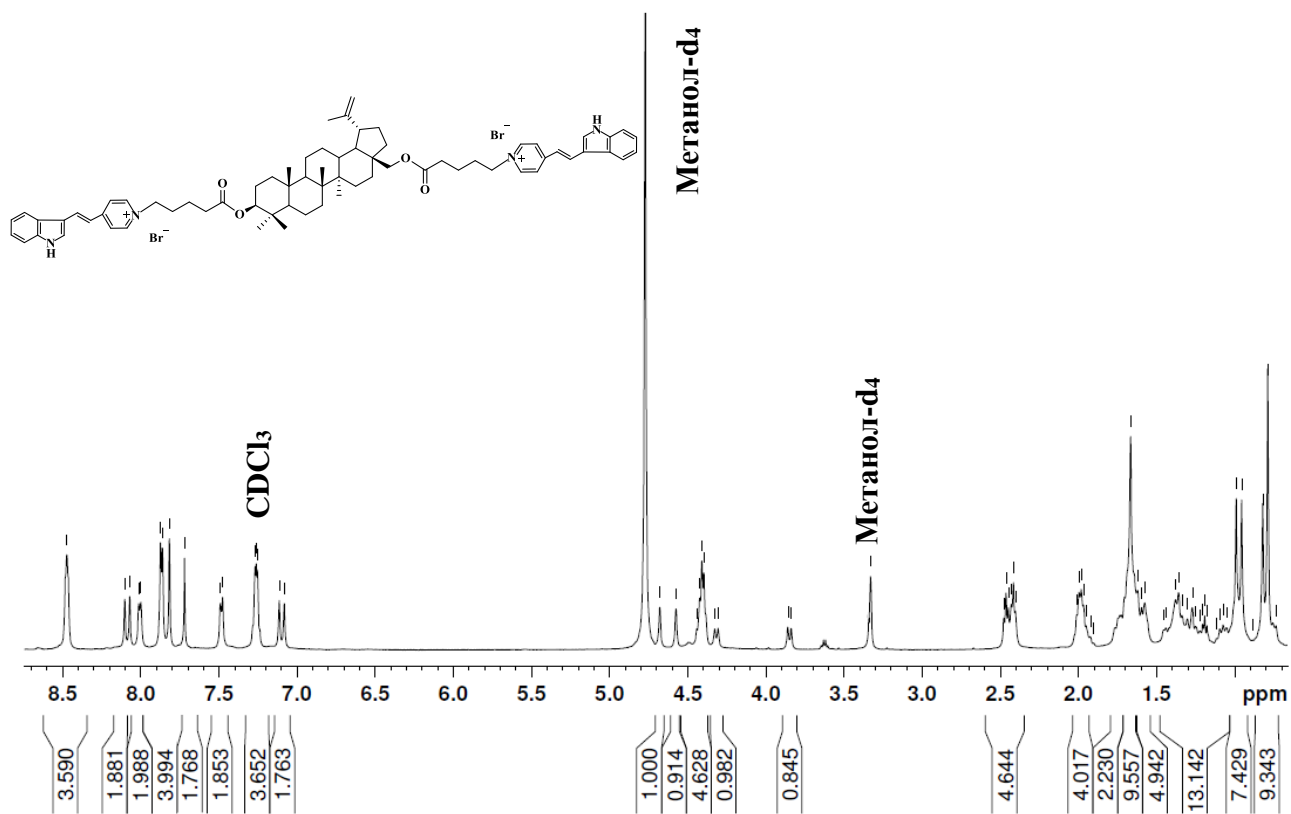
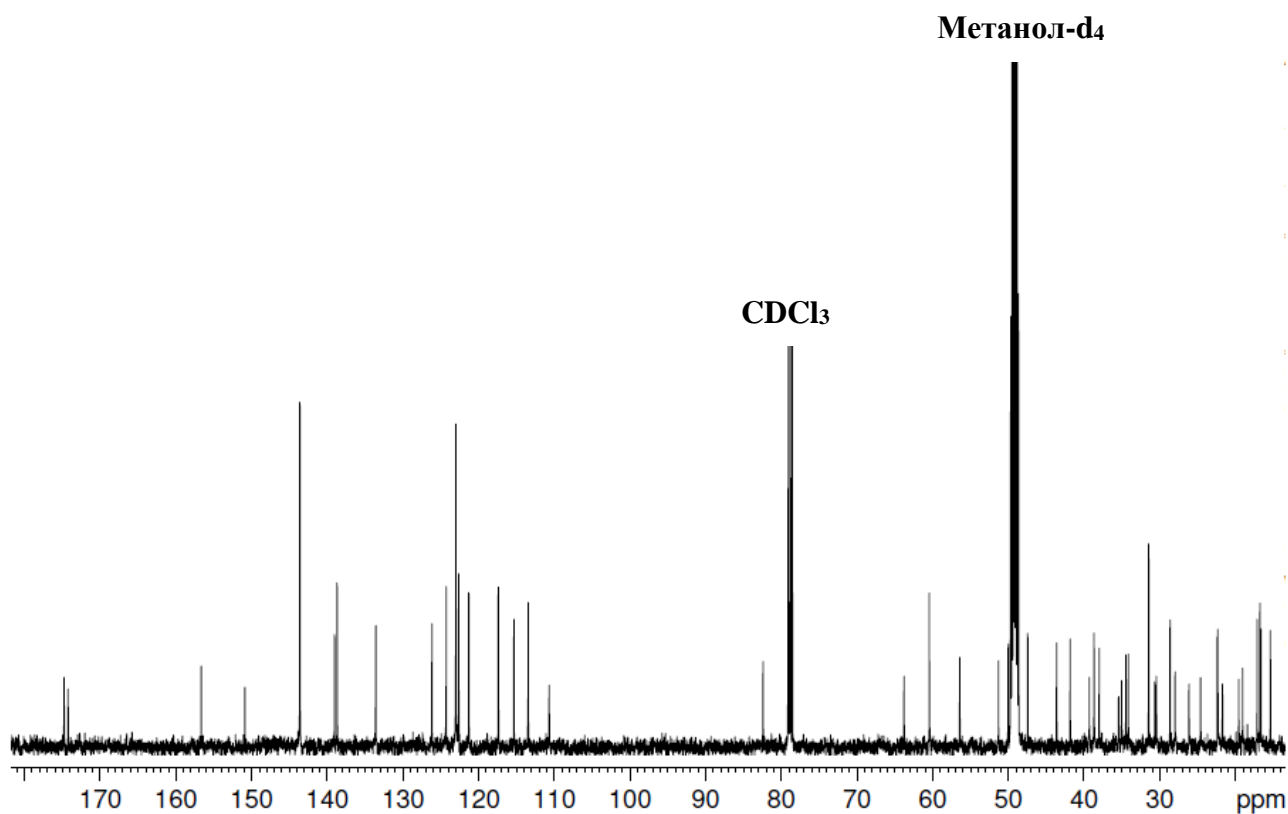
Приложение А

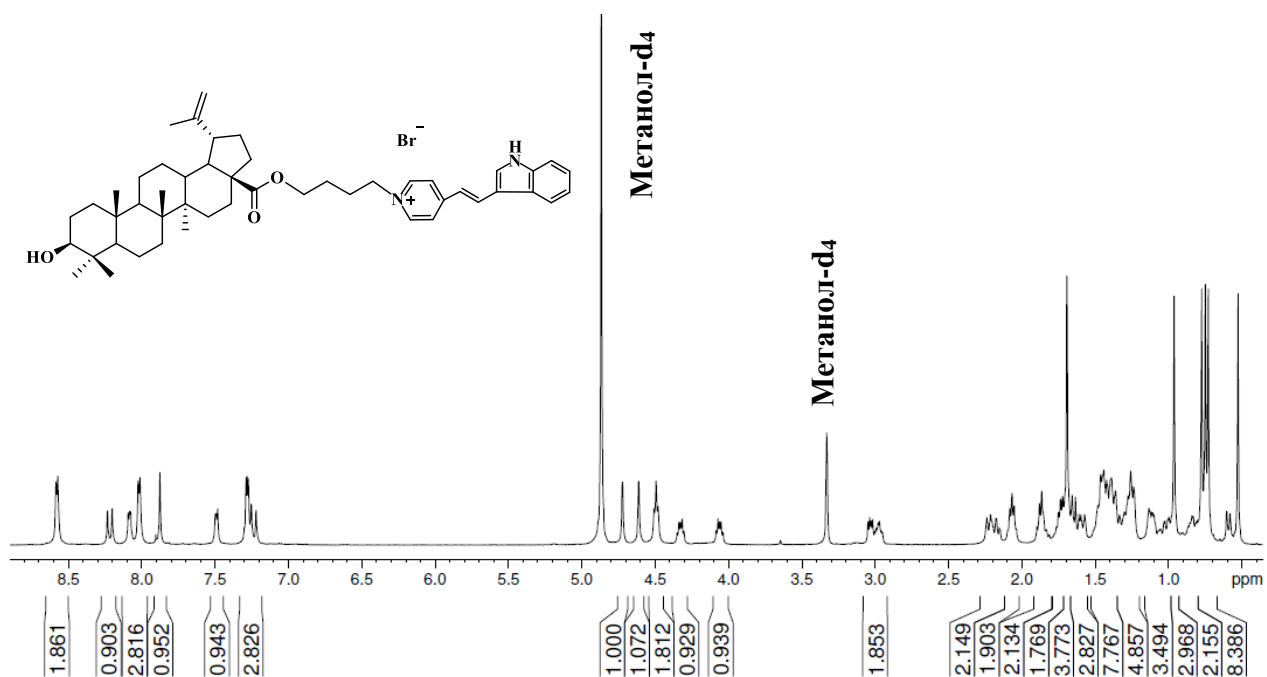
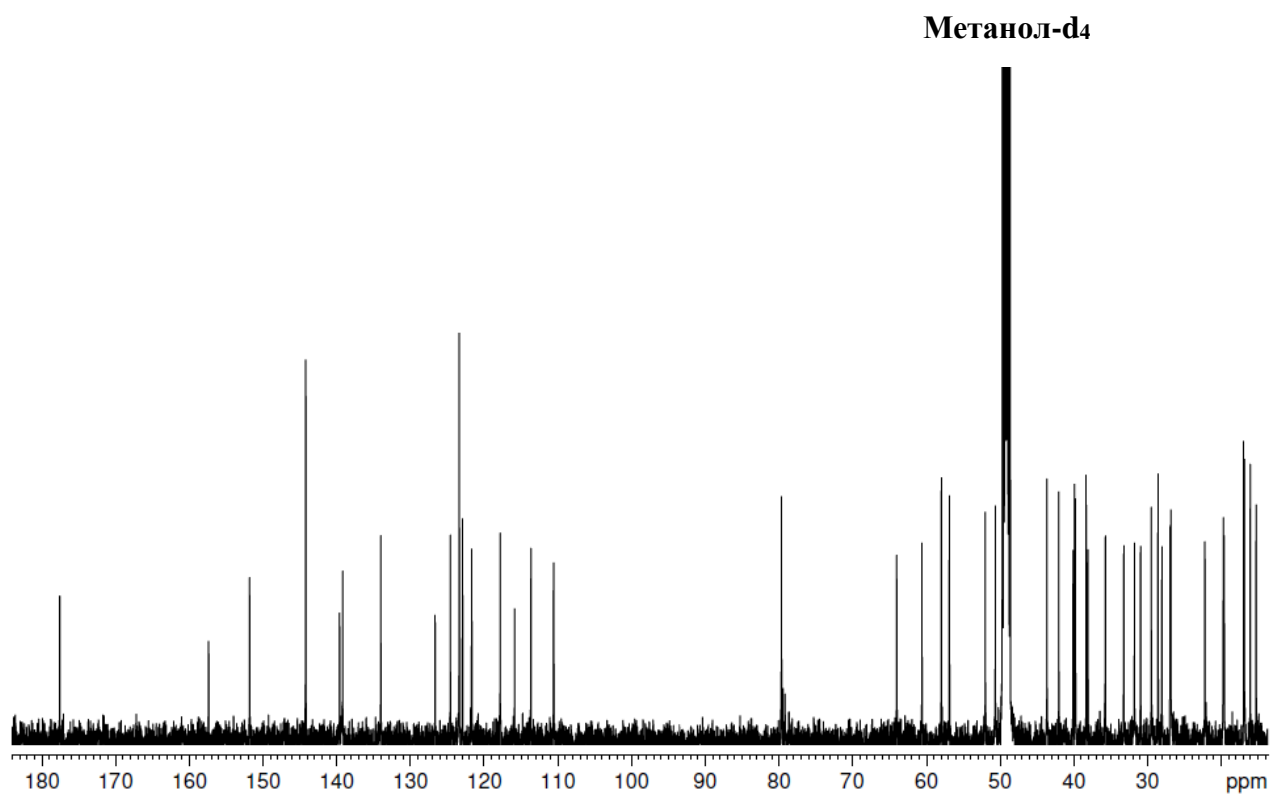
Спектры ЯМР соединений **5**, **8**, **10**, **12**, **16**, **18**, **21**, **33**, **38**, **50**, **54**, **63**, **67** (MeOD/CDCl₃); **15**, **25**, **29**, **38**, **39**, **51**, **54a** (MeOD); **39**, **53**, **53a**, **62**, **66**, **75**, **76**, **77**, **78** (CDCl₃); **24**, **28**, **32** (DMSO-d₆)

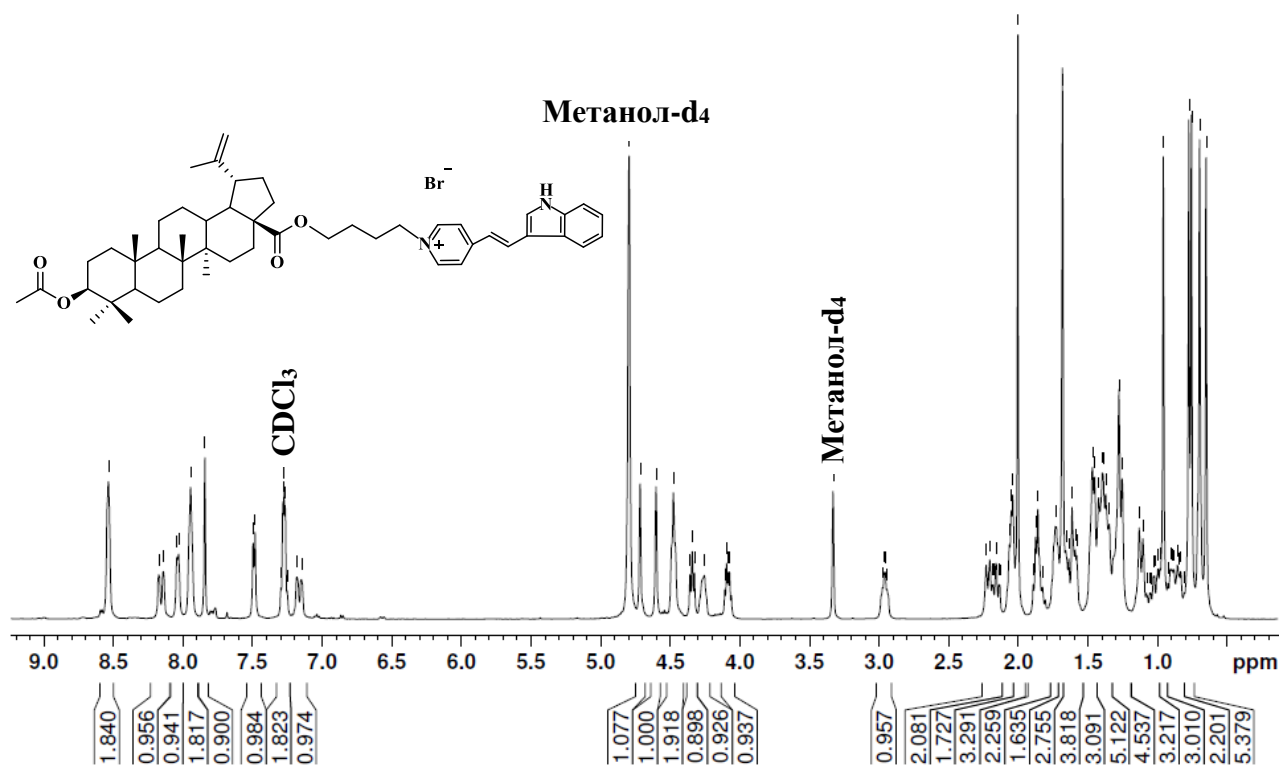
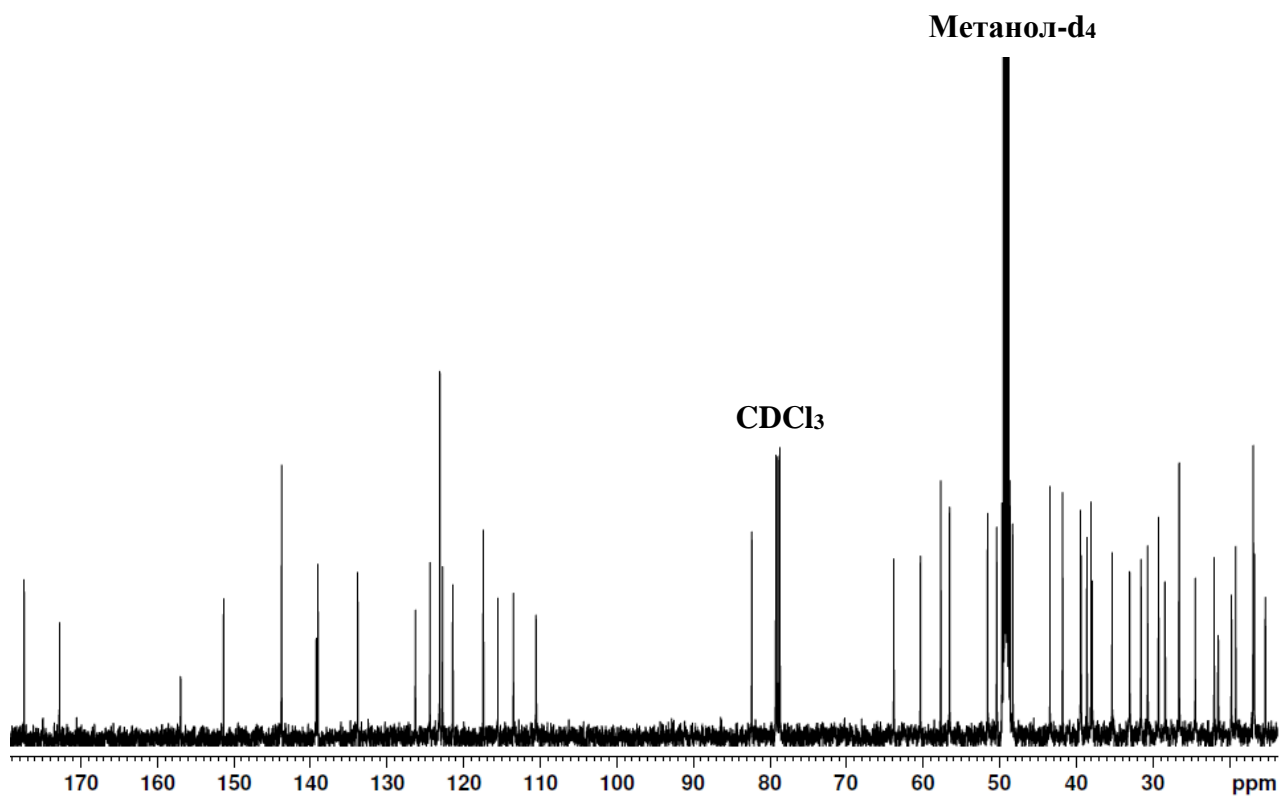
Рисунок А. 1 – Спектр ЯМР ¹H соединения **5**Рисунок А. 2 – Спектр ЯМР ¹³C соединения **5**

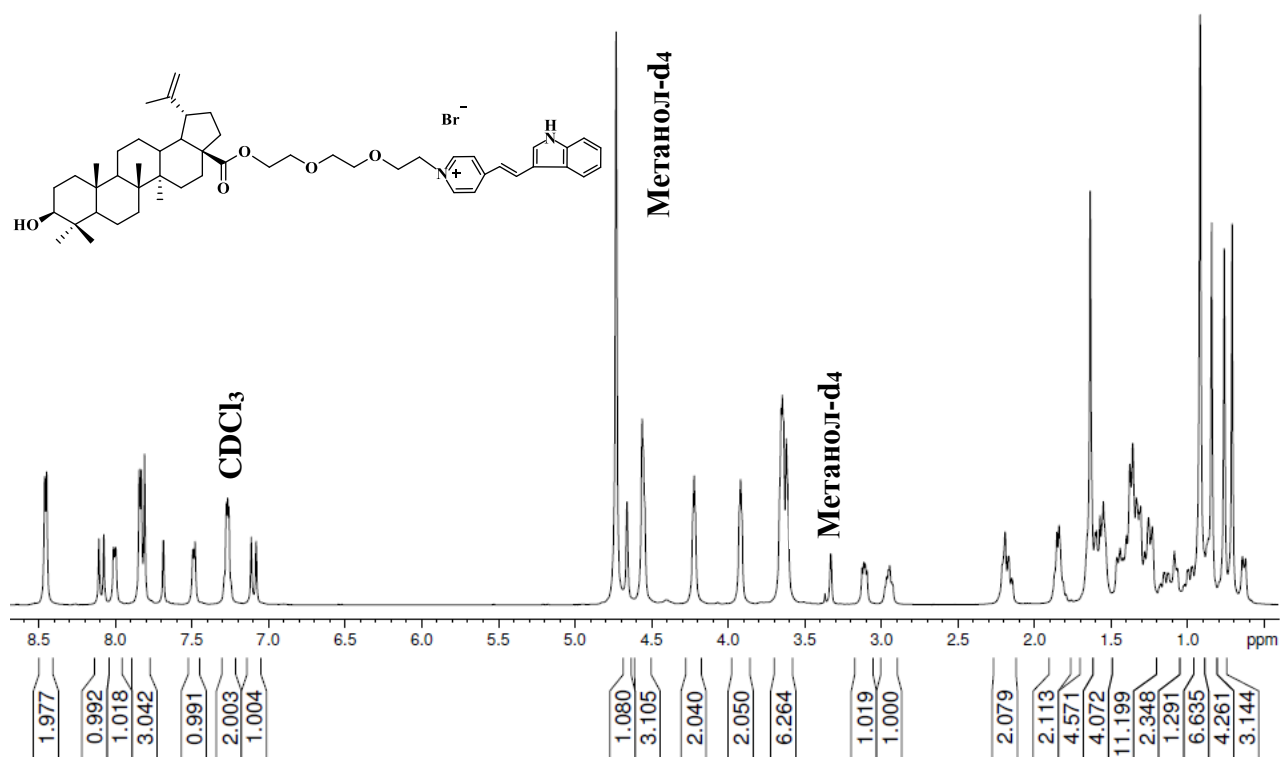
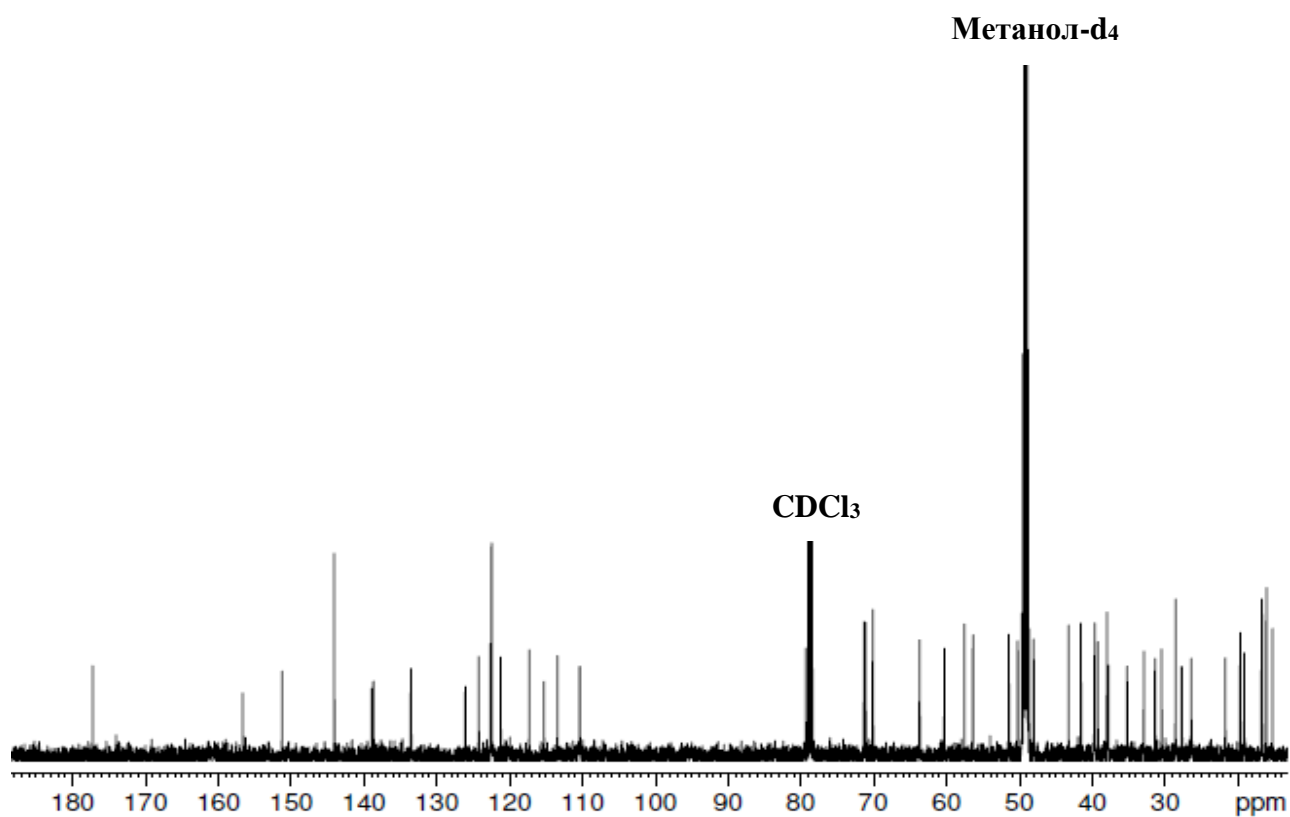
Рисунок А. 3 – Спектр ЯМР ¹H соединения 8Рисунок А. 4 – Спектр ЯМР ¹³C соединения 8

Рисунок А. 5 – Спектр ЯМР ^1H соединения **10**Рисунок А. 6 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **10**

Рисунок А. 7 – Спектр ЯМР ¹H соединения **12**Рисунок А. 8 – Спектр ЯМР ¹³C соединения **12**

Рисунок А. 9 – Спектр ЯМР ^1H соединения **15**Рисунок А. 10 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **15**

Рисунок А. 11 – Спектр ЯМР ¹H соединения 16Рисунок А. 12 – Спектр ЯМР ¹³C соединения 16

Рисунок А. 13 – Спектр ЯМР ¹H соединения 18Рисунок А. 14 – Спектр ЯМР ¹³C соединения 18

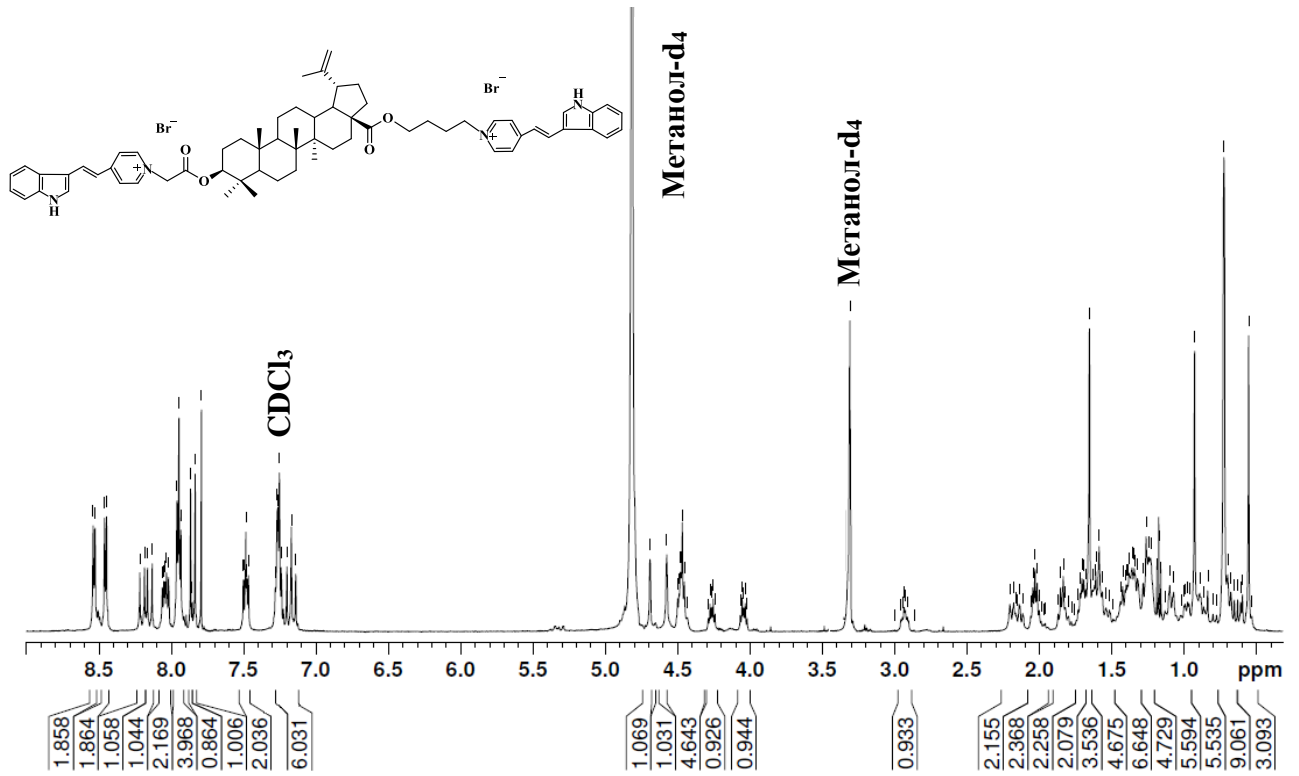
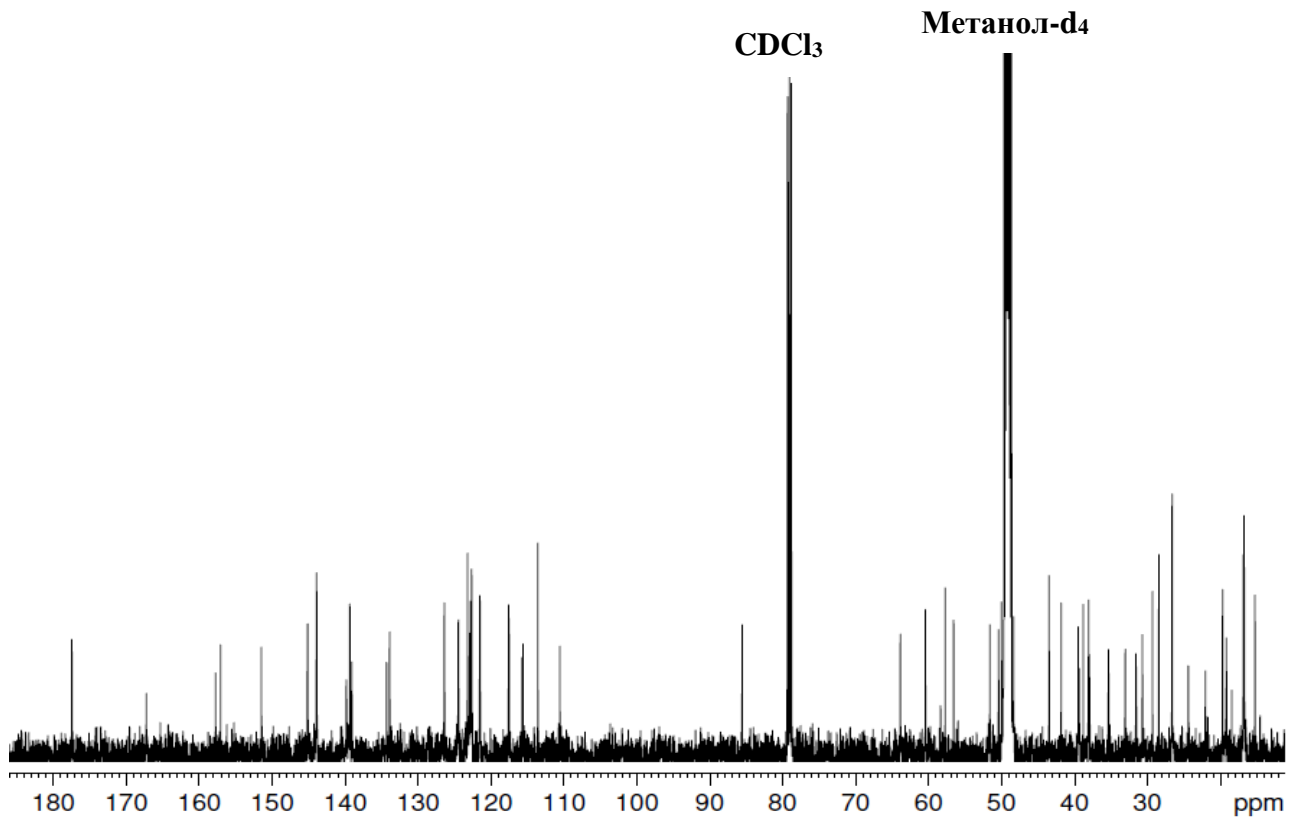
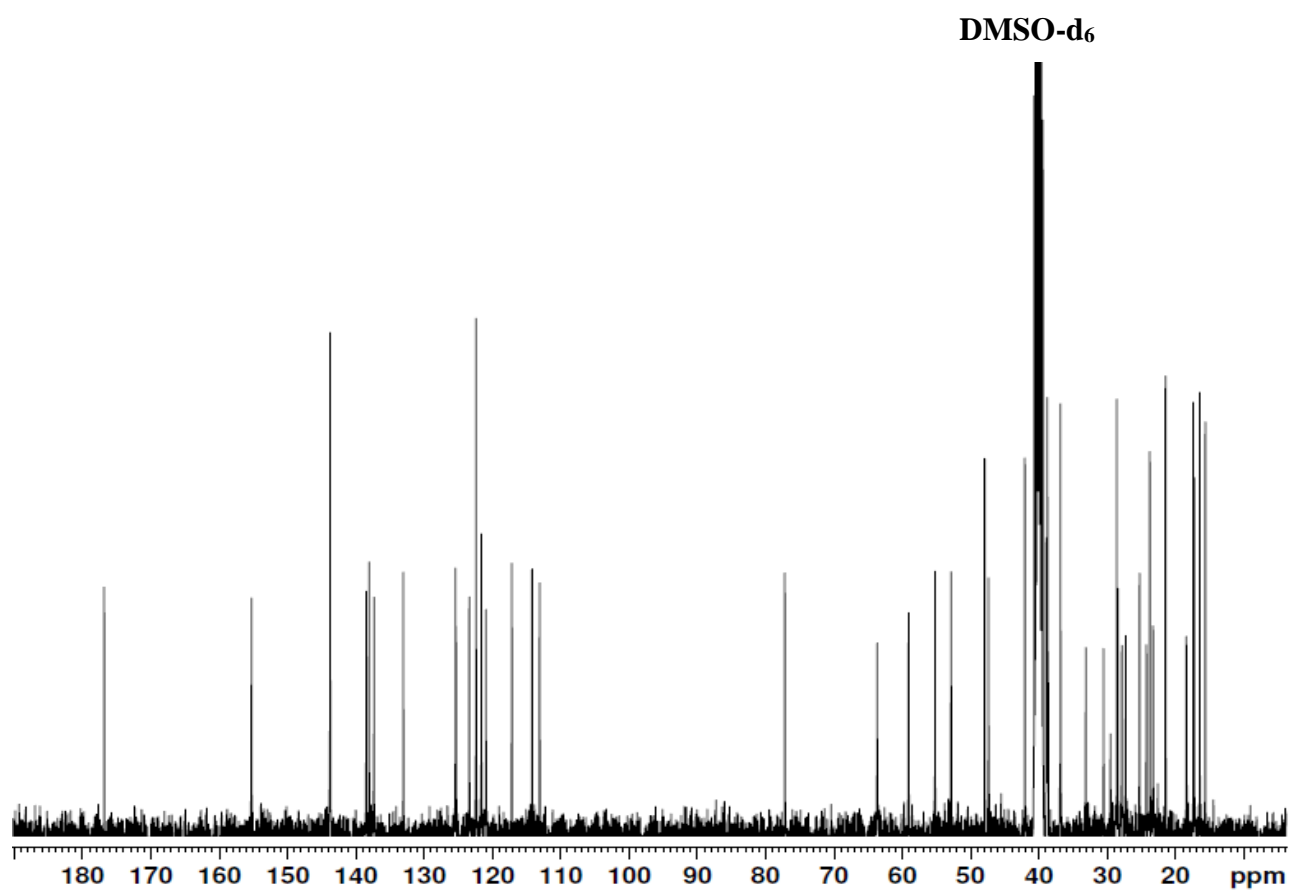
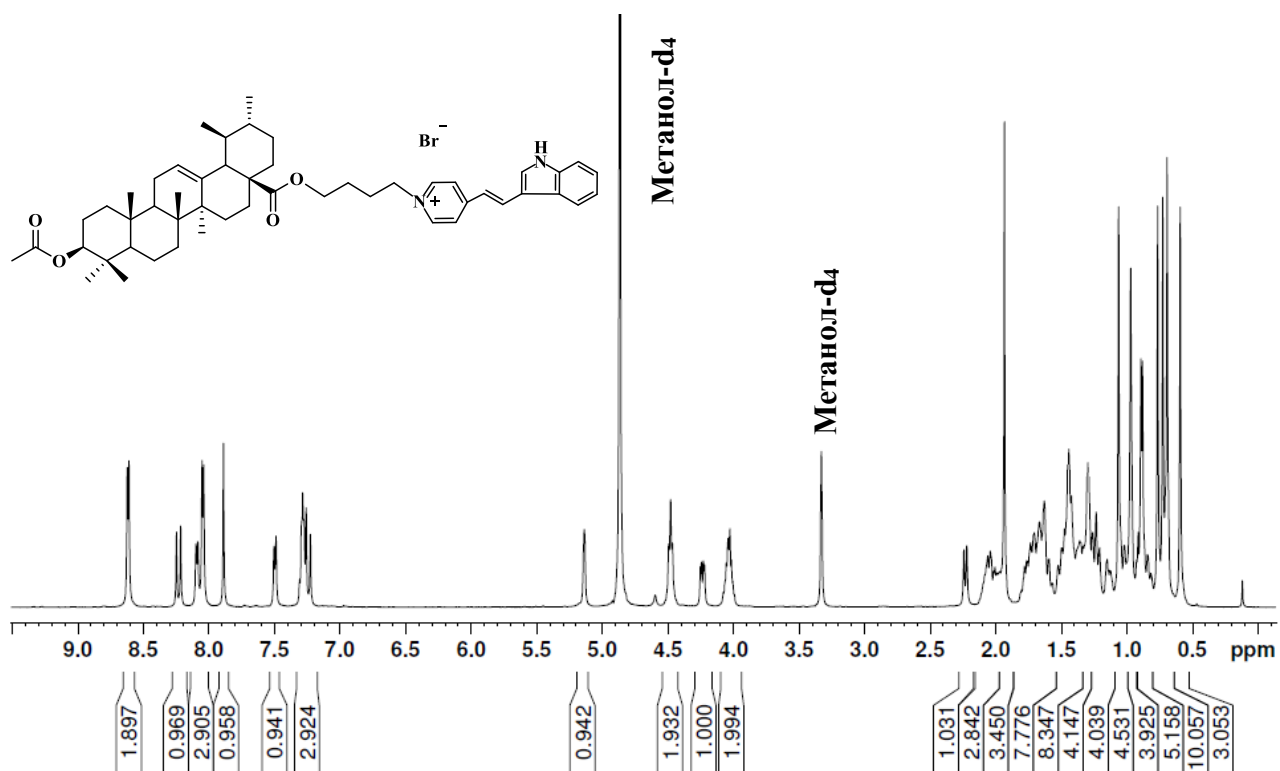
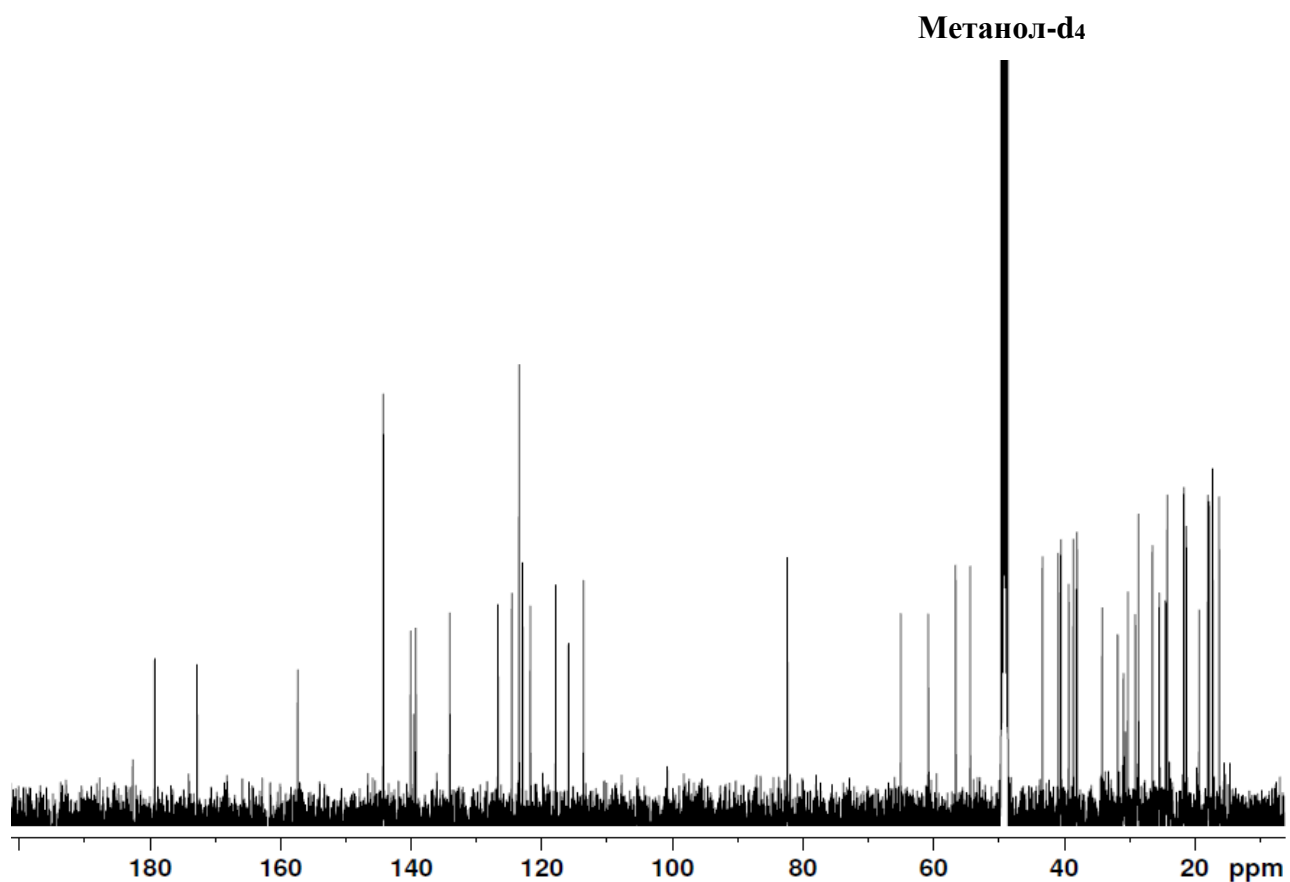
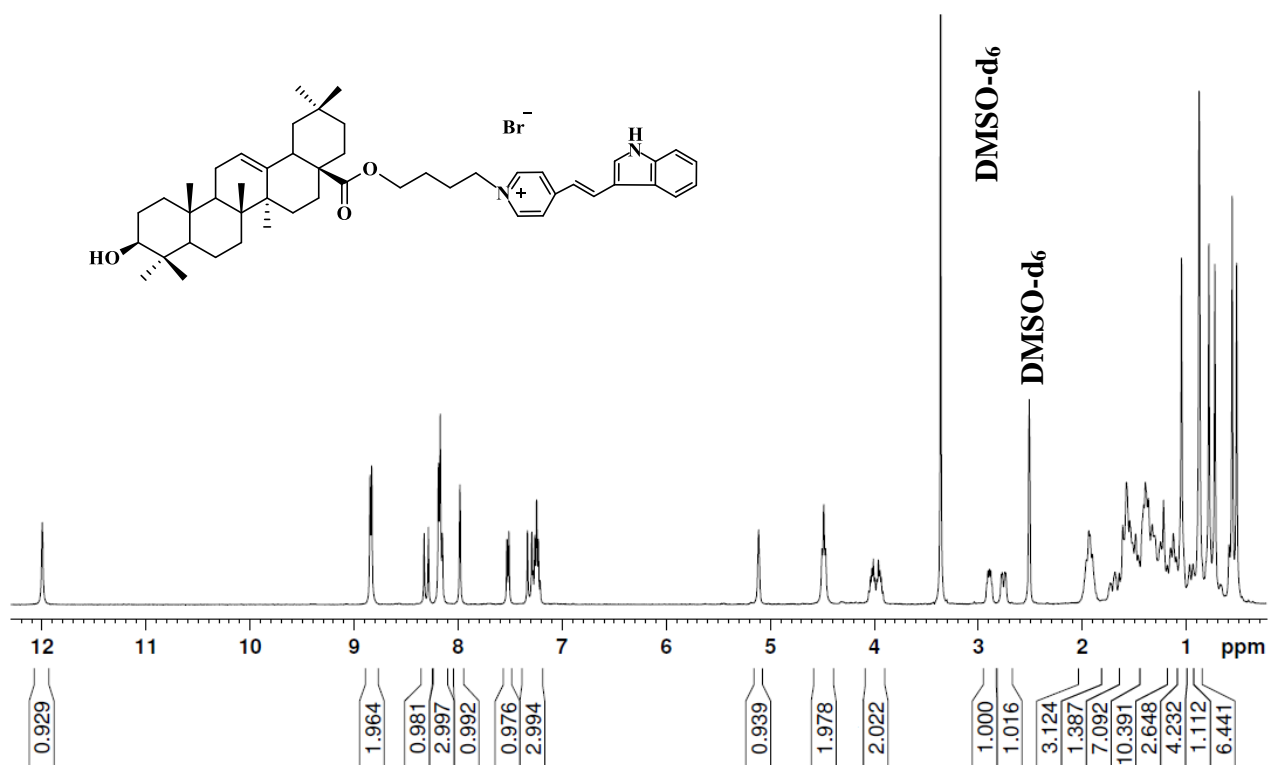
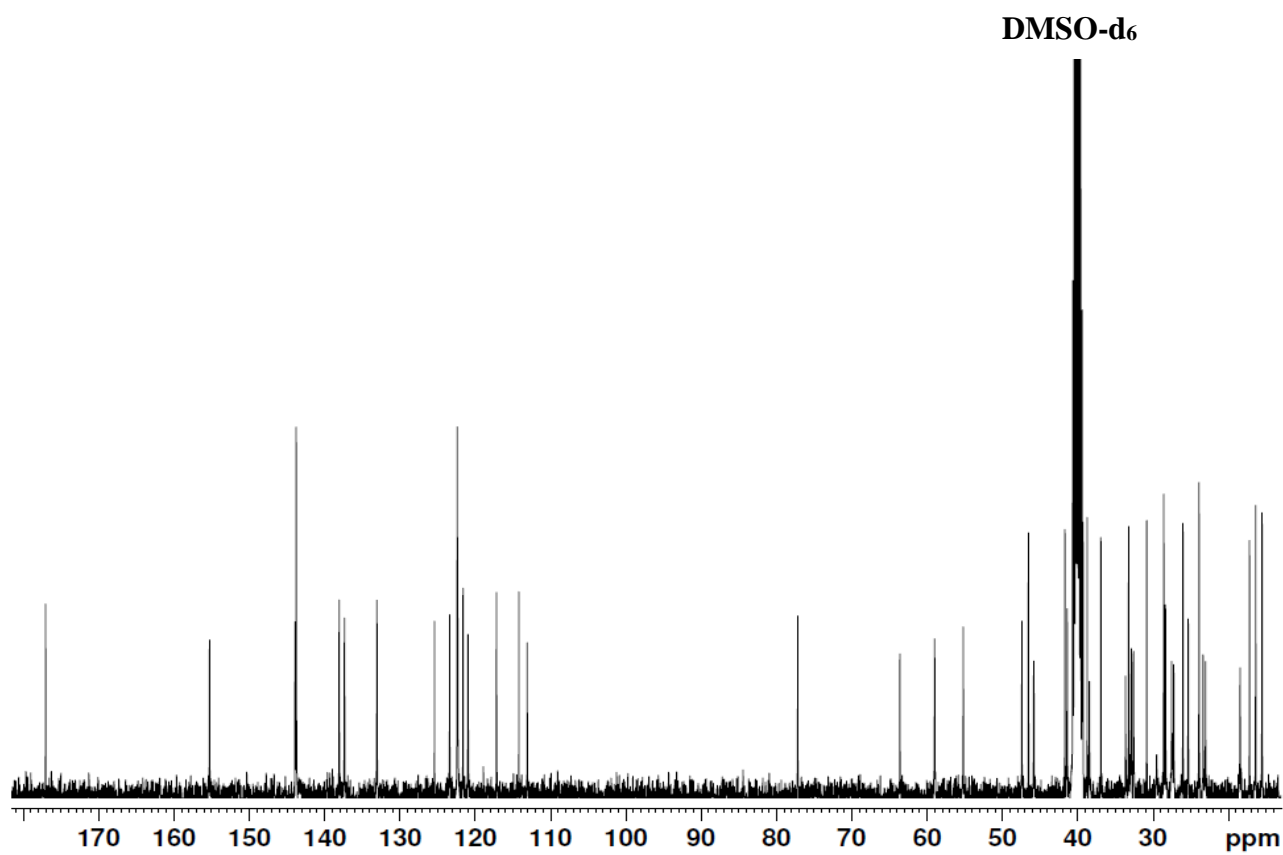
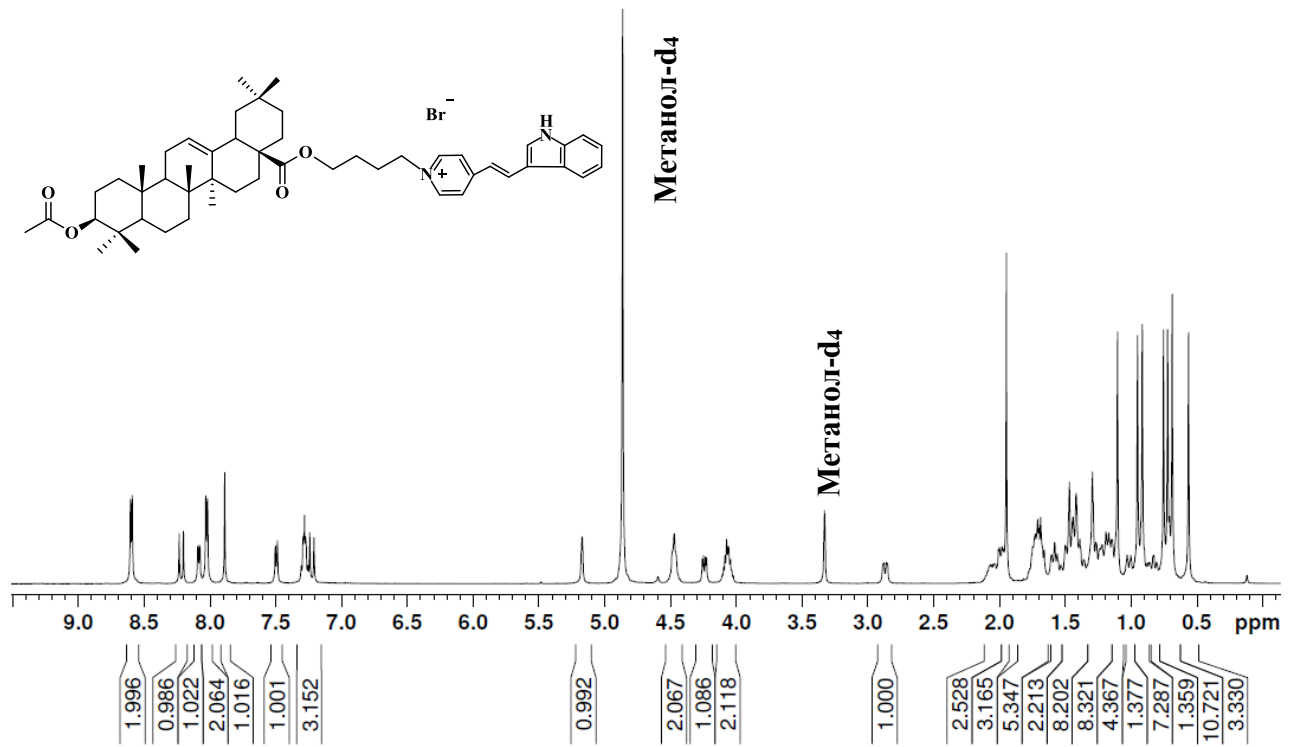
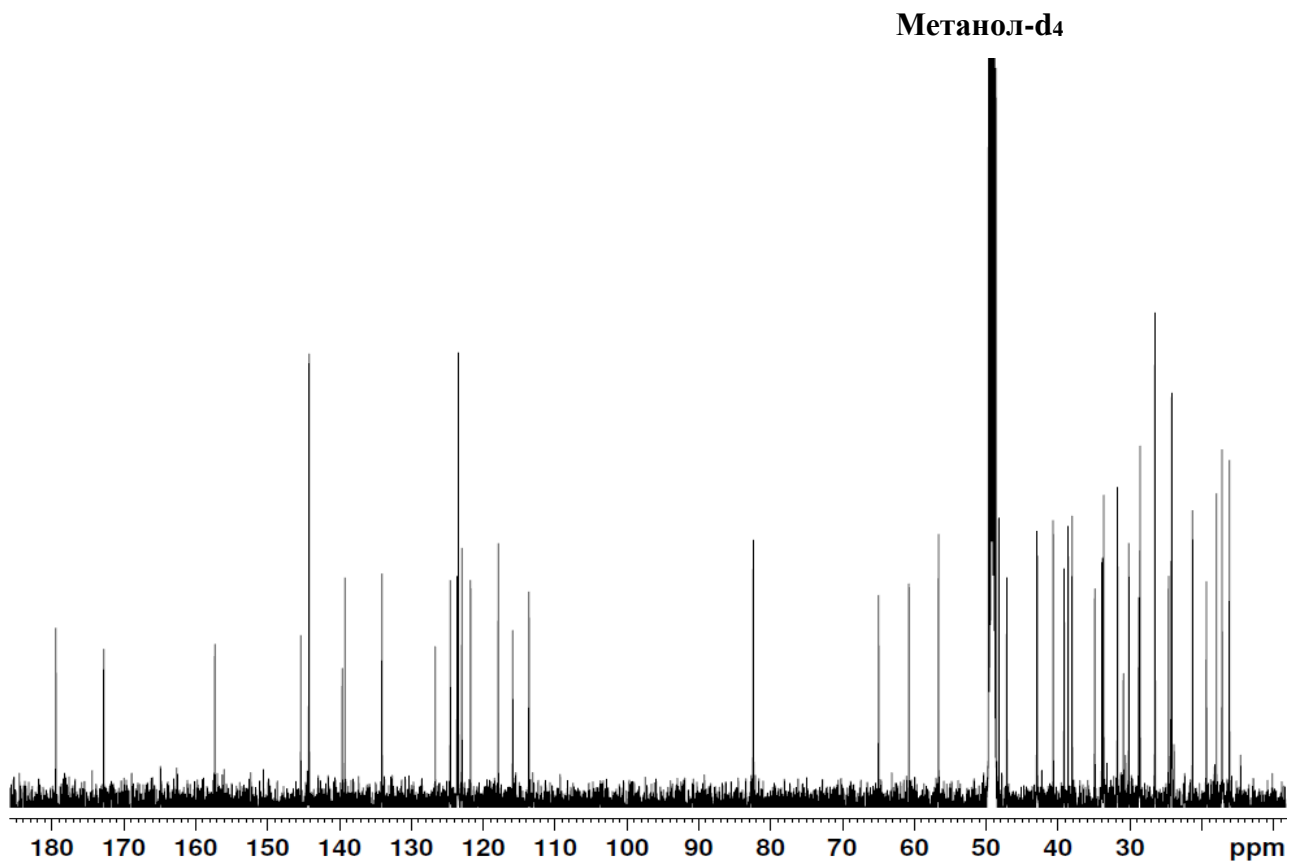
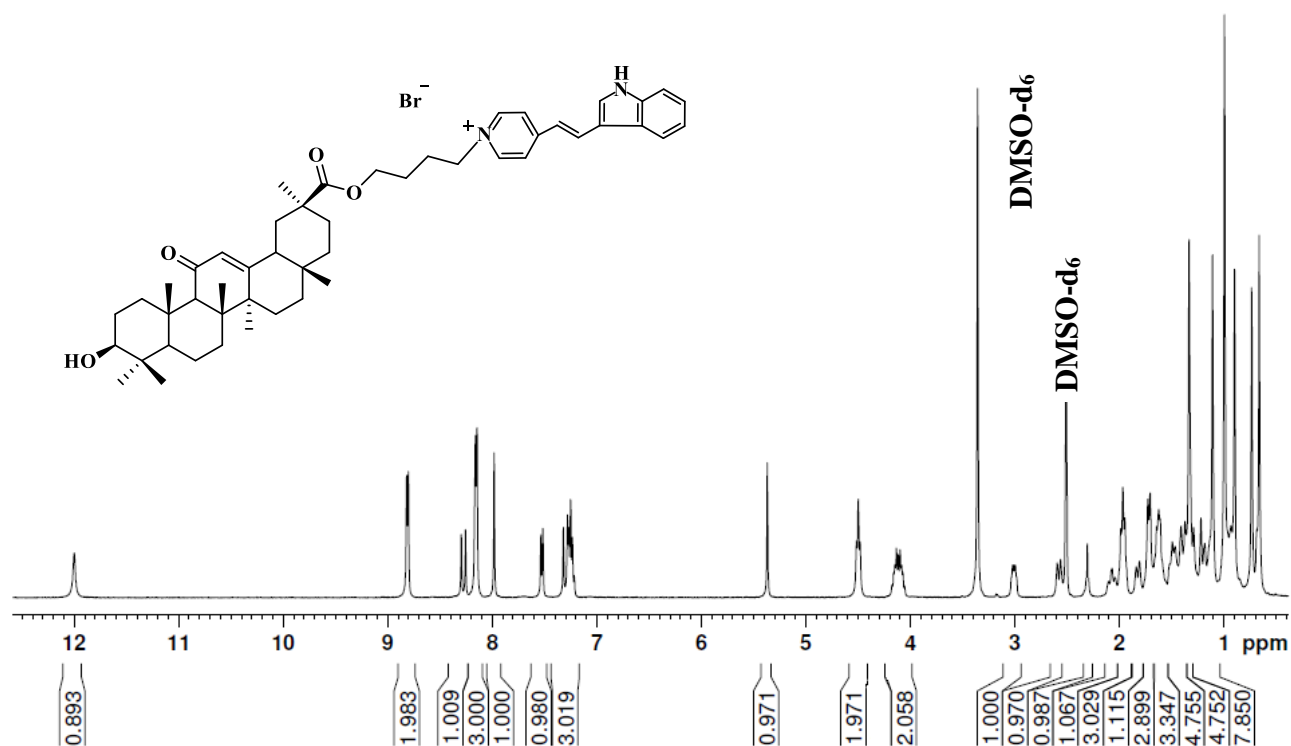
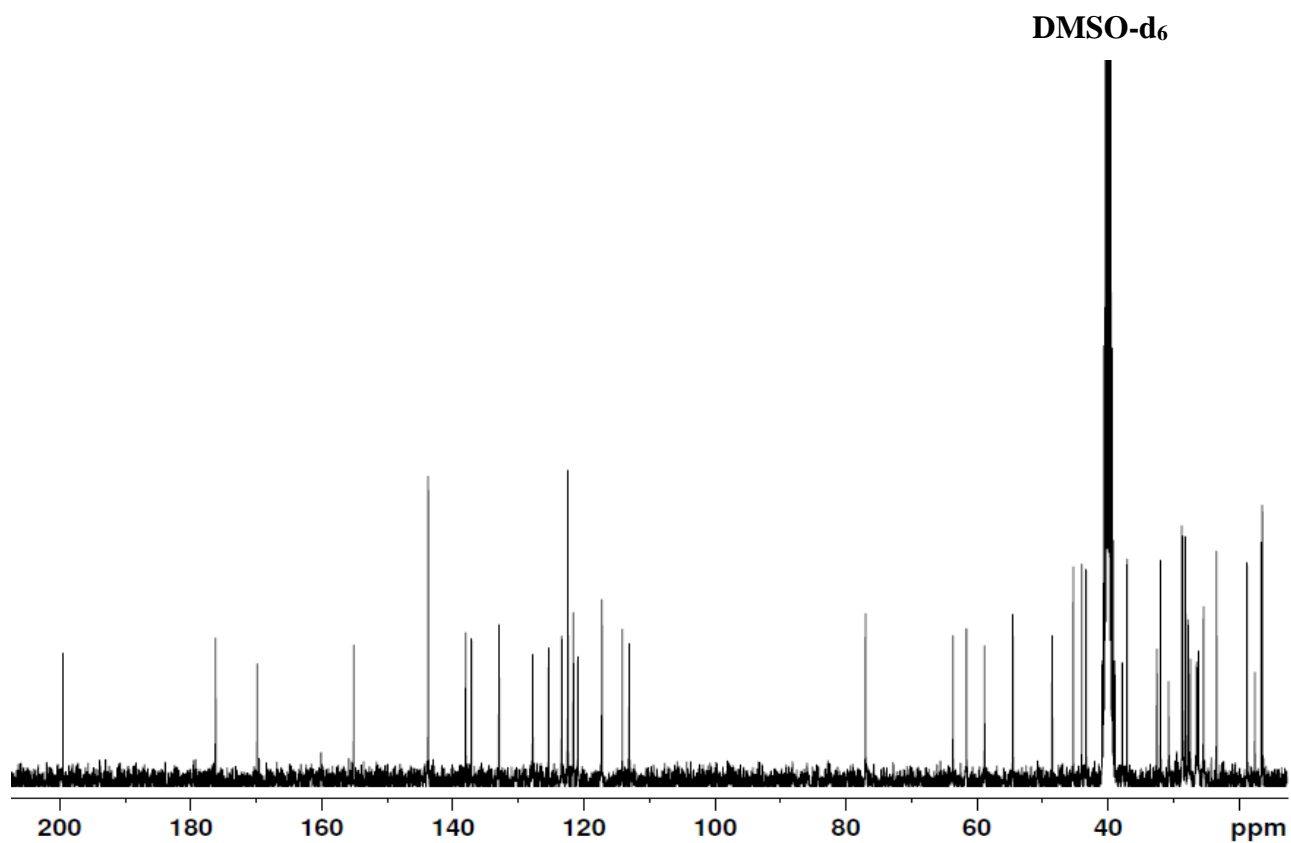
Рисунок А. 15 – Спектр ЯМР ¹H соединения **21**Рисунок А. 16 – Спектр ЯМР ¹³C соединения **21**

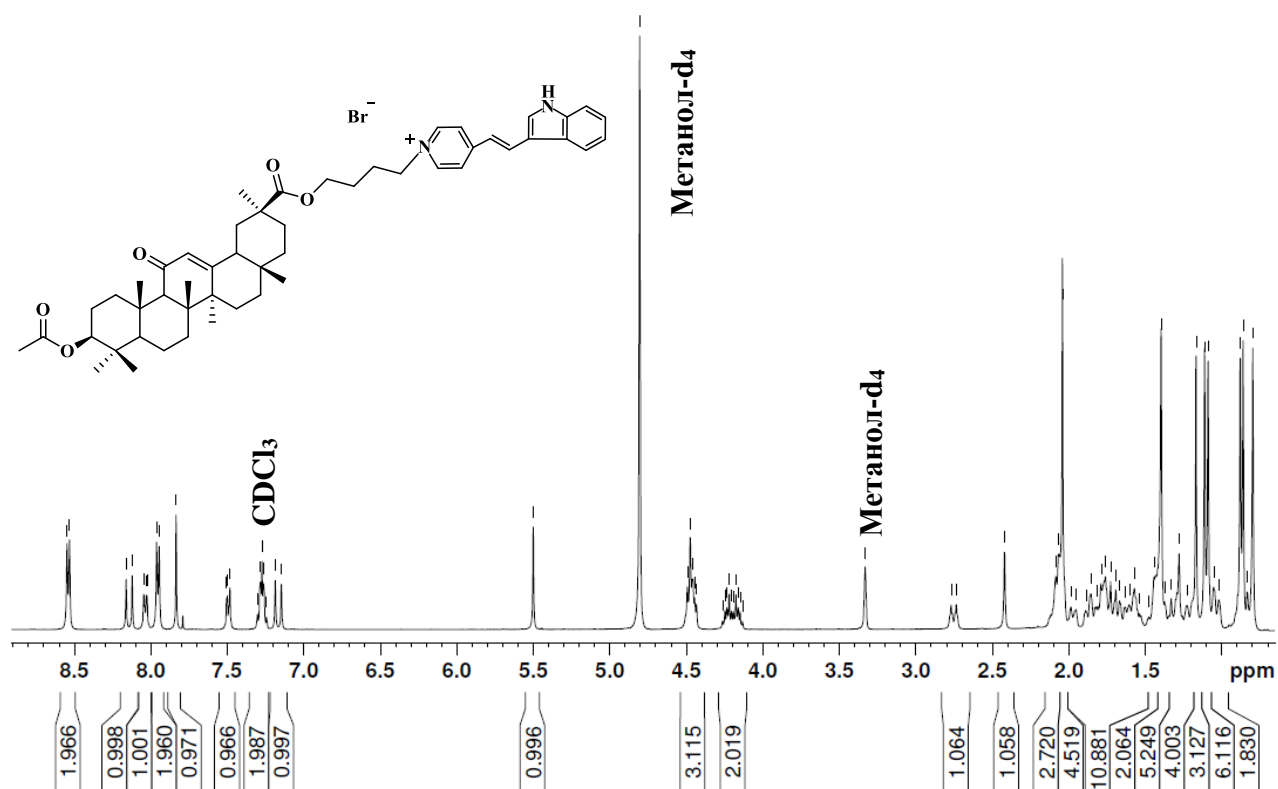
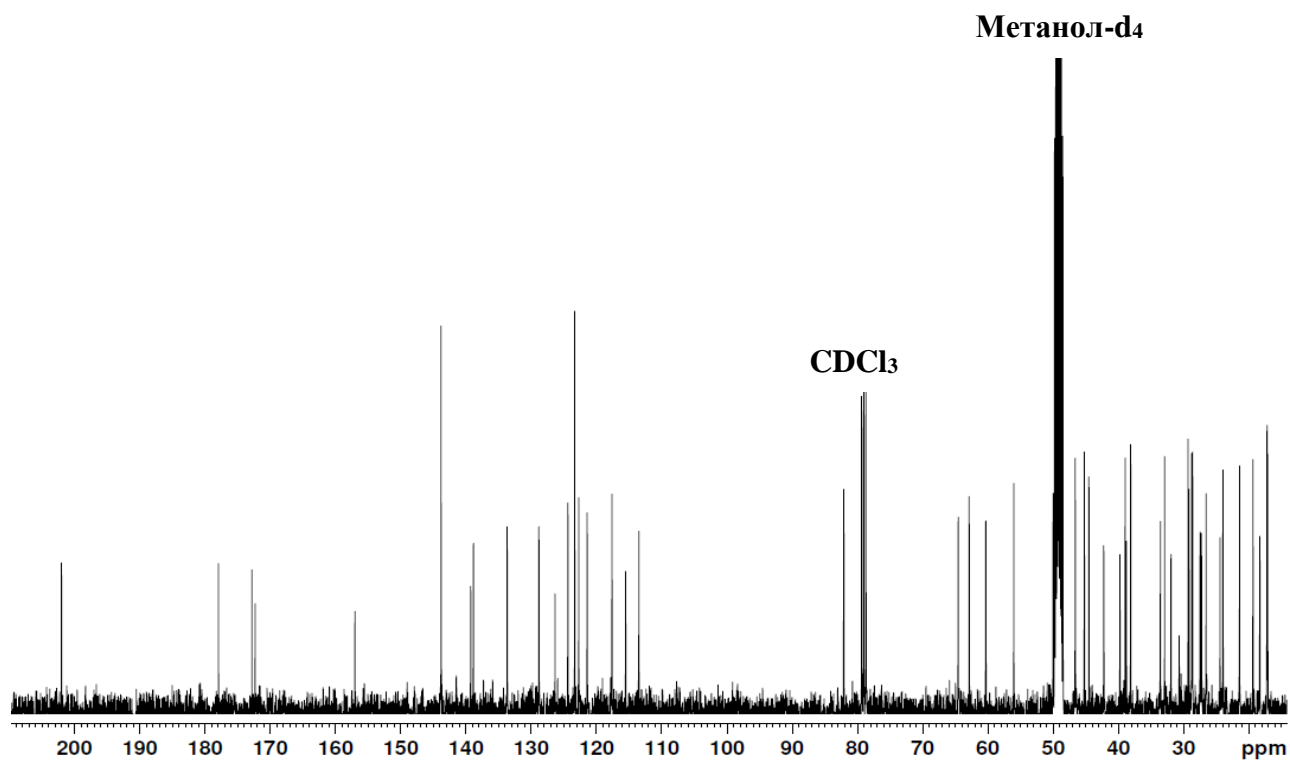
Рисунок А. 17 – Спектр ЯМР ^1H соединения 24Рисунок А. 18 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения 24

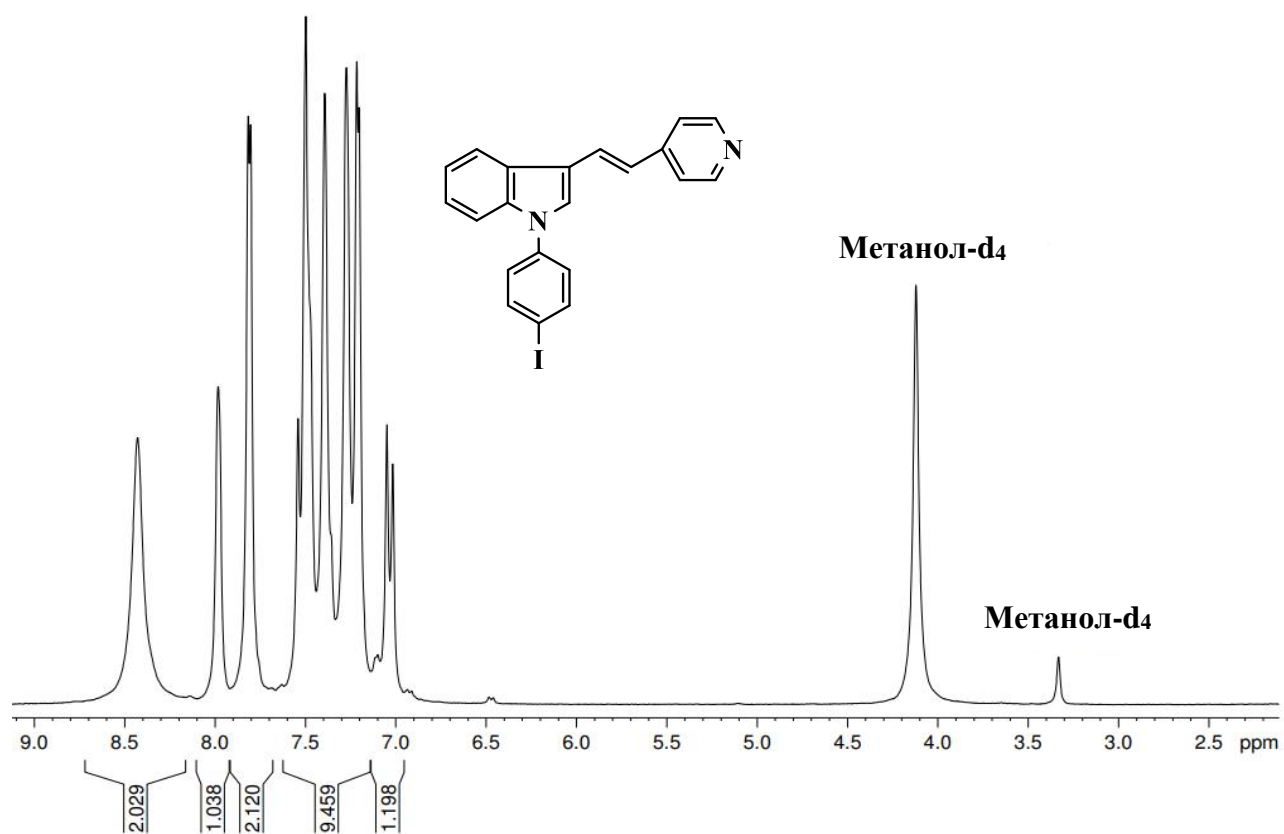
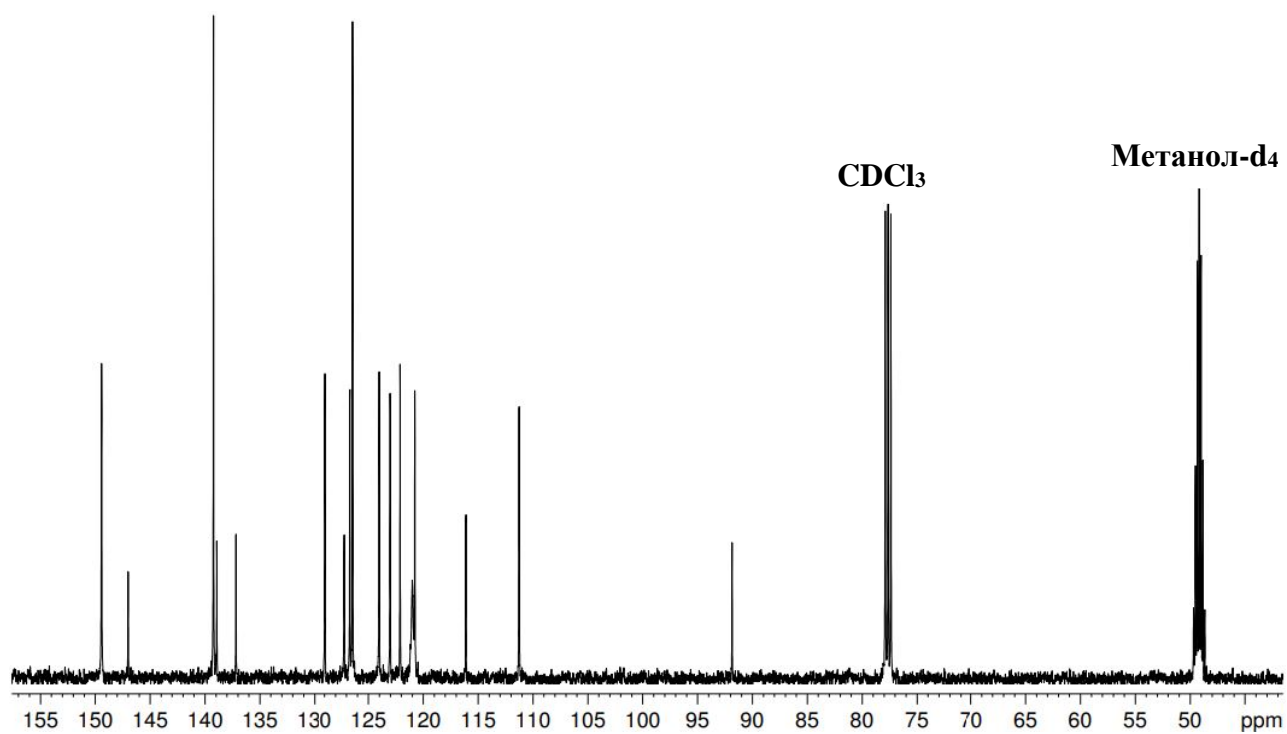
Рисунок А. 19 – Спектр ЯМР ^1H соединения **25**Рисунок А. 20 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **25**

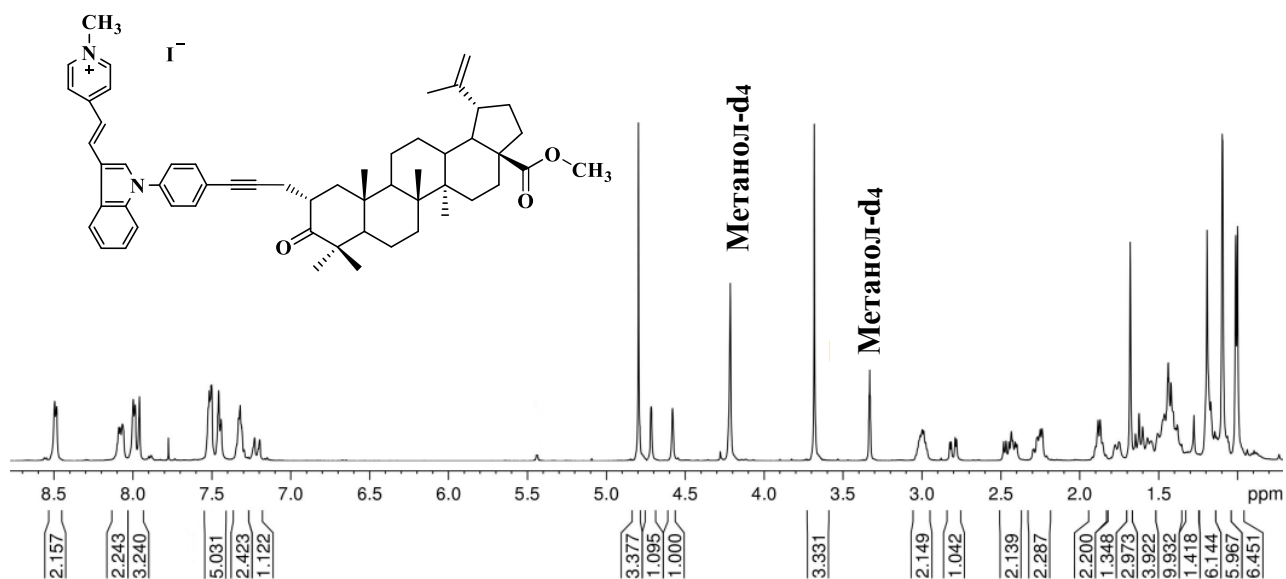
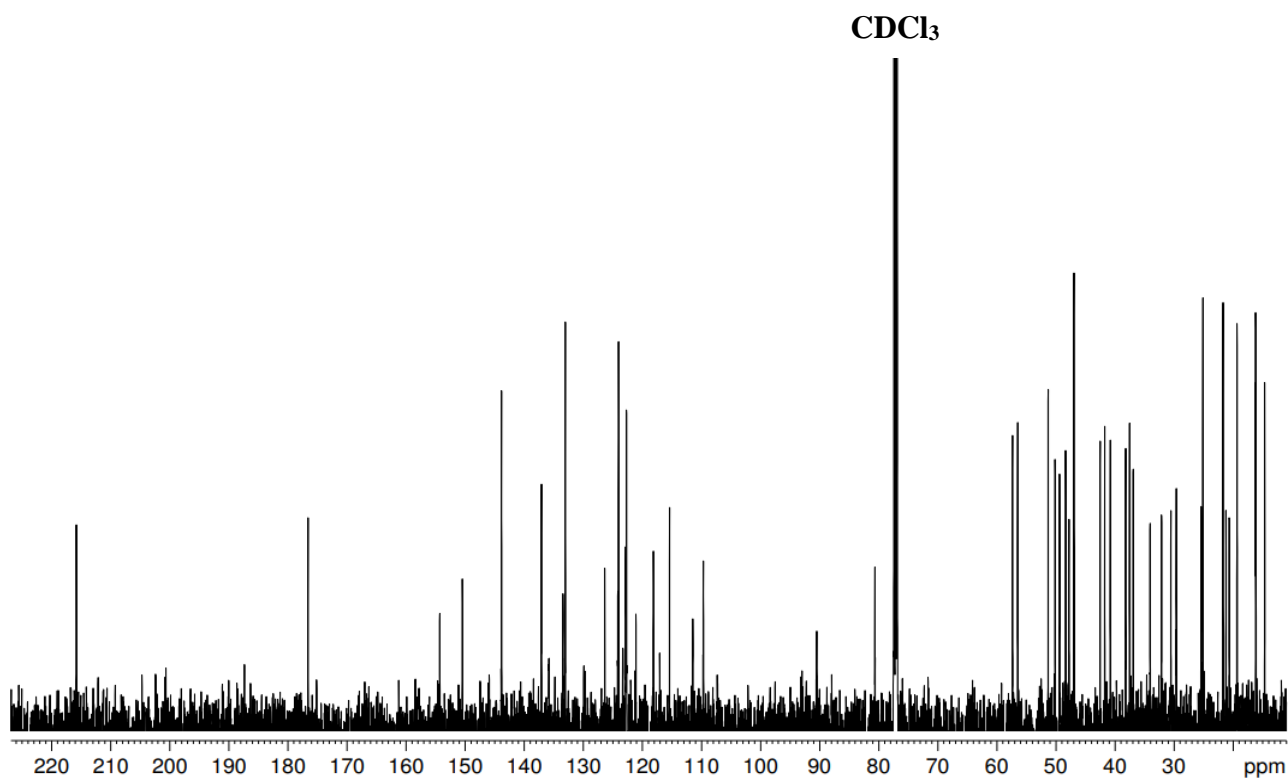
Рисунок А. 21 – Спектр ЯМР ^1H соединения 28Рисунок А. 22 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения 28

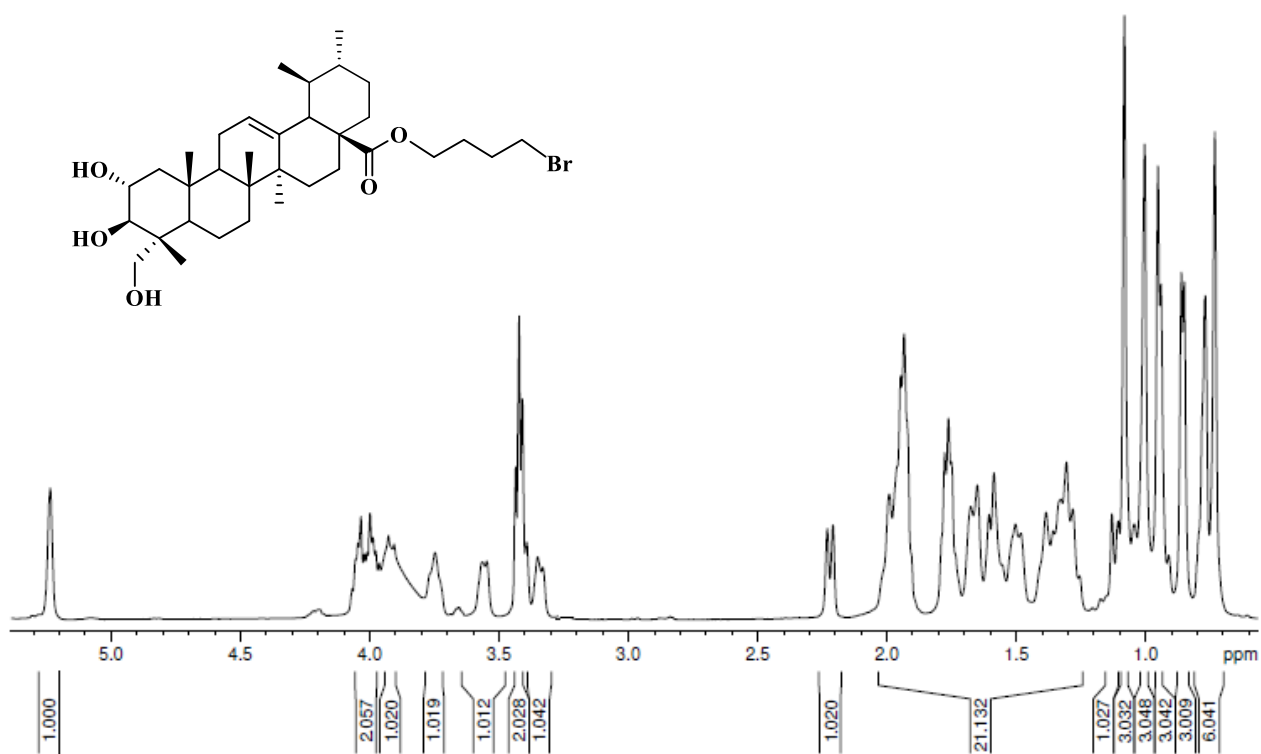
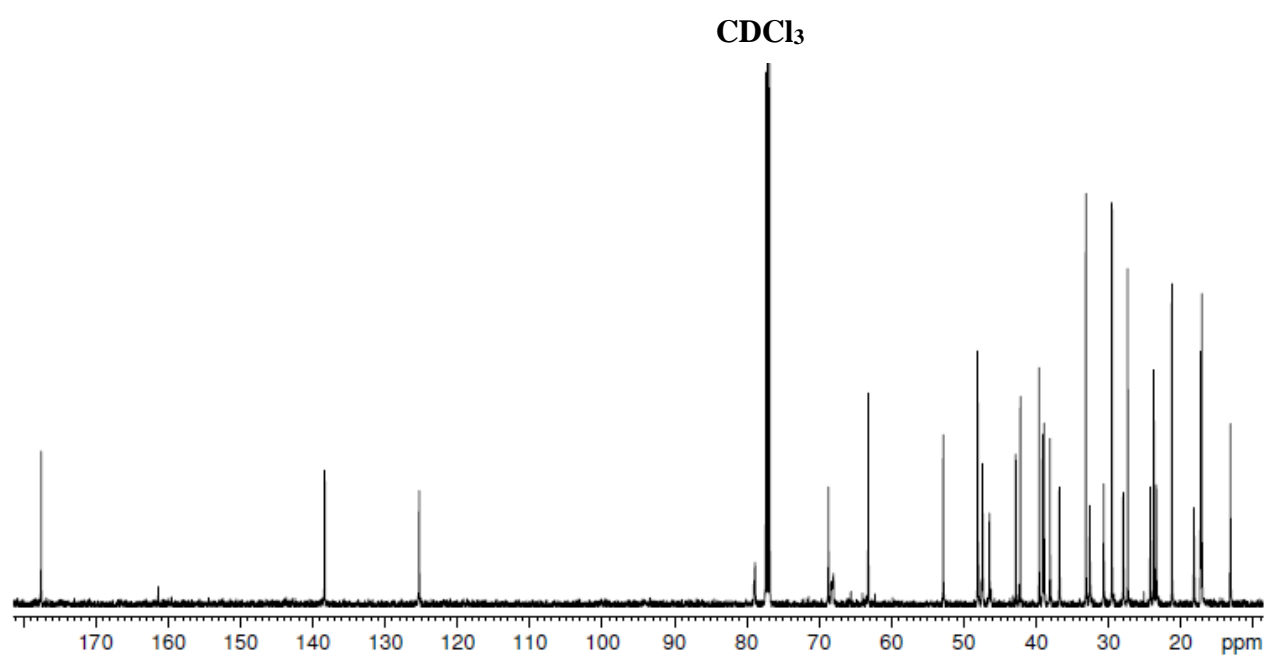
Рисунок А. 23 – Спектр ЯМР ^1H соединения 29Рисунок А. 24 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения 29

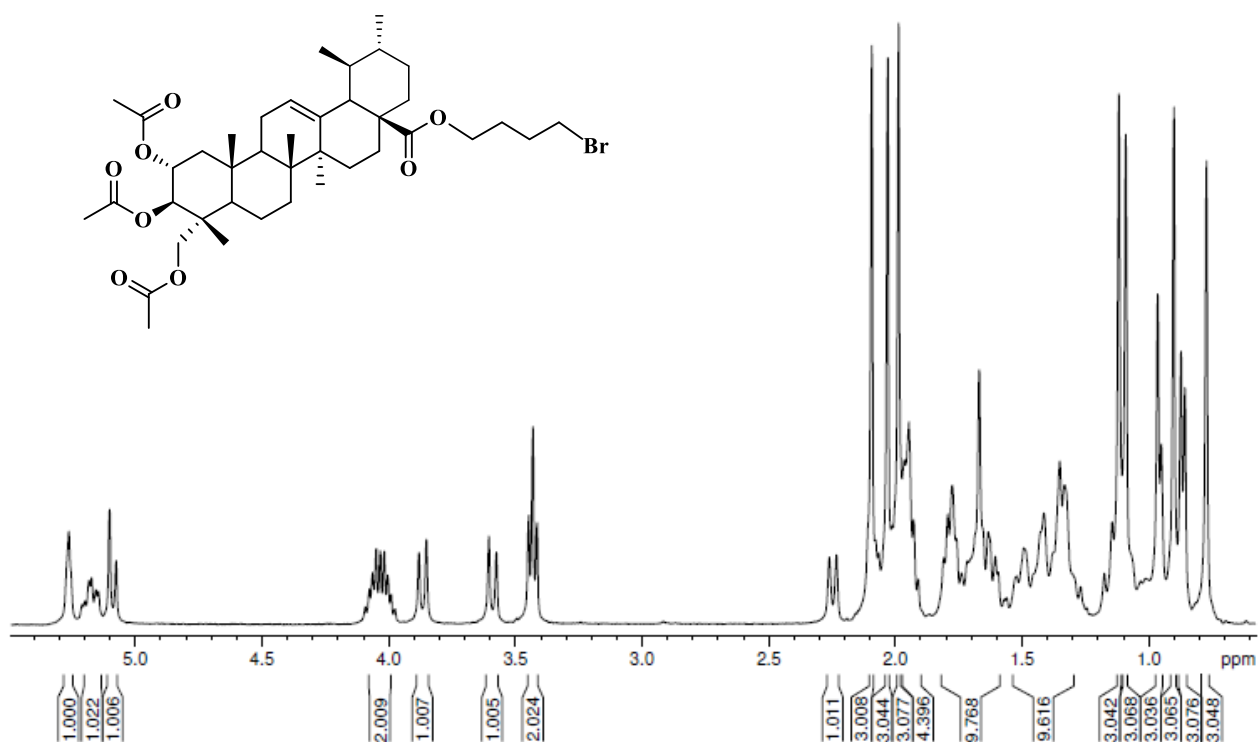
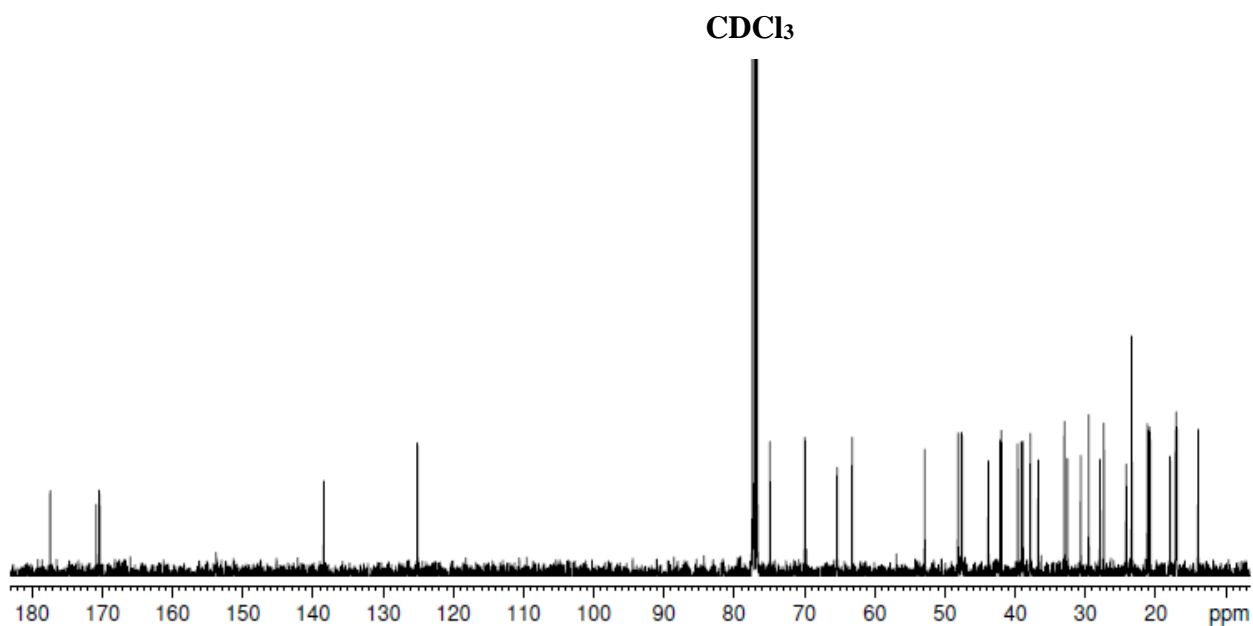
Рисунок А. 25 – Спектр ЯМР ¹H соединения 32Рисунок А. 26 – Спектр ЯМР ¹³C соединения 32

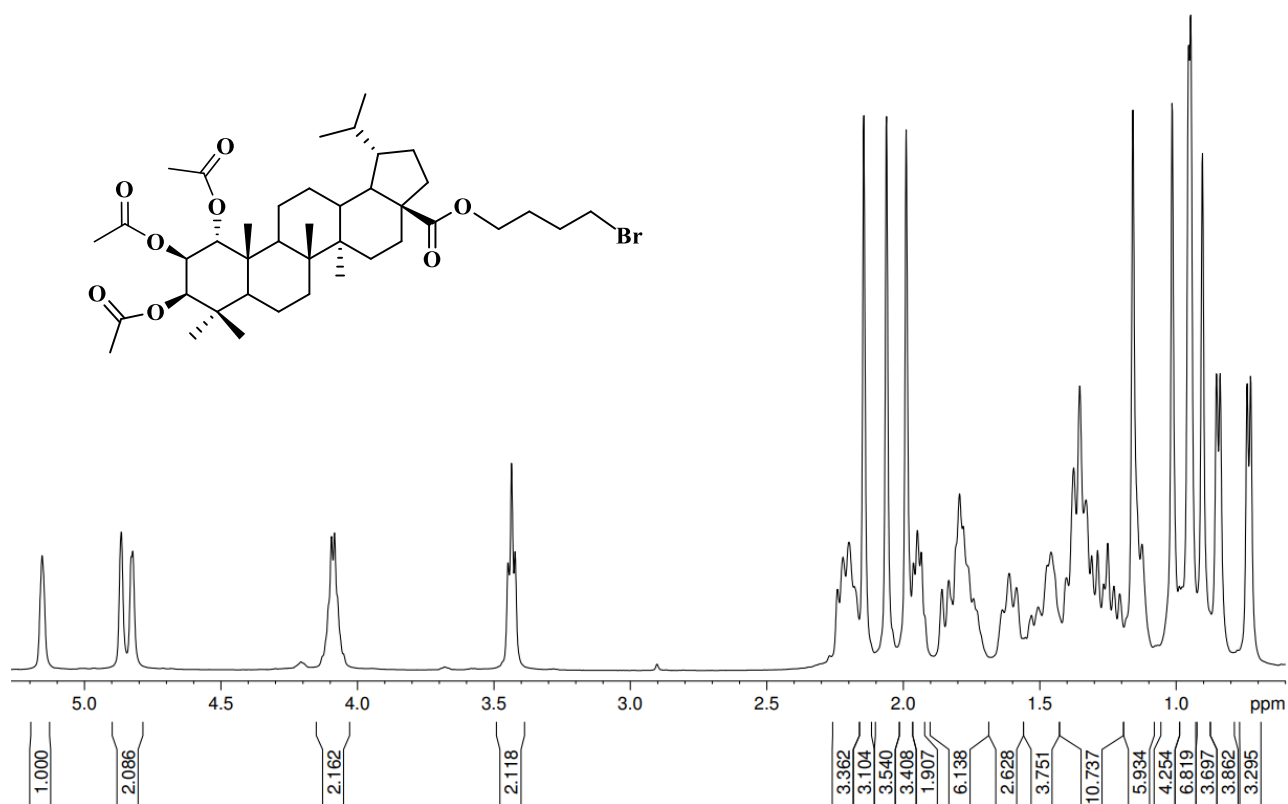
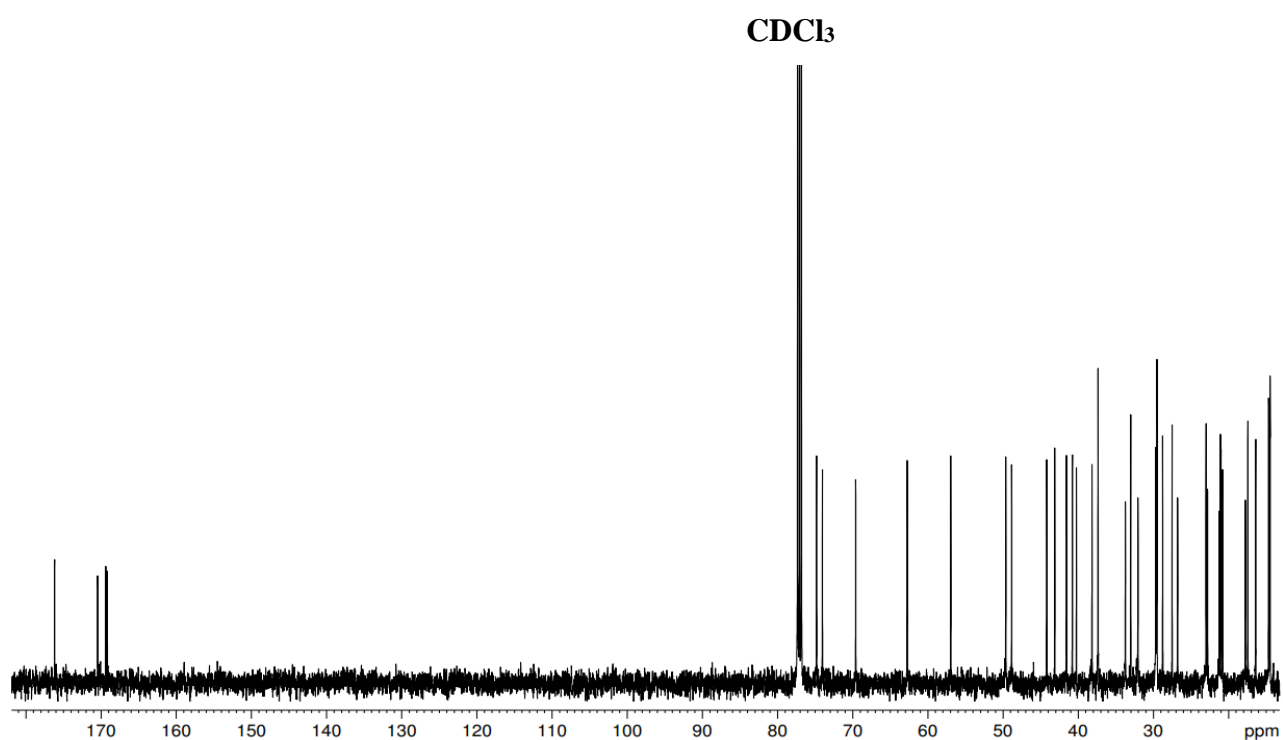
Рисунок А. 27 – Спектр ЯМР ^1H соединения 33Рисунок А. 28 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения 33

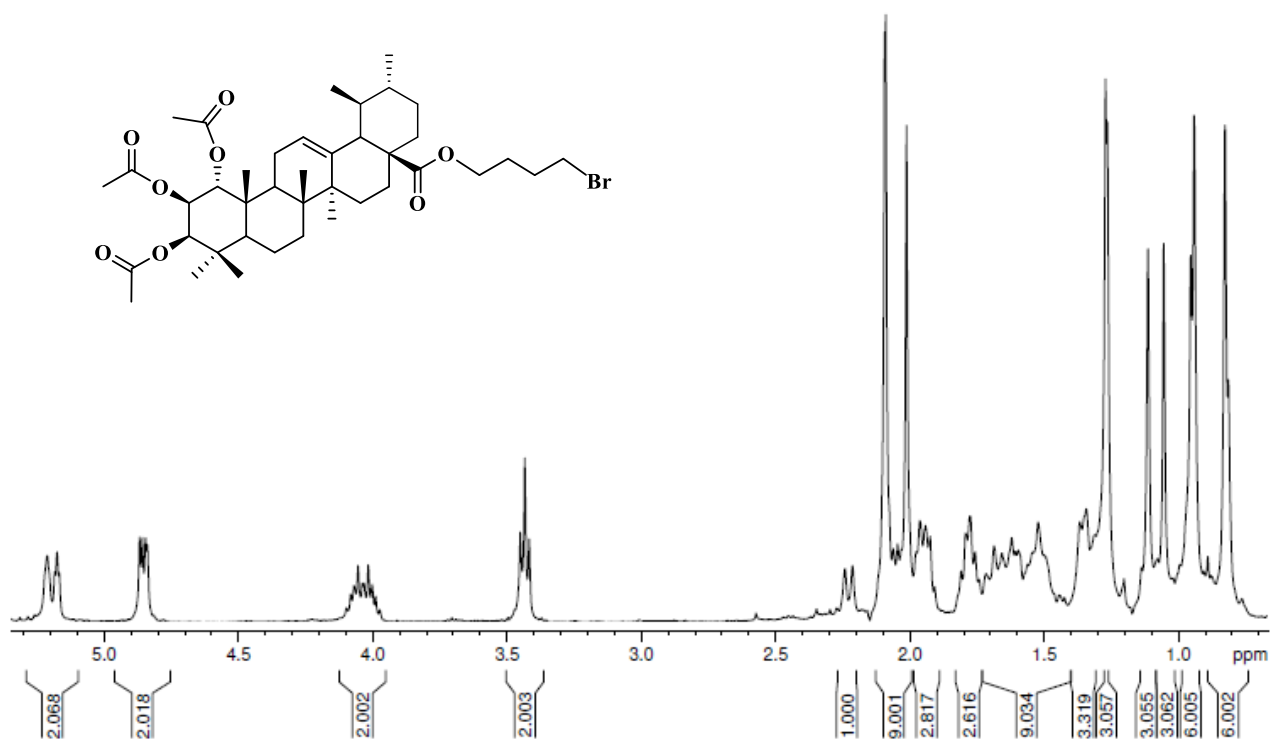
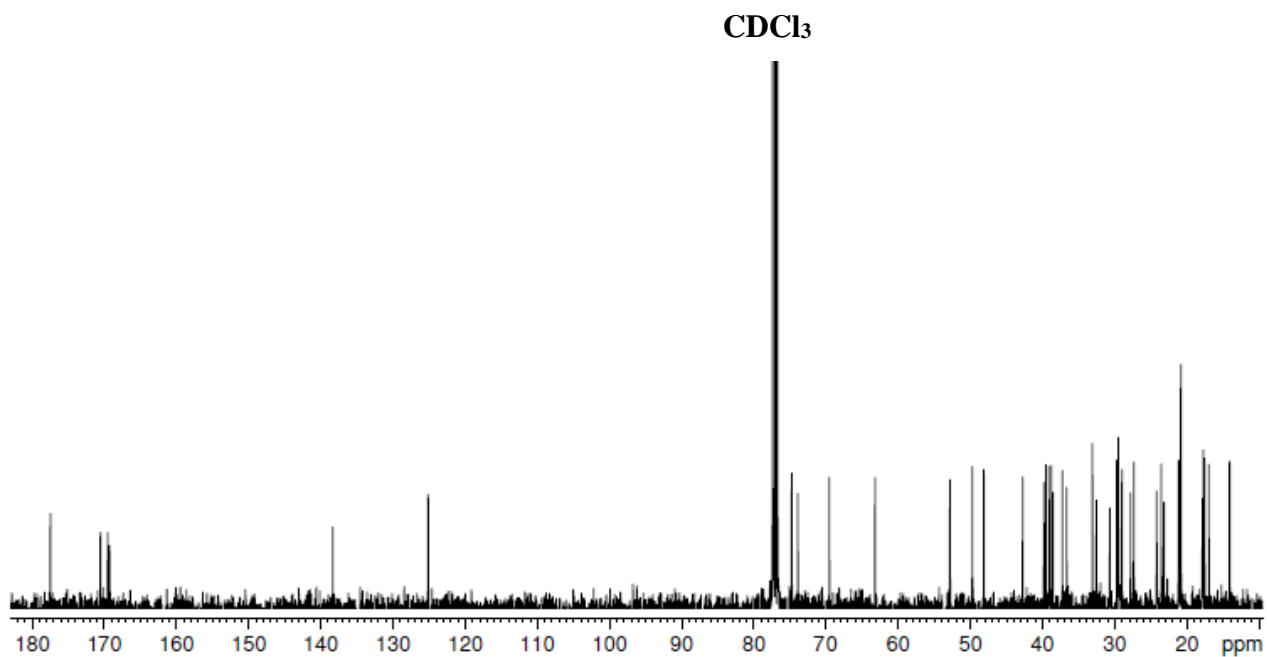
Рисунок А. 29 – Спектр ЯМР ¹H соединения 38Рисунок А. 30 – Спектр ЯМР ¹³C соединения 38

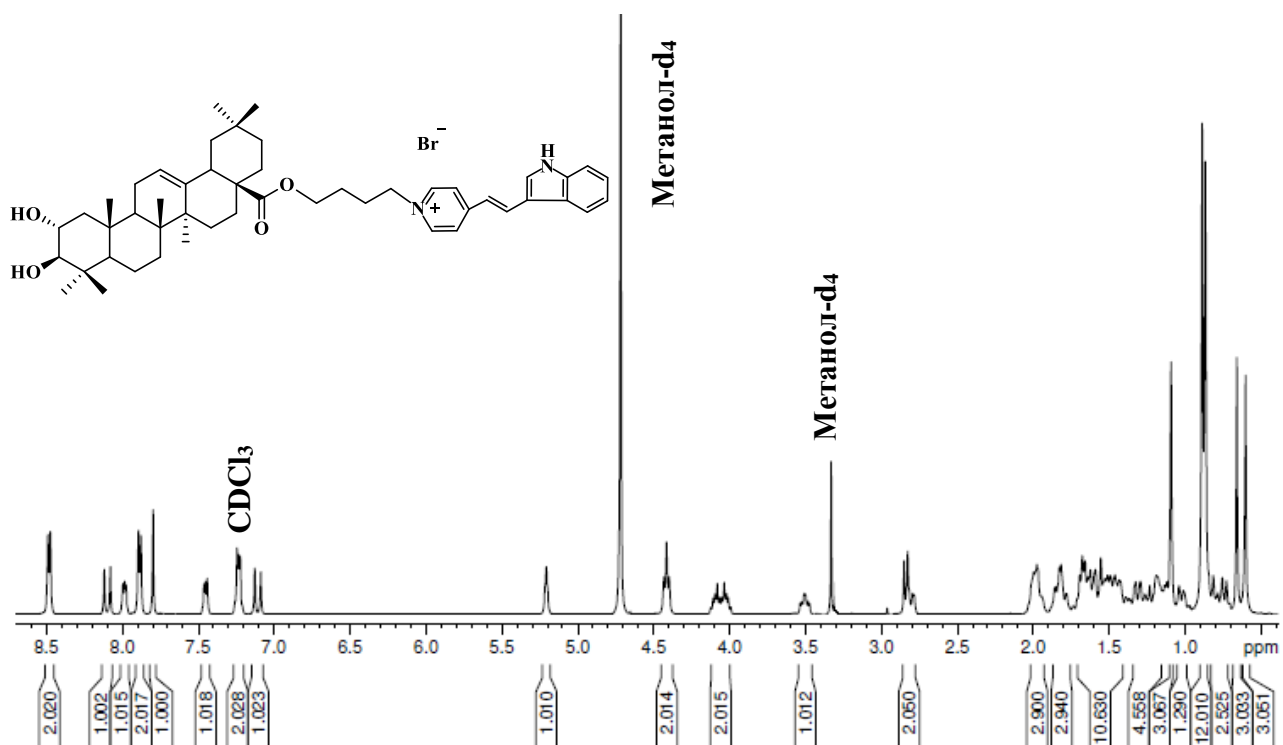
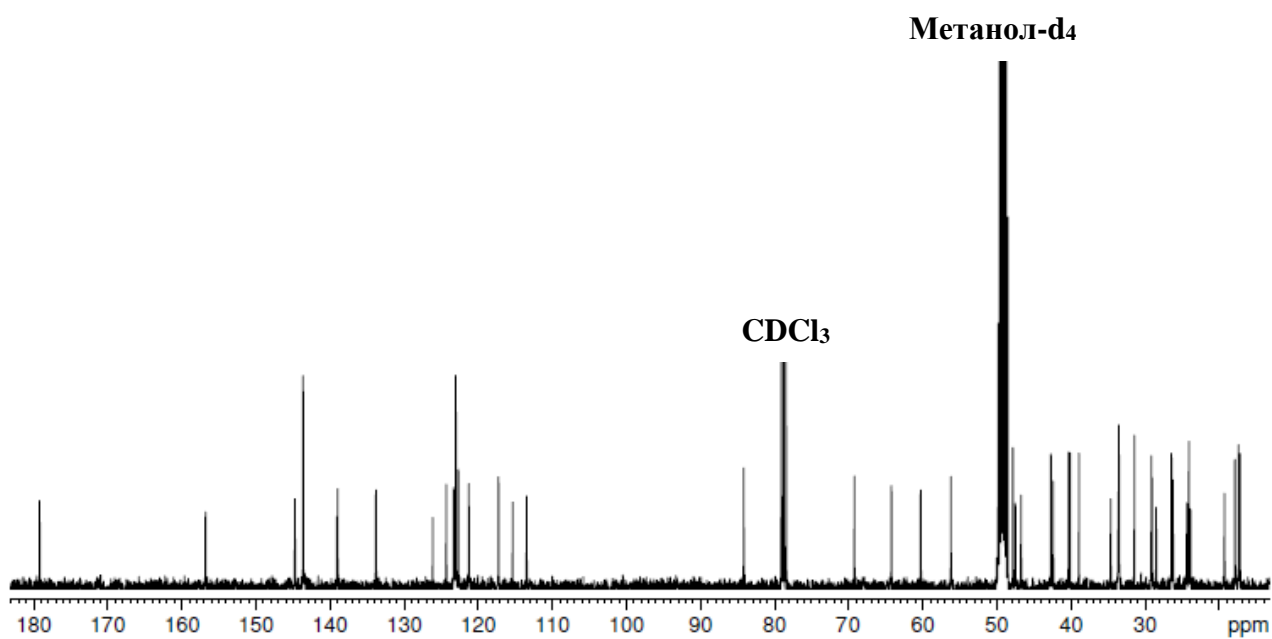
Рисунок А. 31 – Спектр ЯМР ^1H соединения **39**Рисунок А. 32 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **39**

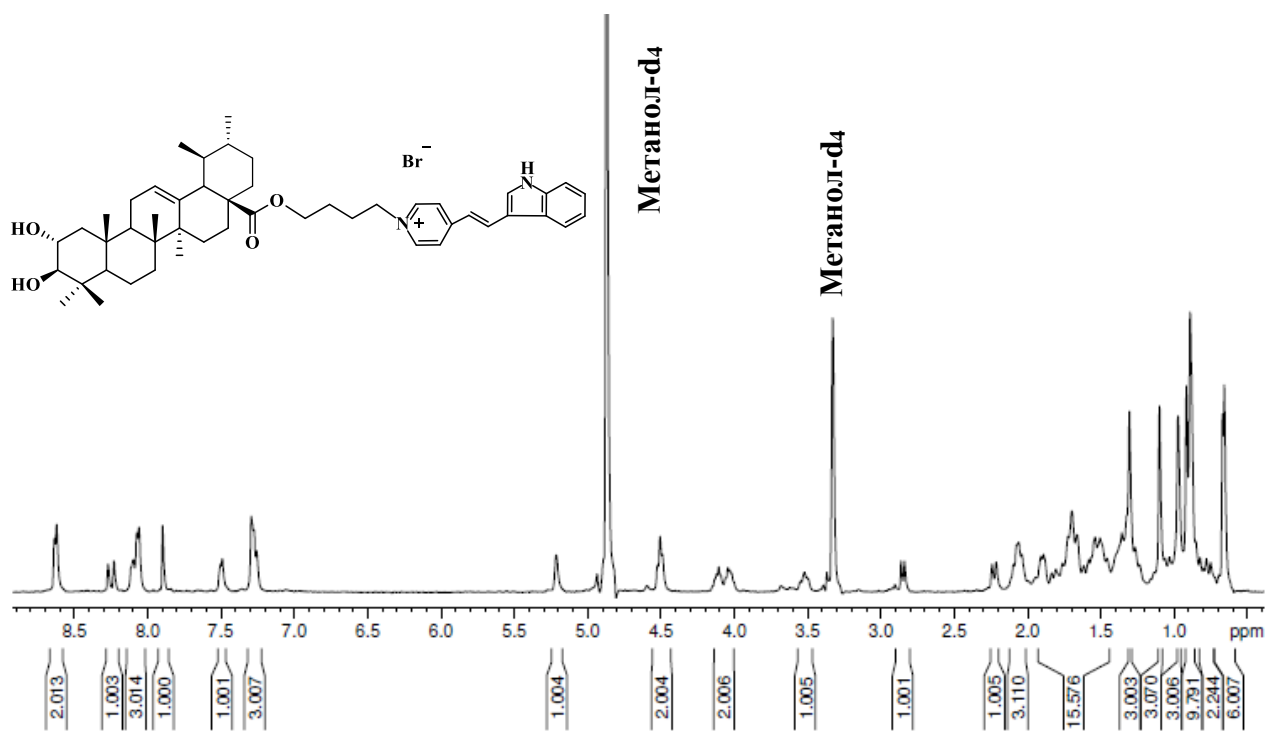
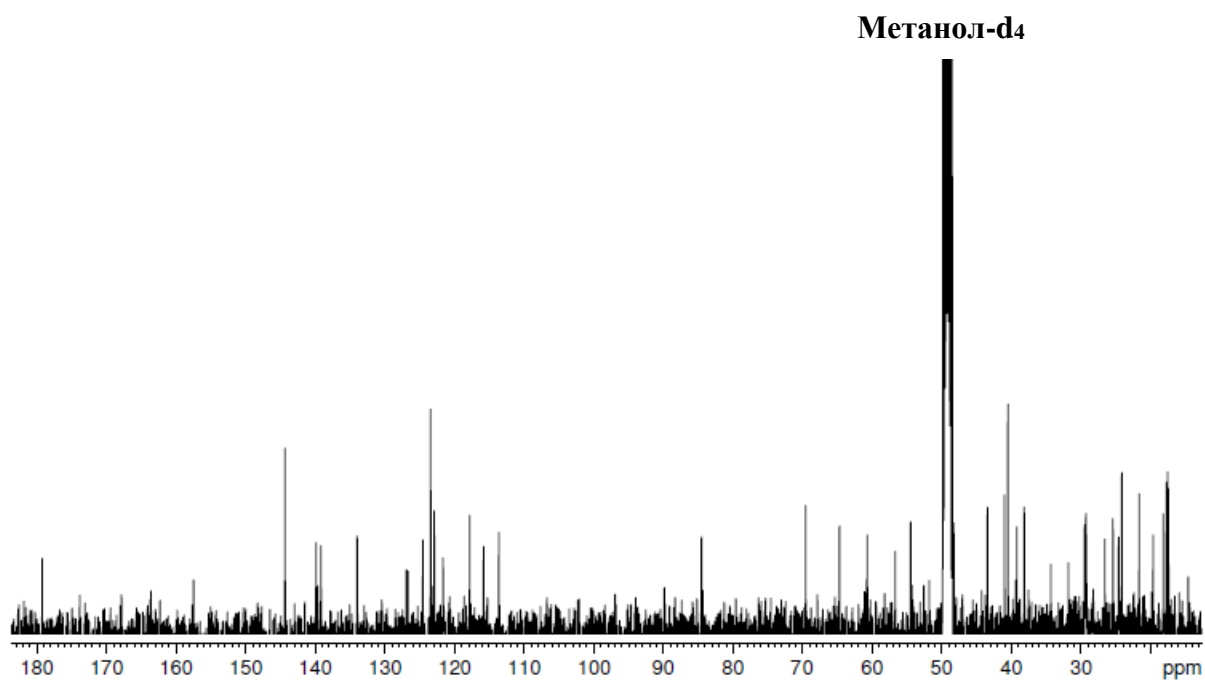
Рисунок А. 33 – Спектр ЯМР ^1H соединения **53**Рисунок А. 34 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **53**

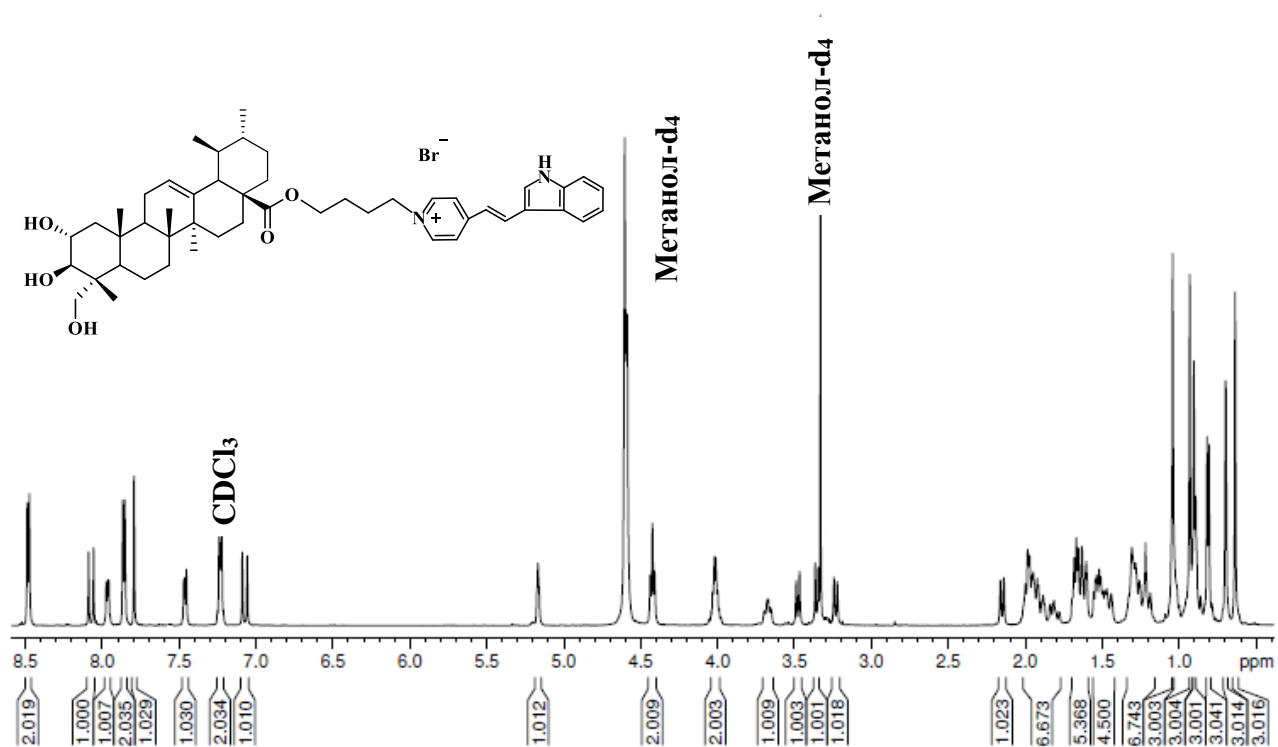
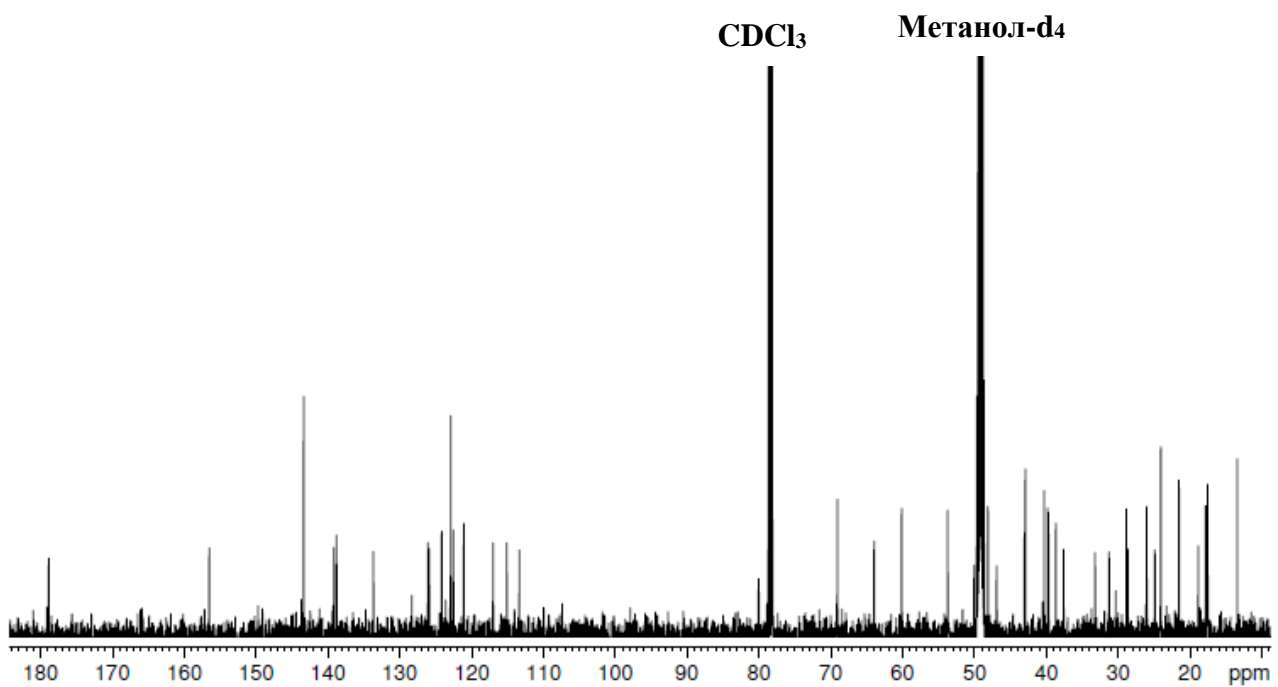
Рисунок А. 35 – Спектр ЯМР ^1H соединения **53a**Рисунок А. 36 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **53a**

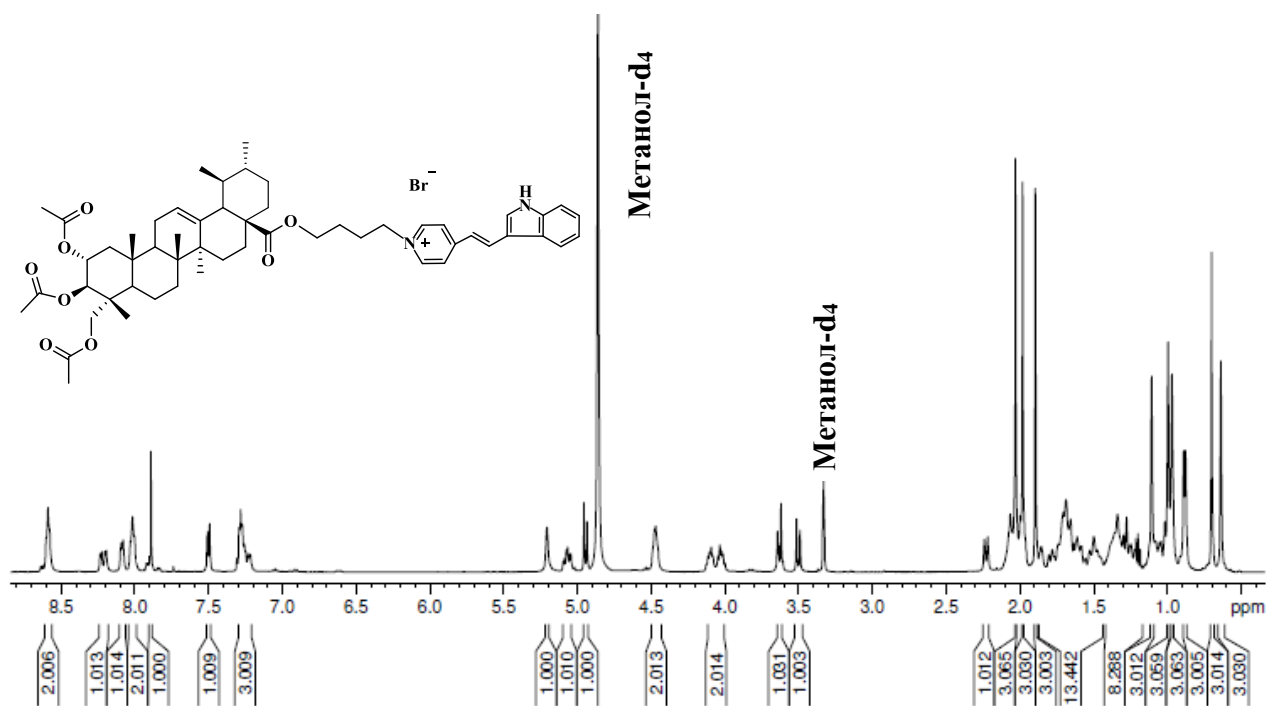
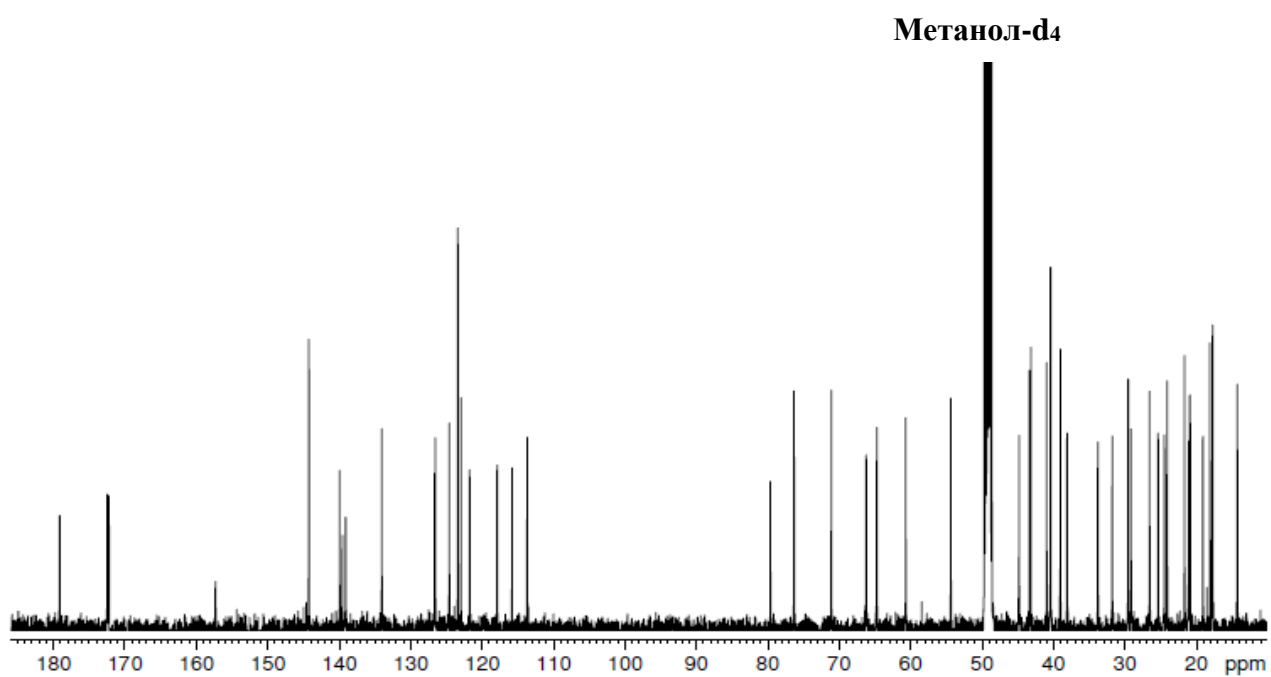
Рисунок А. 37 – Спектр ЯМР ^1H соединения **62**Рисунок А. 38 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **62**

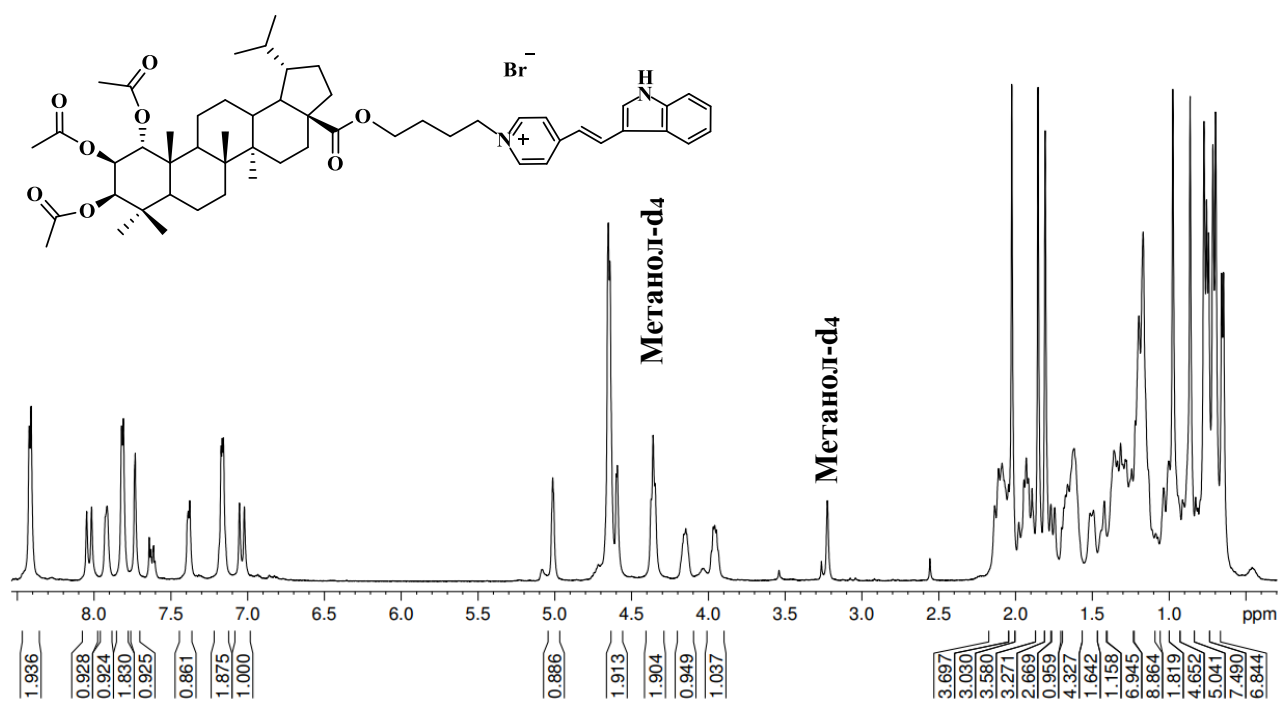
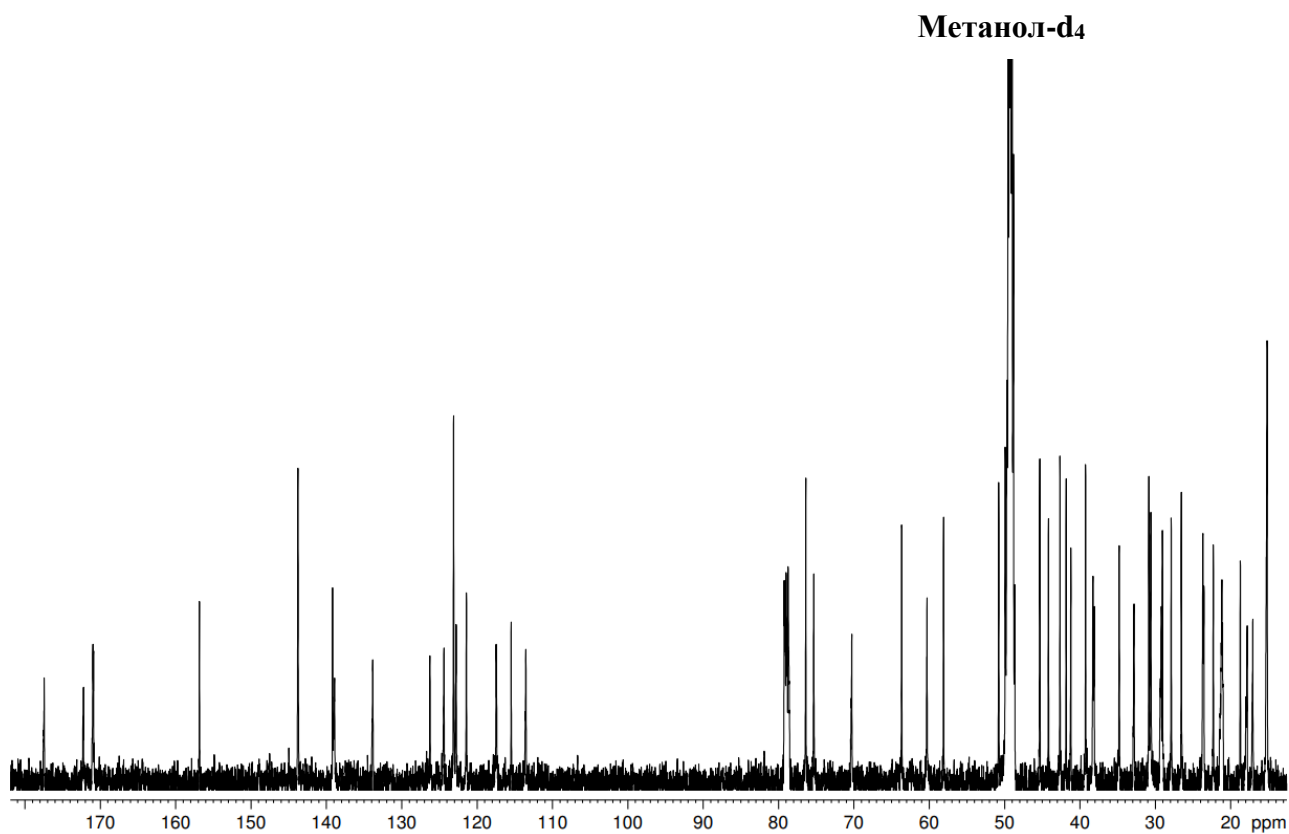
Рисунок А. 39 – Спектр ЯМР ^1H соединения **66**Рисунок А. 40 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **66**

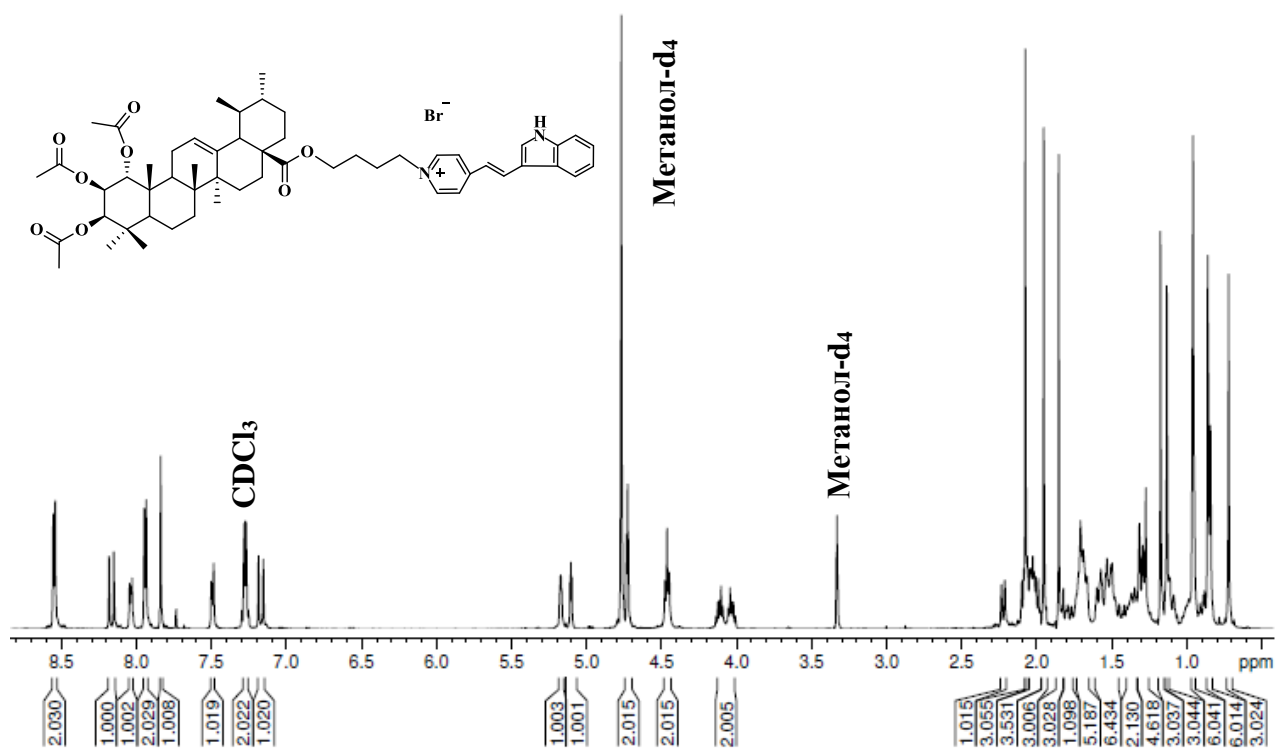
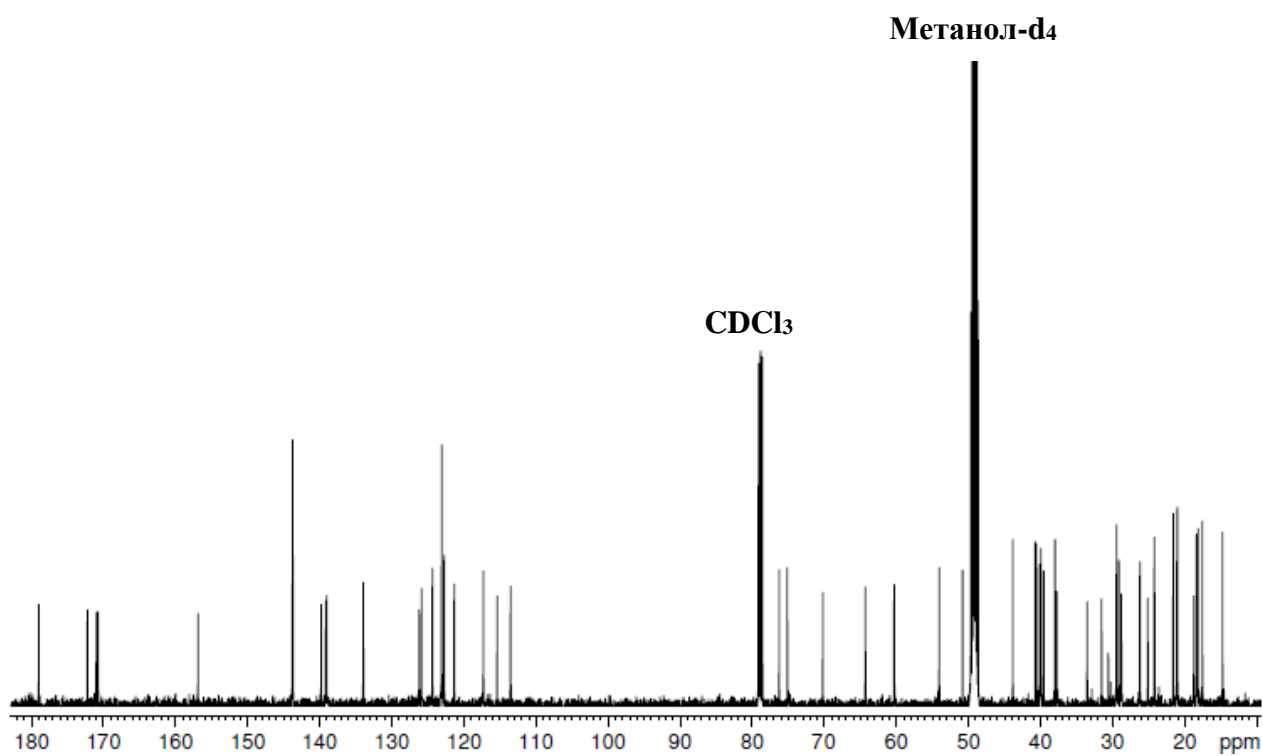
Рисунок А. 41 – Спектр ЯМР ^1H соединения 50Рисунок А. 42 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения 50

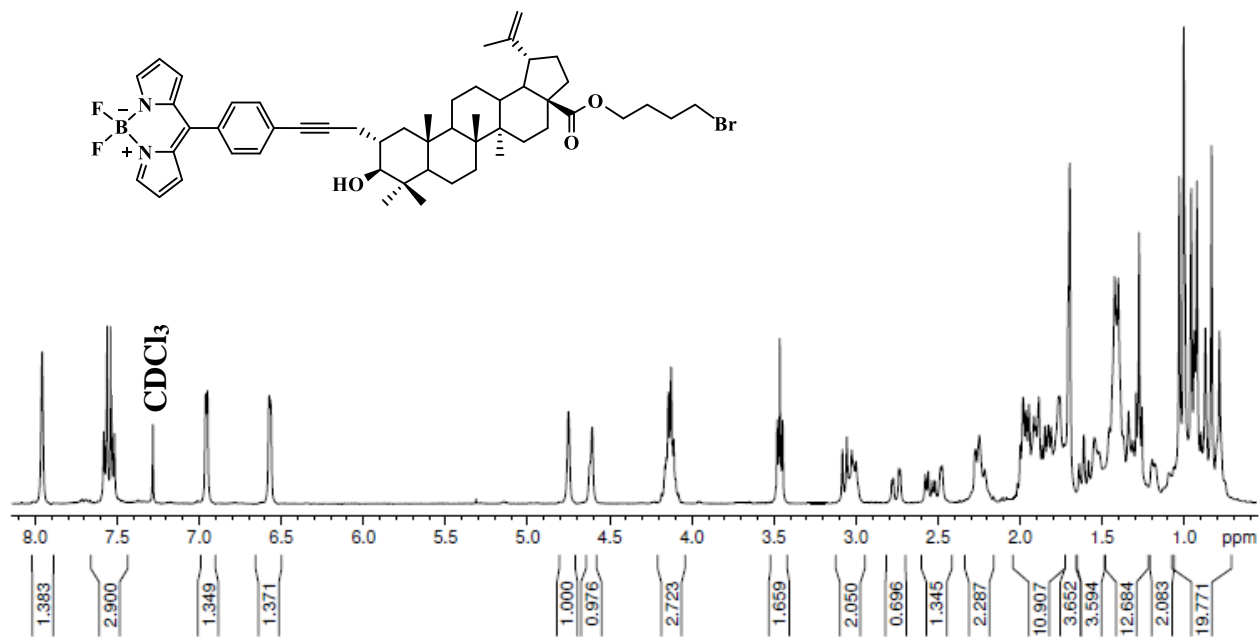
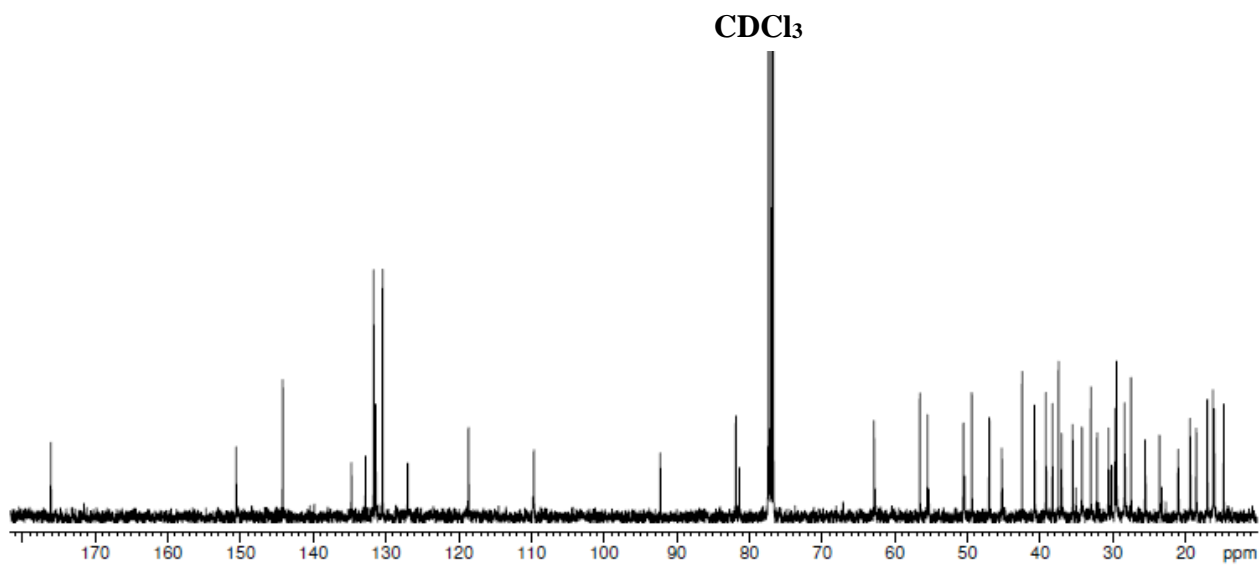
Рисунок А. 43 – Спектр ЯМР ^1H соединения **51**Рисунок А. 44 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **51**

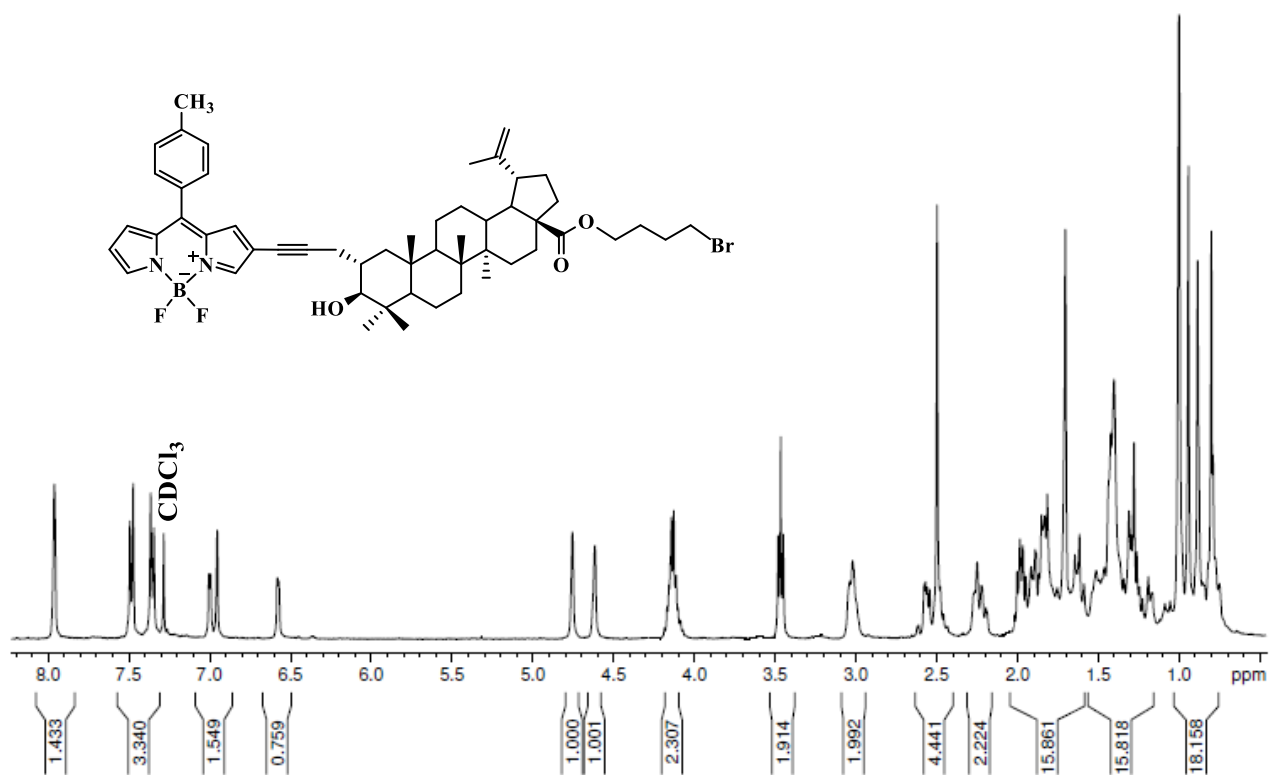
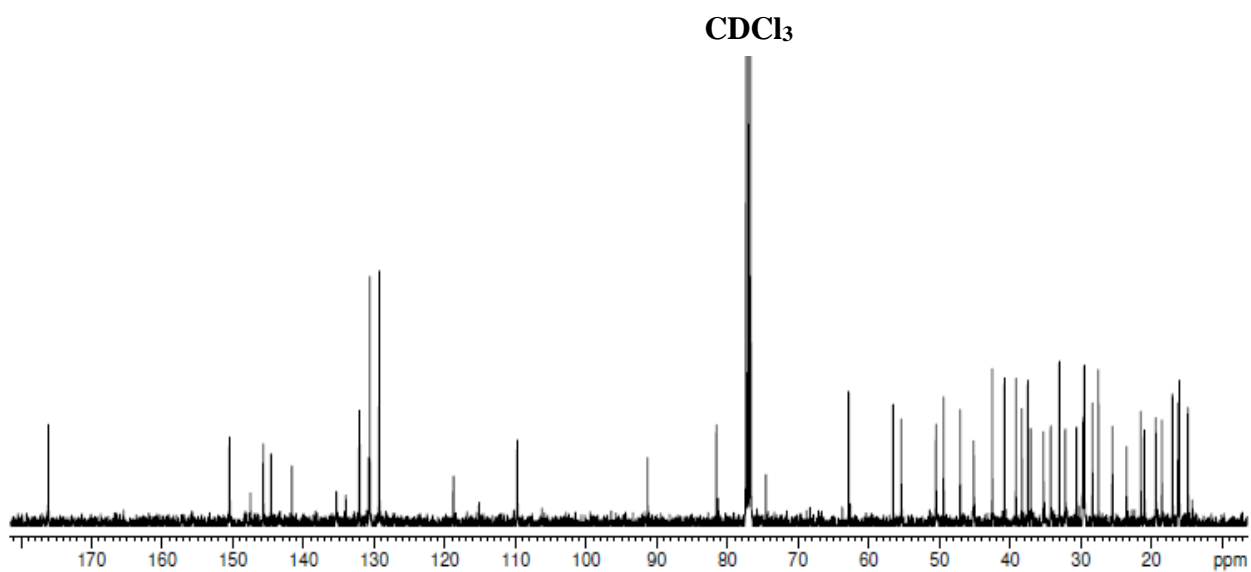
Рисунок А. 45 – Спектр ЯМР ^1H соединения 54Рисунок А. 46 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения 54

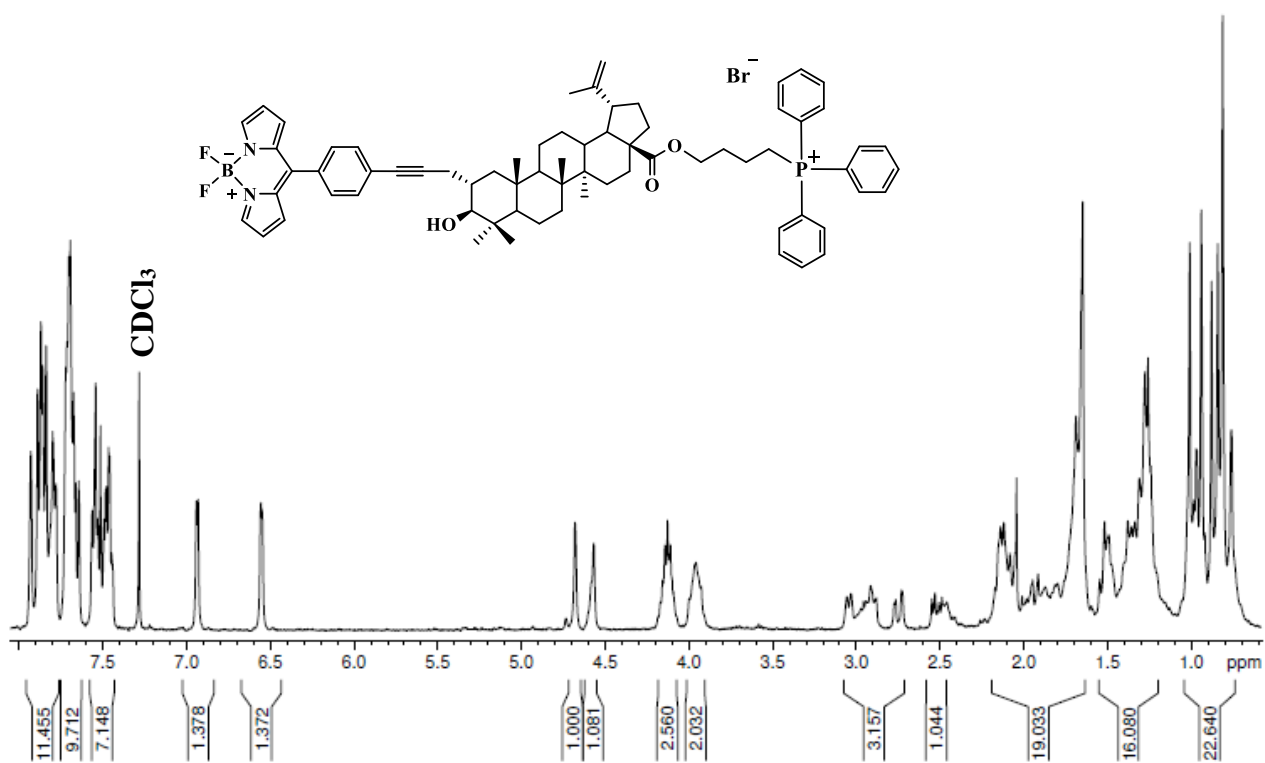
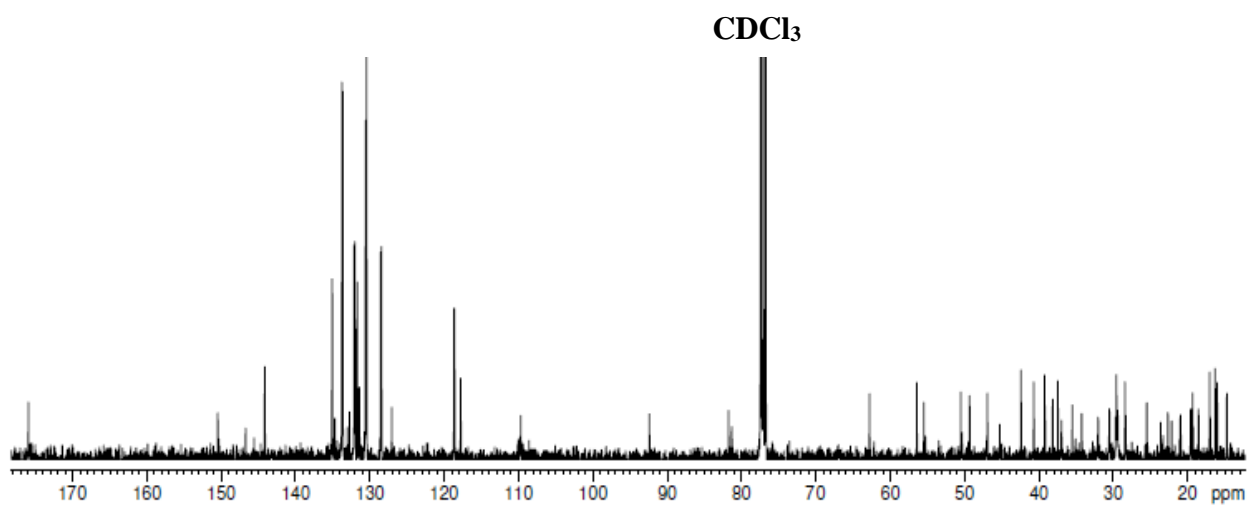
Рисунок А. 47 – Спектр ЯМР ¹H соединения **54a**Рисунок А. 48 – Спектр ЯМР ¹³C соединения **54a**

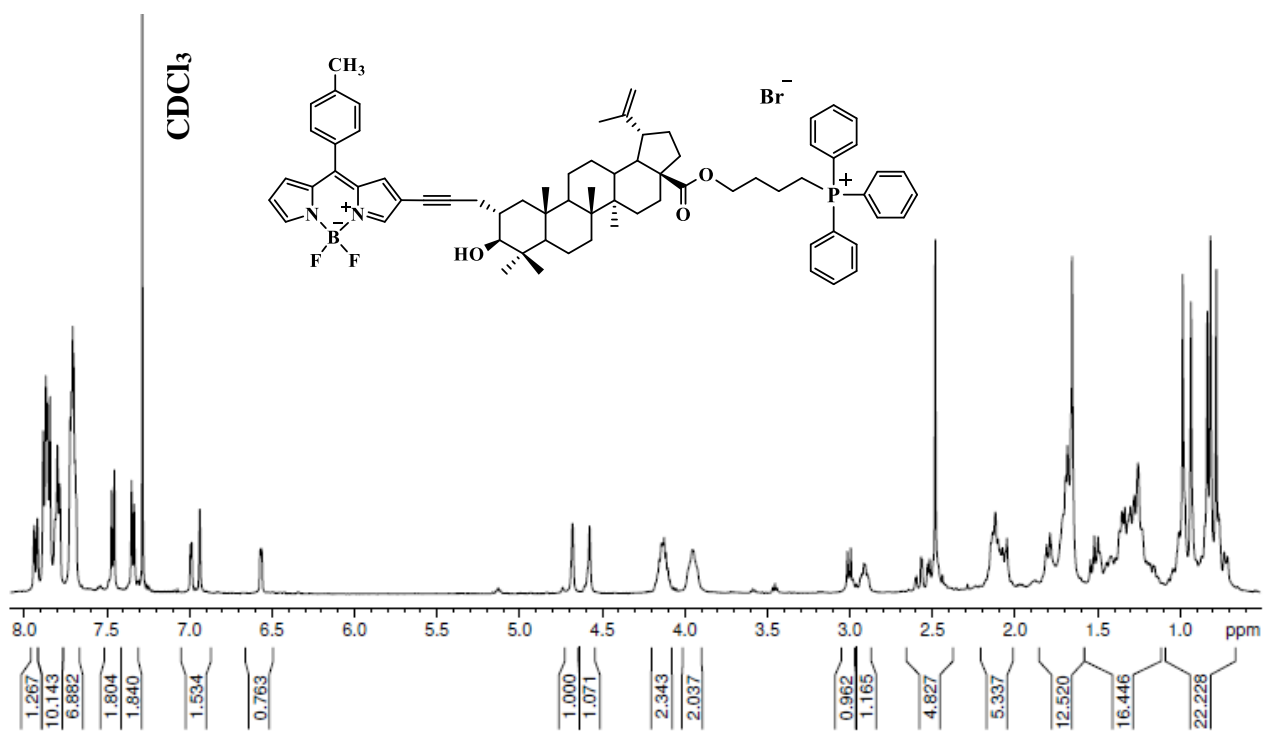
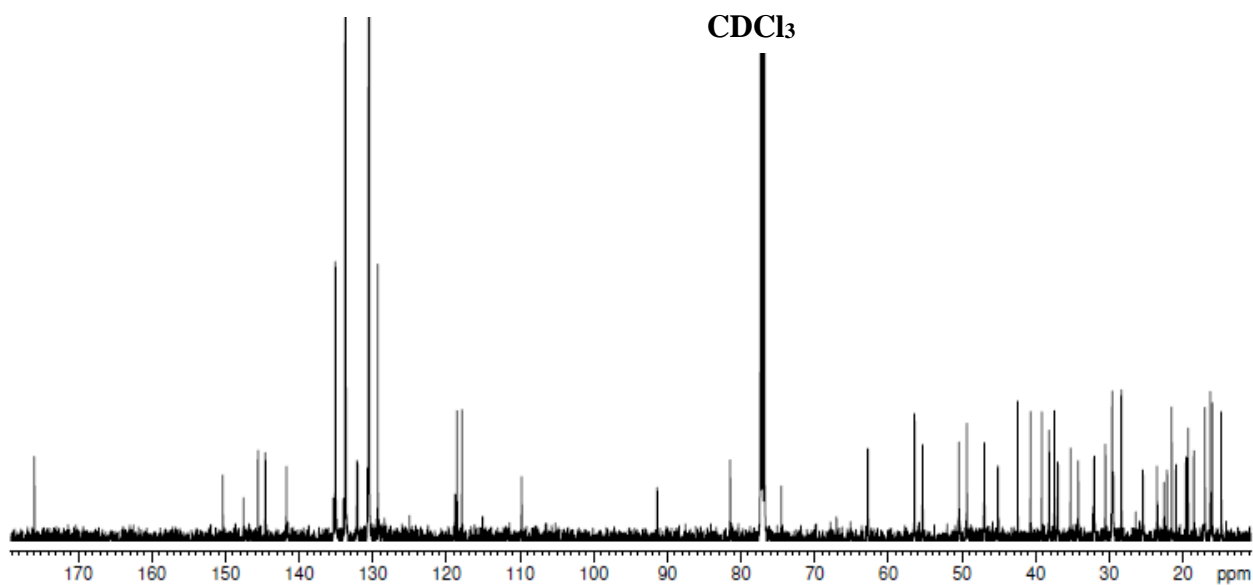
Рисунок А. 49 – Спектр ЯМР ^1H соединения **63**Рисунок А. 50 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **63**

Рисунок А. 51 – Спектр ЯМР ^1H соединения **67**Рисунок А. 52 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **67**

Рисунок А. 53 – Спектр ЯМР ^1H соединения **75**Рисунок А. 54 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **75**

Рисунок А. 55 – Спектр ЯМР ^1H соединения **76**Рисунок А. 56 – Спектр ЯМР ^{13}C соединения **76**

Рисунок А. 57 – Спектр ЯМР ¹H соединения **77**Рисунок А. 58 – Спектр ЯМР ¹³C соединения **77**

Рисунок А. 59 – Спектр ЯМР ¹H соединения 78Рисунок А. 60 – Спектр ЯМР ¹³C соединения 78