

На правах рукописи



Захаренкова Софья Андреевна

ВВЕДЕНИЕ ФАРМАКОФОРНЫХ ГРУППИРОВОК В МОЛЕКУЛУ ПРИРОДНОГО
ФЕОСФЕРИДА А КАК ПУТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном унитарном предприятии «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства.

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор

Тришин Юрий Георгиевич

Официальные
оппоненты:

Резников Александр Николаевич, доктор химических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный технический университет», профессор

Храмчихин Андрей Владимирович, кандидат химических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», доцент

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «**Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет**» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 06 апреля 2022 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.383.01 созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)» по адресу: 190013, Санкт-Петербург, Московский пр., 26, Белоколонный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), <http://technolog.edu.ru/university/dissowet/autoreferats/file/9170-...html>

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, просим отправлять по адресу: 190013, Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Ученый совет, e-mail: dissowet@technolog.edu.ru

Автореферат разослан февраля 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Григорьева Татьяна Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Модификация природных биологически активных веществ методами синтетической органической химии является одним из конструктивных подходов к получению новых лекарственных субстанций. Это особенно актуально для создания противораковых химиотерапевтических средств, так как онкологические заболевания относятся к числу главных причин высокой смертности и требуют огромных расходов для их лечения. На сегодняшний день значительная часть применяемых на практике противоопухолевых препаратов создана на основе веществ, выделенных из природных источников (винбластин, винкристин, подофиллотоксин и др.). В числе эффективных противораковых лекарственных средств заметное место занимают также химически модифицированные природные соединения (иринотекан, этопозид, доцетаксел и др.). В 2011 году специалистами «Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений» (г. Санкт-Петербург) из экстрактов мицелия гриба *Paraphoma* sp. 1.46 в качестве мажорного соединения был выделен (2S,3R,4S)-3,4-дигидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-он, так называемый феосферид А (РРА), который обнаружил высокую цитотоксическую активность на нескольких линиях раковых клеток. Для усиления цитотоксичности представлялось важным и целесообразным осуществить химическую модификацию этого соединения путем введения в его молекулу фармакофорных группировок, присутствие которых во многих известных случаях обеспечивает биологическую активность веществ.

Степень разработанности темы. Химической модификации РРА в литературе посвящено несколько работ, выполненных в последние 6 лет в ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России (Ленинградская область) (лаборатория химического моделирования) группой В.В. Абзианидзе. При этом были получены некоторые С(4)-производные РРА, проявляющие более высокую цитотоксическую активность по сравнению с исходным РРА. Было также установлено, что реакции, протекающие по азотсодержащему циклу РРА с участием группы N-ОСН₃ и экзоциклической связи С=С, приводят к соединениям с более низкой цитотоксической активностью по сравнению с исходным субстратом.

Цели и задачи: разработка методов введения в положение С(4) молекулы природного РРА фармакофорных группировок и получение таким образом новых производных этого соединения, а также оценка их противораковой активности.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

1. проведение этерификации РРА с участием гидроксильной группы при атоме С(4) под действием хлорацетил- и δ-хлорвалерилхлоридов;
2. осуществление реакций замещения хлора в δ -хлорацетилоксипроизводном РРА при взаимодействии с меркаптогетероциклическими соединениями;

3. синтез C(4)-аминопроизводных РРА при действии первичных и вторичных (в том числе циклических) аминов различного строения на 4-метансульфонатное производное РРА;
4. осуществление реакции РРА с диэтиламиносульфотрифторидом (DAST) для получения 4-фторпроизводного РРА;
5. определение цитотоксической активности полученных 4-замещенных РРА на 10 линиях раковых клеток;
6. исследование антипролиферативных эффектов на клетках с фенотипом множественной лекарственной устойчивости и определение класса опасности некоторых полученных наиболее перспективных производных РРА.

Научная новизна. Впервые систематически реализован подход к синтезу новых потенциальных противораковых субстанций на основе природного РРА путем введения в положение 4 его молекулы фармакофорных группировок, в результате чего синтезировано 20 новых производных РРА. В качестве фармакофорных группировок использованы хлорацилокси-, циклогетерилтио-, циклические и ациклические (первичные и вторичные) аминогруппы, а также атом фтора. На 10 линиях раковых клеток определена цитотоксическая активность синтезированных соединений, которая в подавляющем числе случаев оказалась выше, чем у исходного РРА и контрольного, используемого в медицинской практике, этопозиды. Выявлено 2 «вещества-лидера» (4-пирроло- и 4-диметиламинозамещенный РРА) для дальнейшего изучения в качестве наиболее перспективных противораковых субстанций.

Теоретическая и практическая значимость работы. На примере РРА получены новые данные о направленной химической модификации природных соединений достаточно сложного строения, при этом показана позитивность применения современных реагентов органического синтеза. Установлена зависимость строения синтезированных производных РРА и их противоопухолевой активности от состава и строения фармакофорных группировок, введенных в молекулу исходного природного соединения. Так, наиболее высокую цитотоксическую активность по сравнению с цитотоксичностью исходного РРА проявляют его производные, содержащие у атома C(4) аминогруппы открытого и циклического строения. Практическая значимость работы состоит в разработке методик получения новых полусинтетических биологически активных веществ, которые по результатам определения цитотоксической активности, острой токсичности и лекарственной устойчивости относятся к перспективным противоопухолевым субстанциям, способным найти применение при лечении резистентных к химиотерапии онкологических заболеваний.

Методология и методы исследования. Получение C(4)-производных РРА осуществлено с применением современных экспериментальных методов синтеза, выделения и очистки органических веществ. Для определения состава реакционных смесей и строения конечных продуктов исследуемых реакций использованы методы ИК, ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F спектроскопии, в том числе с применением двумерных

корреляционных экспериментов. Состав полученных веществ подтвержден масс-спектрометрически. Определение их биологически активных свойств выполнено по стандартизованным методикам при сопоставлении со свойствами контрольных веществ (этопозид, доксорубин, бартезомиб, верапамил).

Положения, выносимые на защиту:

- методики синтеза C(4)-производных РРА;
- доказательства состава и структуры полученных соединений;
- результаты определения биологической активности синтезированных C(4)-производных РРА.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность экспериментальных результатов и выводов, сделанных на их основе, обеспечена применением современных теоретических представлений органической химии, согласующимися между собой современными физико-химическими методами анализа, включая двумерную ЯМР спектроскопию, и стандартизованными методами определения биологической активности полученных соединений. Результаты диссертационной работы представлены на следующих конференциях: «Неделя науки-2018» в Технологическом институте (Санкт-Петербург, 2018); III Всероссийская научная конференция молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2018); IV Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике «МОБИ-ХимФарма-2018» (Крым, 2018); IV Всероссийская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-2019» (Екатеринбург, 2019); «XXI Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry» (Санкт-Петербург, 2019); Международная научная конференция «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» (Екатеринбург, 2020), IV Всероссийская научная конференция молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2020); «The XII International conference on chemistry for young scientists «Mendeleev 2021» (Санкт-Петербург, 2021). По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science, получен патент РФ на изобретение №2748533, 26.05.21.

Работа изложена на 154 страницах. Состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, списка цитируемой литературы (117 наименований) и приложения. Содержит 133 рисунка, 19 схем, 3 таблицы.

С.А. Захаренкова выражает благодарность А.О. Берестецкому (ФБГНУ «ВНИИЗР») за предоставление феофериды А и Н.И. Моисеевой (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) за осуществление биологических испытаний.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Одним из недавно выделенных природных соединений, проявляющих цитотоксическую активность, является (2S,3R,4S)-3,4-дигидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-он, так называемый феосферид А (РРА) **1**, который впервые был получен в 2006 году Дж. Кларди с коллегами (Великобритания) из эндофитного гриба FA39 *Phaeosphaeria avenaria*, а в 2011 году А.О. Берестецким (Россия) из экстрактов мицелия гриба *Paraphoma sp.* 1.46. РРА представляет собой желтоватое легкоплавкое оптически активное кристаллическое вещество ($[\alpha]_{20}^D$ -93.6 (с 2.0, CH₂Cl₂)). Его строение и абсолютная конфигурация хиральных атомов углерода достоверно установлены на основании данных ЯМР спектроскопии и рентгеноструктурного анализа (рис. 1). РРА ингибирует STAT3/ДНК связывание с индексом IC₅₀ 0.61 мМ и рост клеток в STAT3-зависимых U266 клетках множественной миеломы с EC₅₀ 6.7 мМ.

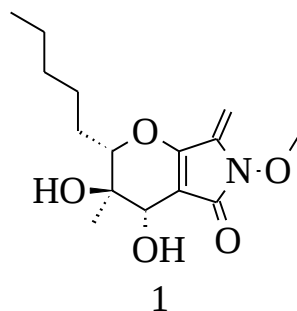


Рисунок 1 - Структурная формула РРА **1**

В выполненных в последние 6 лет в ФГУП «НИИ ГПЭЧ» исследованиях было установлено, что реакции, протекающие по азотсодержащему циклу РРА с участием группы N-OCH₃ и экзоциклической связи C=C, приводят к соединениям с более низкой цитотоксической активностью по сравнению с исходным субстратом, в то время как введение некоторых фармакофорных группировок к атому C(4) увеличивает цитотоксическую активность модифицированных веществ по сравнению с исходным РРА. Поэтому в данной работе осуществлен синтез серии производных РРА, полученных в результате реакций с участием группы OH при атоме C(4), и оценено влияние введенных структурных фрагментов на цитотоксичность полученных веществ.

1 Ацилирование РРА с участием группы OH у атома C(4) хлорангидридами ω-хлоркарбоновых кислот

Взаимодействием хлорацетил- и δ-хлорвалерилхлоридов с РРА **1** в присутствии диметиламинопиридина (DMAP), который в таких реакциях является катализатором, благодаря образованию комплекса с ацилирующим агентом, и триэтиламина (TEA) для связывания образующегося хлороводорода в среде безводного хлористого метилена нами получены соответствующие 4-ω-хлорацетил- и 4-δ-хлорвалерил-производные.

РРА 2 и 3 (схема 1). Хлорацетоксильное производное 2 было получено ранее в нашей лаборатории и обнаружило несколько более высокую цитотоксичность, чем у исходного РРА 1, на клеточной линии А549 (EC_{50} $33 \pm 7 \mu M$ и $46 \pm 7 \mu M$ соответственно). Необходимо было провести более широкое исследование цитотоксической активности этого соединения 2, а кроме того его планировалось использовать в качестве исходного соединения для получения более сложно построенных производных РРА 1 путем замещения атома хлора в хлорметильной группе. Производное 3 было получено для сравнительной оценки влияния длины цепи ω -хлорацетоксильной группы на цитотоксическую активность соединения.

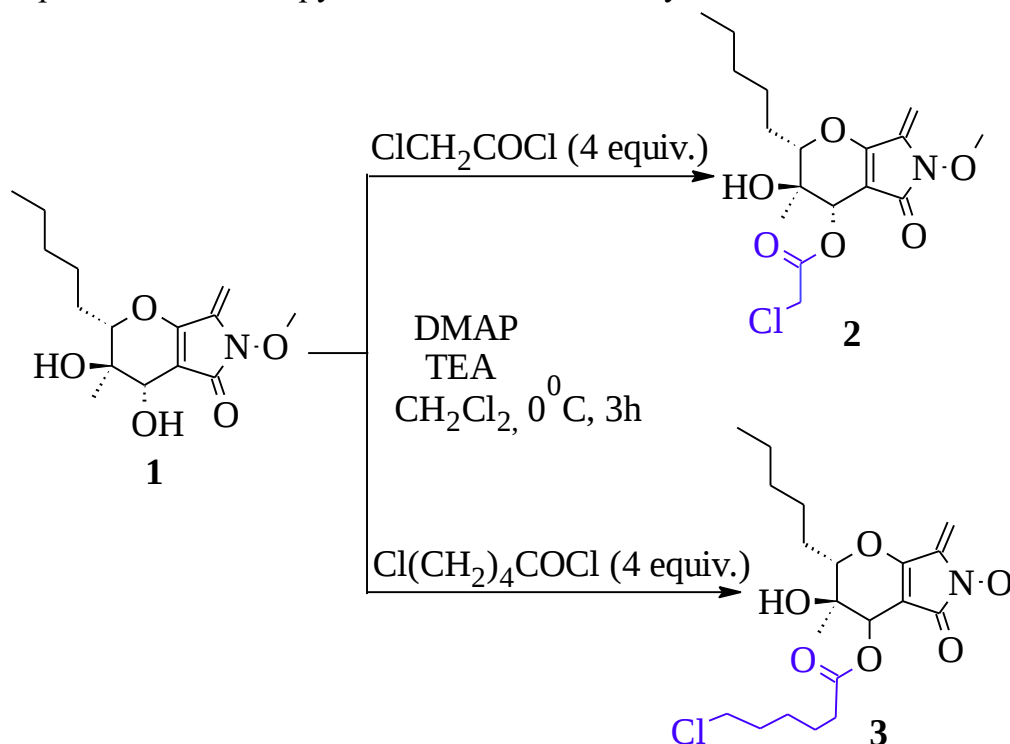


Схема 1 - Синтез 4- ω -хлорацетоксипроизводных РРА 2 и 3

Строение ранее описанного соединения 2, выделенного нами с выходом 29%, подтверждено совпадением всех спектральных характеристик полученного и заведомого образцов.

Продукт реакции 3 с выходом 38% выделен из реакционной смеси методом колоночной хроматографии (хлористый метилен - метанол 20:1). Его состав и строение подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР 1H , ^{13}C спектроскопии. В спектре ЯМР 1H сигнал с химическим сдвигом δ 2.33-2.62 м.д. соответствуют метиленовым протонам группы $CH_2C(O)$. Протоны метиленовой группы CH_2Cl проявляются мультиплетом δ 3.56 м.д. О введении δ -хлорвалерилоксильной группы к атому C(4) РРА свидетельствует присутствие в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп $C(O)$ (δ 164.43 м.д.) и CH_2Cl (δ 44.55 м.д.).

2 Замещение хлора в 4-хлорацетилоксипроизводном РРА 2 на тиобензогетероциклические группы

2-Меркаптобензоксазол, 2-меркаптобензимидазол и 2-меркаптобензотиазол являются известными строительными блоками при получении лекарственных субстанций, в том числе обладающих противораковой активностью. Введение тиобензогетероазольных фрагментов в молекулу РРА осуществлено нами взаимодействием 4-хлорацетоксильного производного РРА 2 с указанными 2-меркаптобензогетероциклическими соединениями. Наличие в их составе кроме атома азота еще одного гетероатома (азота, серы или кислорода) в кольце позволяло оценить влияние природы гетероциклического заместителя на биологическую активность производных РРА. Реакции замещения хлора в соединении 2 проводили в растворе ацетонитрила в присутствии карбоната калия, который необходим для смещения тион-тиольного таутомерного равновесия и повышения нуклеофильности тиольной формы путем превращения группы SH в SK, а также для нейтрализации образующегося хлористого водорода, и иодистого натрия, который за счет обмена хлора в хлорацетоксильном радикале на иод ускоряет реакцию и препятствует образованию побочных продуктов с дисульфидной связью (схема 2).

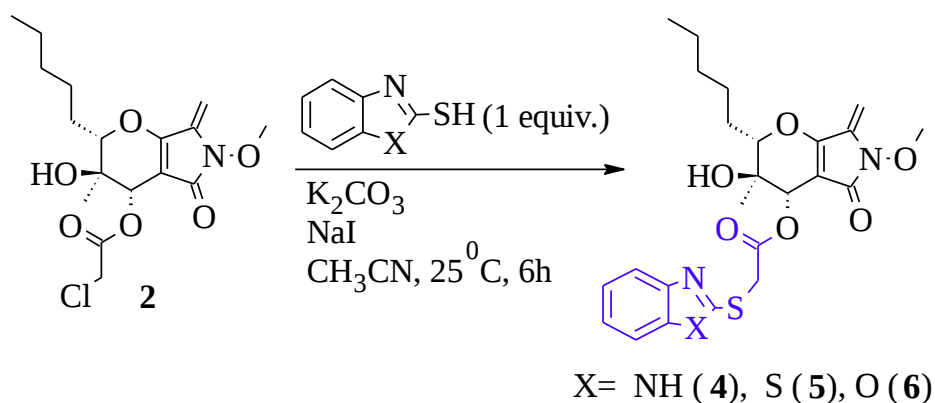


Схема 2 - Синтез производных РРА 4-6, содержащих тиобензогетероциклическую группировку

Полученные соединения 4-6 выделены в чистом виде методом препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования с выходами от 25 до 40%. Их состав и строение подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК, ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии. В спектрах ЯМР ^1H отсутствуют сигналы группы CH_2Cl (δ 4.42 и 4.51 м.д.) исходного соединения 2, присутствуют сигналы протонов введенных групп S- CH_2 (δ 3.86-4.20 м.д.) и гетероциклического фрагмента (δ 7.20-7.60 м.д.). О введении тиобензогетероциклической группы вместо атома хлора свидетельствует также наличие в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп C(O) (δ 164.5-165.0 м.д.) и S CH_2 (δ 64.62-64.74 м.д.) при отсутствии сигнала группы CH_2Cl (δ 44.55 м.д.).

3 Замещение хлора в 4-хлорацетилоксипроизводном РРА 2 на циклогетерилсульфидные группы

Введение S-азагетероциклических фрагментов в молекулу РРА осуществлено нами по той же методике, как и в случае S-бензогетероциклических производных 4-6. В качестве исходных азотсодержащих гетероциклических тиолов использованы пяти- и шестичленные циклические тиолы, содержащие в гетероцикле различное количество атомов азота и относящиеся к известным фармакофорным группировкам (ди-, три- и тетразольные, пиридиновые и пиримидиновые кольца) (схема 3).

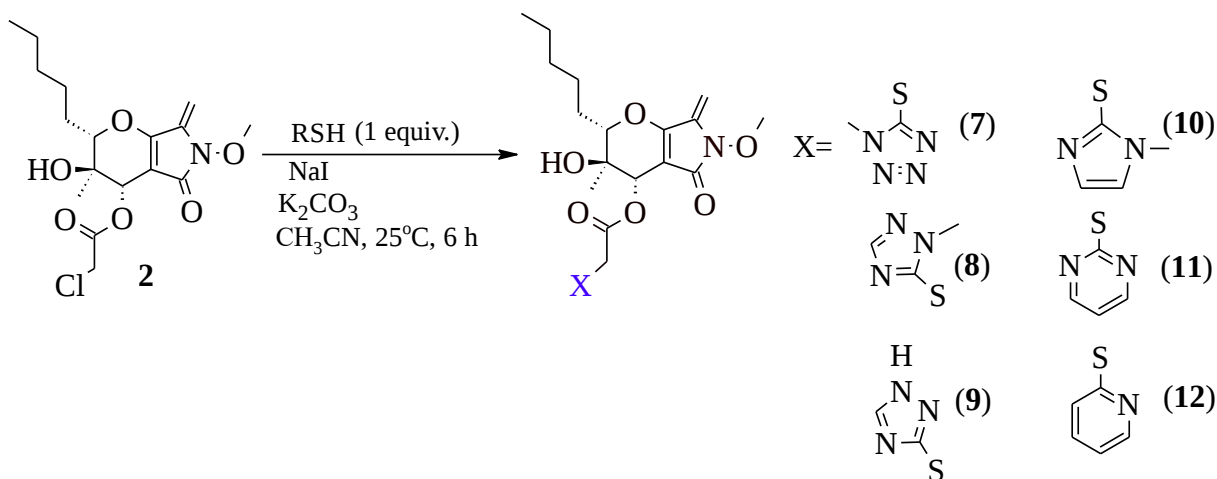


Схема 3 - Синтез производных РРА 7-12 взаимодействием соединения 2 с азотсодержащими циклическими тиолами

Производные РРА 7-12 выделены методом колоночной хроматографии (хлористый метилен - метанол 100:1) с выходами 12-18%. Их состав и строение подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ¹H, ¹³C спектроскопии. В спектрах ЯМР ¹H присутствуют сигналы протонов группы SCH₂ (δ 4.06-4.10 м.д.) и протонов гетероцикла. О наличии S-азагетероциклических фрагментов свидетельствует присутствие в спектрах ЯМР ¹³C сигналов соответствующих атомов углерода, в частности группы S-CH₂ (δ 64.5-64.8 м.д.).

4 Синтез 4-аминопроизводных РРА через 4-мезилатное производное РРА

Для введения аминогрупп в положение 4 бициклического каркаса РРА нами предложен и реализован двухстадийный путь (схема 4), включающий первоначальное получение метансульфонатного производного РРА 14 взаимодействием РРА с метансульфохлоридом с последующим замещением хорошо уходящей мезилатной группы при действии избытка амина. Процесс осуществляли без выделения в индивидуальном виде соединения 14. Ранее 4-пирролидиновое производное РРА 13, которое обнаружило высокую противоопухолевую активность на нескольких линиях раковых клеток, было получено с неприемлемо низким выходом (12%) путем замещения хлорацетоксильной группы соединения 2 (схема 4).

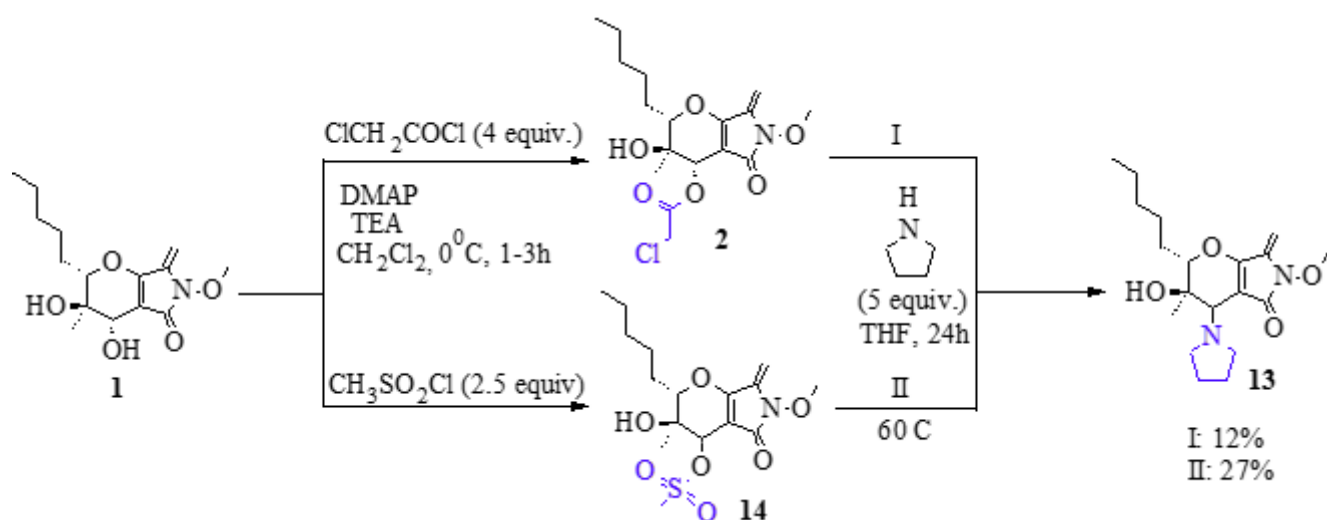


Схема 4 - Синтез 4-пирролидинового производного РРА **13**

При получении целевого продукта - 3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-4-пирролидин-1-ил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **13** - по предложенному нами способу его содержание в реакционной смеси по данным ЯМР ^1H спектроскопии составляло около 70%. В результате очистки методом препаративной ВЭЖХ соединение **13** получено в чистом виде с выходом 27% и идентифицировано с помощью ИК, ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии.

Двухстадийный «мезилатный» путь успешно распространен нами на другие амины как циклического, так и открытого строения. Целесообразность расширения круга 4-N-аминозамещенных РРА обусловлена необходимостью оценить влияние строения аминогруппы на противоопухолевую активность таких соединений.

Так, в реакциях 4-метансульфонатного производного РРА **14** с циклическими вторичными аминами - пирролидинпиперидином и 4-гидроксипиперидином, выход целевых продуктов **15** и **16**, выделенных методом препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования, составил 11 и 16% соответственно (схема 5).

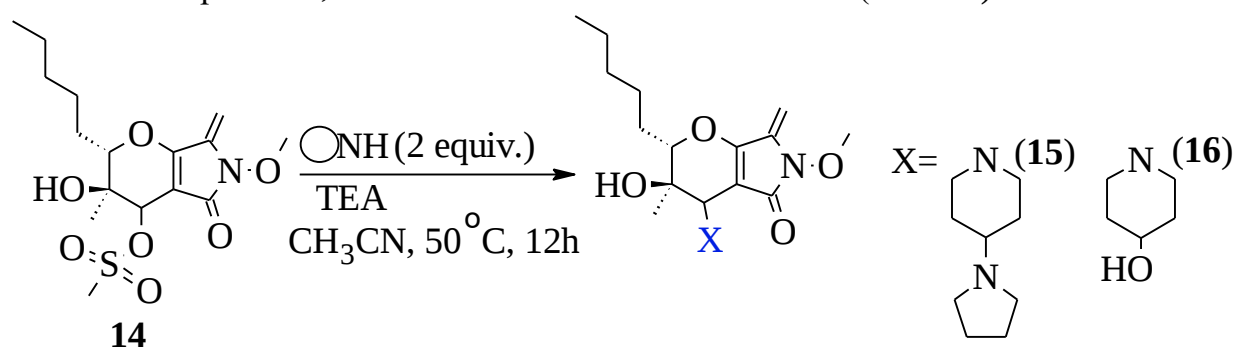


Схема 5 - Получение 4-циклогетериламинопроизводных РРА **15** и **16**

Состав и строение соединений **15**, **16** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии. Так, в спектре ЯМР ^{13}C о присутствии пирролидинпиперидильной группы в соединении **15** свидетельствуют сигналы атомов углерода групп N-CH (δ 55.67 м.д.) и N-C (δ 62.51 м.д.), а 4-гидроксипиперидиновой группы в соединении **16** - сигналы атомов углерода групп N-

CH (δ 62.45 м.д.) и CH-O (δ 68.20 м.д.). В соответствии с данными корреляционной (ROESY) спектроскопии у хирального атома C(4) происходит обращение конфигурации.

В качестве вторичных алифатических аминов для замещения группы CH_3SO_3 в соединении **14** нами использованы диметиламин и диэтиламин (схема 7). Диметил- и диэтиламиногруппы часто присутствуют в составе биологически активных веществ, а диэтиламин, кроме того, можно представить как C-C раскрытый пирролидиновый цикл, наличие которого в производном РРА **13** обеспечивало заметно более высокую противоопухолевую активность по сравнению с исходным РРА. В условиях, аналогичных замещению метансульфонатной группы циклическими вторичными аминами, получены производные РРА **17** и **18**, которые выделены в индивидуальном виде методом препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования с выходами 20 и 43% соответственно. Состав и строение соединений **17** и **18** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии. В спектре ЯМР ^{13}C соединения **17** о введении диметиламиногруппы к атому C(4) РРА свидетельствует присутствие сигналов атомов углерода групп N-CH $_3$ (δ 29.70 м.д.). Наличие диэтиламиновой группы у атома C(4) РРА соединения **18** подтверждается присутствием в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп N-CH $_2$ (δ 60.04 м.д.).

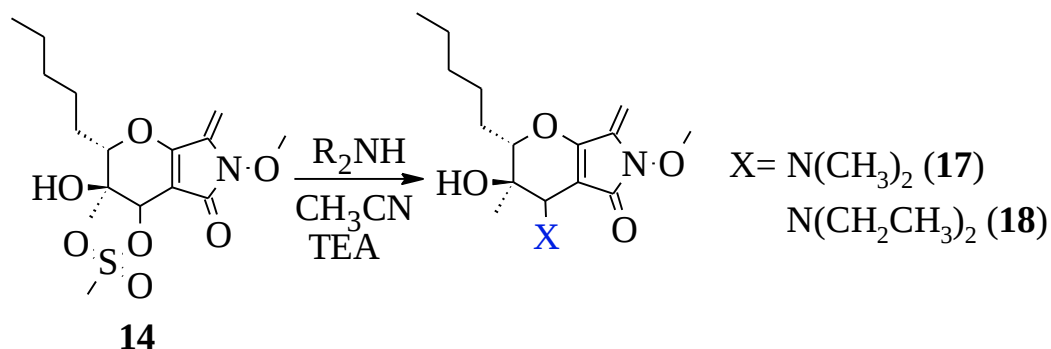


Схема 6 - Получение 4-диалкиламинопроизводных РРА **17** и **18**

В реакциях метансульфонатного производного РРА **14** с менее основными первичными аминами нами не отмечено существенных отличий от реакций с участием вторичных аминов. В качестве первичных аминов использованы метиламин, 2-аминоэтанол, 4-амино-1-бутанол, аллиламин, бензиламин, отличающиеся основностью и строением радикала, с которым связана группа NH_2 . Экспериментальные условия проведения реакций метансульфонатного производного РРА **14** с указанными аминами аналогичны тем, в которых осуществлялось взаимодействие со вторичными аминами: избыток амина, растворитель ТГФ, температура процесса 60°C, время реакции 12 часов. В результате получены соединения **19-23** (схема 7), которые выделены в чистом виде методом препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования с выходами 14-25%.

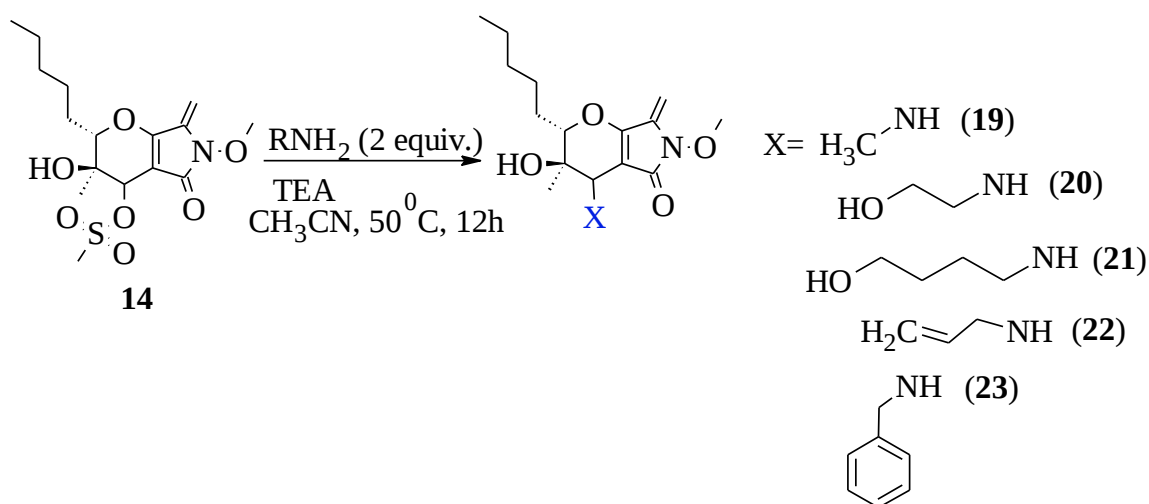


Схема 7 - Получение 4-аминопроизводных РРА **19-23** взаимодействием мезилатного производного **14** с первичными аминами

Состав и строение производных **19-23** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии. Например, в спектре ЯМР ^1H соединений **19-23** сигнал с химическим сдвигом δ 3.27-3.12 м.д. соответствует протону группы NH.

5 Взаимодействие феоcферида A с диэтиламиносератрифторидом (DAST)

Введение атома фтора в органические молекулы, в том числе природного происхождения, относится к числу важных подходов к синтезу биологически активных веществ. Для введения фтора в положение C(4) РРА нами использован DAST как эффективный и достаточно доступный фторирующий реагент. Проведение реакции при низких температурах позволяет селективно заместить только гидроксильную группу, не затрагивая при этом другие реакционноспособные функциональные группы.

Реакцию РРА **1** с DAST осуществляли в растворе хлористого метилена при 0°C в течение 1 часа. Получили (2S,3R,4R)-4-фтор-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-он **24** (схема 8), который в чистом виде выделен методом колоночной хроматографии (хлористый метилден - метанол 20:1) с выходом 64%.

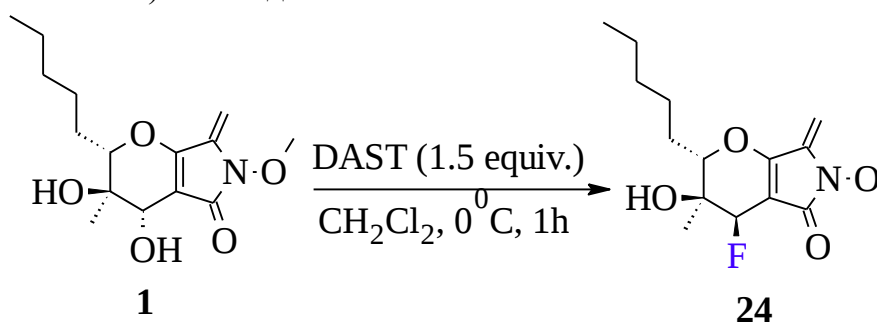


Схема 8 - Фторирование РРА **1** с помощью DAST

Состав и строение соединения **24** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F , корреляционной (ROESY) спектроскопии. Так, в спектре ЯМР ^{19}F химический сдвиг атома фтора δ_{F} -166.42 м.д. является типичным для группы CHF. В спектре ROESY (рисунок 2) наблюдается кросс-пик между протонами метильной группы C(3) с δ 1.07 и метиновым протоном при C(4) с δ 4.90 м.д., что свидетельствует об изменении конфигурации атома C(4). Однако определить, по какому механизму ($\text{S}_{\text{N}}1$ или $\text{S}_{\text{N}}2$) это произошло, достоверно невозможно. Однозначно это могло осуществиться при $\text{S}_{\text{N}}2$ механизме, но и при $\text{S}_{\text{N}}1$ промежуточно возникающий карбкатион мог предпочтительнее атаковываться с одной стороны, противоположной расположению метильной группы при атоме C(3), которая пространственно препятствует этой атаке.

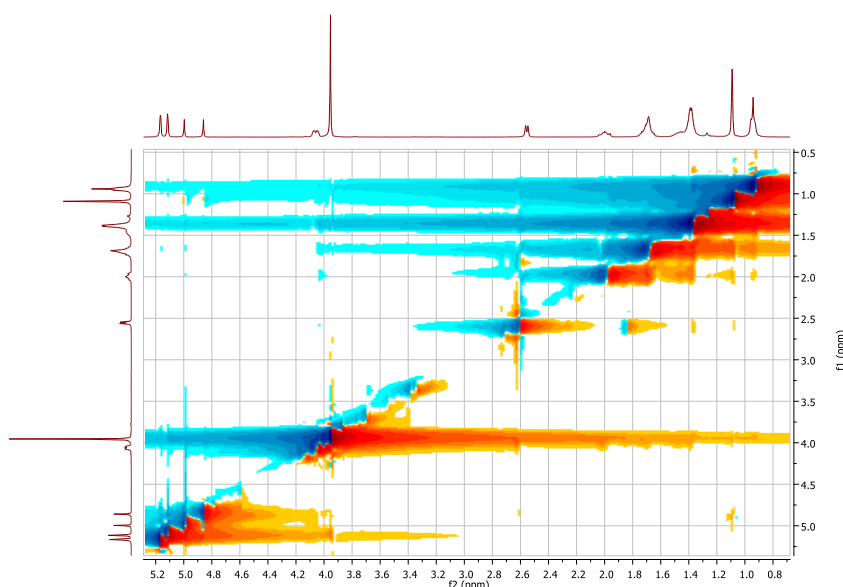


Рисунок 2 - Спектр ROESY соединения 24

6 Оценка цитотоксичности полученных соединений

Противоопухолевая активность всех синтезированных соединений (рисунок 3) оценена *in vitro* методом колориметрического тестирования метаболической активности клеток при использовании красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромида на 10 клеточных линиях (таблица 1): HCT-116, PC3, MCF-7, A549, ФЭЧ, K562, NCI-H929, Jurkat, THP-1, RPMI8228. В качестве положительного контроля использовали применяемое в медицинской практике вещество – этопозид.

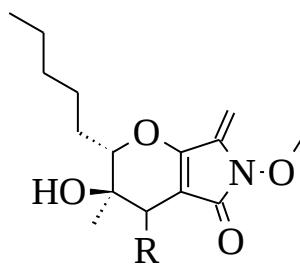


Рисунок 3 – 4-Замещенные РРА 2-13, 15-24

Установлено, что все соединения проявляют заметную цитотоксическую активность, как правило, превосходящую активность РРА (таблица 1). Во многих случаях это превосходство весьма существенно.

К веществам-лидерам следует отнести соединения **5**, **13** и **17**.

Соединение **5**, содержащие у атома C(4) 1,3-бензотиазол-2-илтиоацетоксильную группу, единственное из всех исследованных оказывает заметное цитотоксическое действие на клеточной линии NCI-H929 и может быть отнесено к монотаргетным. Особенно следует отметить, что высокая цитотоксичность проявляется на клетках множественной миеломы, которая на сегодняшний день является неизлечимым заболеванием. 4-Пирролидиновое и 4-диметиламиновое производные РРА **13** и **17** обнаружили на 6 линиях раковых клеток активность, заметно превосходящую активность контрольного этопозиды,

Суммируя данные таблицы 1, можно сделать вывод, что наиболее высокую цитотоксическую активность по сравнению с цитотоксичностью исходного РРА проявляют его производные, содержащие у атома C(4) аминогруппы открытого и циклического строения. Соединения **13** и **17** как обладающие наиболее высокими противоопухолевыми эффектами исследованы на острую токсичность при внутривенном и пероральном введениях на белых беспородных мышах. При этом установлено, что соединение **13** имеет LD₅₀ 126 мг/кг, а соединение **17** - 33 мг/кг (этопозид - 64 мг/кг), то есть они характеризуются как вещества с низкой острой токсичностью, относящиеся к третьему классу опасности (умеренно опасные вещества).

Производные РРА **5**, **13** и **17** при исследовании множественной лекарственной устойчивости в сравнении с применяемыми на практике этопозидом, доксорубицином и бартезомибом показали сравнимые или превосходящие характеристики.

Таблица 1 - Значение IC₅₀ синтезированных производных РРА на адгезионных и суспензионных культурах опухолевых клеточных линий эпителиального происхождения

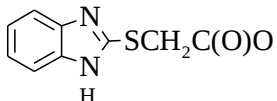
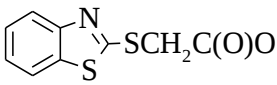
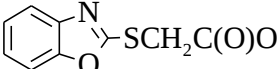
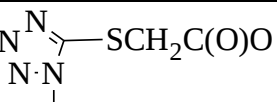
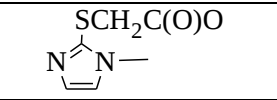
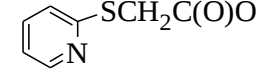
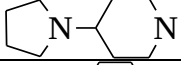
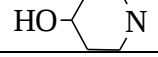
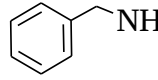
R	Вещества	Адгезивные культуры клеток, IC ₅₀ (мкМ)						Суспензионные культуры клеток, IC ₅₀ (мкМ)				
		HTC-116	MCF-7	PC3	A549	ФЭЧ	HEK293	NCI-H929	THP-1	K562	RPMI8226	Jurkat
ОН	1, РРА	44.0	32.0	20.0	41.0	19.0	-	20.0	6.5	10.0	19.0	9.6
ClCH ₂ C(O)O	2	3.3	17.0	2.4	20.0	9.1	-	3.3	11.0	7.0	9.7	9.6
ClCH ₂ (CH ₂) ₃ C(O)O	3	3.9	5.4	9.2	12.0	11.0	-	2.5	4.6	8.5	4.3	4.2
	4	8.2	3.9	6.4	19.0	11.0	-	2.0	5.3	9.3	4.3	8.9
	5	4.7	16.0	5.0	5.9	11.0	-	0.4	1.6	4.3	2.0	2.3
	6	4.9	3.9	5.8	20.0	9.3	-	4.5	2.3	4.5	5.1	2.6
	7	8.0	20.0	4.9	15.0	-	7.4	4.7	1.0	1.9	1.9	3.2
	8	9.5	16.0	4.7	37.0	-	4.2	9.5	1.7	3.6	4.2	3.3
	9	7.6	9.8	3.4	19.0	-	6.7	7.8	0.9	1.8	3.5	2.2
	10	6.9	16.0	6.1	20.0	-	10.0	13.0	1.9	2.1	4.7	4.1
	11	7.4	10.0	3.7	26.0	-	6.2	4.3	1.0	1.8	1.9	2.1
	12	7.0	10.0	6.0	15.0	-	7.6	8.2	1.1	1.7	3.9	4.5

Таблица 1 (продолжение)

R	Вещества	Адгезивные культуры клеток, IC ₅₀ (мкМ)						Суспензионные культуры клеток, IC ₅₀ (мкМ)				
		HTC-116	MCF-7	PC3	A549	ФЭЧ	HEK293	NCI-H929	THP-1	K562	RPMI8226	Jurkat
	13	0.5	0.2	4.8	10.0	4.0	-	0.5	0.2	0.8	2.2	0.3
	15	4.3	3.2	2.3	12.0	22.0	-	6.4	3.2	1.0	4.9	10.0
	16	2.6	4.3	3.5	9.4	6.7	-	3.2	1.9	1.8	1.9	1.6
(CH ₃) ₂ N	17	4.2	3.0	5.9	9.6	-	9.4	0.5	0.9	2.4	1.6	1.1
(CH ₃ CH ₂) ₂ N	18	22.0	2.5	3.6	23.0	-	-	3.9	1.0	1.9	2.3	1.7
CH ₃ NH	19	4.0	4.8	4.6	13.0	22.0	-	1.9	0.6	1.9	2.4	3.2
HO(CH ₂) ₂ NH	20	4.6	4.5	3.9	15.0	16.0	-	17.0	2.3	17.0	1.9	2.8
HO(CH ₂) ₄ NH	21	4.9	5.6	5.3	11.0	15.0	-	3.8	2.1	1.9	2.2	2.5
H ₂ C=CHNH	22	8.4	6.3	4.1	13.0	5.0	-	10.0	2.3	3.2	3.3	6.0
	23	13.0	25.0	36.0	38.0	53.0	-	14.0	7.7	10.0	15.0	16.0
F	24	31.0	12.0	37.0	42.0	37.0	-	18.0	3.9	15.0	19.0	16.0
-	Этопозид	22.0	2.7	9.6	>100.0	>100.0	-	4.5	0.9	1.4	1.0	4.8

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны методики введения разнообразных фармакофорных группировок к атому С(4) молекулы природного феосфериды А (РРА), с применением которых синтезирован представительный ряд (20 веществ) новых производных РРА - потенциальных противораковых субстанций.
2. При действии хлорацетил- и δ -хлорвалерилхлоридов в присутствии диметиламинопиридина и триэтиламина осуществлено селективное С(4)-ацилирование РРА.
3. Путем взаимодействия меркаптогетероциклических соединений с хлорацетилоксипроизводным РРА в присутствии поташа и иодида натрия получены продукты замещения хлора на тиогетероциклические группировки.
4. Предложен и реализован метод синтеза С(4)-аминопроизводных РРА при действии первичных и вторичных (в том числе циклических) аминов на промежуточно получаемое 4-метансульфонатное производное РРА.
5. В результате реакции РРА с диэтиламиносульфотрифторидом получено 4-фторпроизводное РРА, при этом установлено, что фторирование РРА протекает как замещение гидроксильной группы при атоме С(4) с изменением конфигурации этого хирального атома.
6. Экспериментально определена цитотоксическая активность полученных С(4)-производных РРА на 10 линиях раковых клеток. Установлено, что все соединения проявляют заметную противоопухолевую активность. Наибольшим цитотоксическим эффектом, низкой острой токсичностью и эффективным преодолением лекарственной устойчивости обладают производные РРА **13** и **17**, имеющие у атома С(4) пирролидиновую или диметиламиновую группировки.
7. Определена зависимость противоопухолевой активности синтезированных производных РРА от состава и строения фармакофорных группировок, введенных в молекулу исходного природного соединения. Наиболее высокую цитотоксическую активность по сравнению с цитотоксичностью исходного РРА проявляют его производные, содержащие у атома С(4) аминогруппы открытого и циклического строения.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях

Статьи:

1. Abzianidze, V. V. Synthesis and Biological Evaluation of Phaeosphaeride A Derivatives as Antitumor Agents / V. V. Abzianidze, P. P. Beltyukov, S.A. Zakharenkova, N. I. Moiseeva, J. Mejia, A. Holder, Yu. G. Trishin, A. O. Berestetskiy, V. A. Kuznetsov // *Molecules*. – 2018.- V. 23, № 11. - P. 3043–3051.
2. Abzianidze, V. V. Towards lead compounds as anti-cancer agents via new phaeosphaeride A derivatives / V. V. Abzianidze, S.A. Zakharenkova, N. I. Moiseeva, P. P. Beltyukov, V. A. Polukeev, Y. A. Dubrovskii, V. A. Kuznetsov, Yu. G. Trishin, J. E. Mejia, A. A. Holder // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. - V. 29, № 1. - P. 59–61.
3. Zakharenkova, S.A. Antitumor activity of phaeosphaeride A modified with nitrogen heterocyclic groups / S. A. Zakharenkova, V. V. Abzianidze, N. I. Moiseeva, D. S. Lukina, L. S. Chisty, D. V. Krivorotov, Yu. G. Trishin // *Mendeleev Communications*. – 2021. – V. 31, № 5. – P. 662 - 663.

Тезисы докладов:

1. Захаренкова, С.А. Новые производные природного феосферид а и их биологический скрининг на 10 клеточных линиях / С.А. Захаренкова, В.В. Абзианидзе, Ю.Г. Тришин, В.А. Кузнецов // VIII научно-техническая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, в рамках мероприятий, посвященных 190-летию со дня основания Технологического института (с международным участием). «Неделя науки-2018», Санкт-Петербург 2 – 5 апреля 2018 г.: сборник тез. – СПб, 2018. – С. 209.
2. Захаренкова, С.А. Функциональные с-6 производные природного феосферид а: синтез и цитотоксическая активность / С.А. Захаренкова, В.В. Абзианидзе, В.А. Кузнецов, Ю.Г. Тришин // III Всероссийская научная конференция молодых ученых "Медико – биологические аспекты химической безопасности", Санкт-Петербург 5-7 сентября 2018 г.: сборник тез. - СПб, 2018. – С. 26 - 27.
3. Абзианидзе, В.В. Природный феосферид А и его производные. Синтез, строение и противораковая активность / В.В. Абзианидзе, С.А. Захаренкова, П. П. Бельтюков, В. А. Кузнецов, Ю. Г. Тришин // Четвёртый Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике, Новый Свет, Крым 23-26 сентября 2018 г.: сборник тез. – М.: «Перо», 2018. – С. 28.
4. Zakharenkova, S. New C (6) -derivatives of the natural phaeosphaeride A / S. Zakharenkova, D. Lukina, V. Abzianidze, V. Kuznetsov, Yu. Trishin // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants «MedChem- 2019», Ekaterinburg 10-14 June 2019: Abstract book. - Ekaterinburg, 2019. – P. 306.
5. Zakharenkova, S.A. New derivatives of the natural phaeosphaeride A / S.A. Zakharenkova, D.S. Lukina, V.V. Abzianidze, V.A. Kuznetsov // XXI Mendeleev Congress on General and

Applied Chemistry, Saint Petersburg, 9-13 September 2019: Abstracts, Book 5. – Saint Petersburg, 2019. – P. 262.

6. Лукина, Д.С. С(6)-ацилоксимеркаптоазагетероциклические производные природного феосферида А / Д.С. Лукина, С.А. Захаренкова, В.В. Абзианидзе, В.А. Кузнецов, Ю.Г. Тришин // IV Всероссийская научная конференция молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности», Санкт-Петербург 16-18 сентября 2020 г.: сборник тез. - Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. СПб, 2020. – N. 34.

7. Захаренкова, С.А. С(6)-ацилоксимеркаптоазагетероциклические производные природного феосферида А: синтез и биологическая активность / С. А. Захаренкова, Д. С. Лукина, В. В. Абзианидзе, К. А. Полушкина, П. П. Бельтюков, Ю. Г. Тришин // Международная научная конференция «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии», Екатеринбург 18–21 ноября 2020 г.: сборник тез. – АМБ, 2020. – С.216-217.

8. Suponina, D.S. Synthesis and antitumor activity of dialkylamine derivatives of natural phaeosphaeride A / D.S. Suponina, S.A. Zakharenkova, V.V. Abzianidze, N.I. Moiseeva, D.V. Krivorotov, Yu.G. Trishin // The XII International conference on chemistry for young scientists, Saint Petersburg, 6-10 September 2021: Abstracts, Book. – Saint Petersburg, 2021. – P.650.

Патент РФ

1. Пат. 2748533 Рос. Федерация, МПК C07D 491/052, A61K 31/407, A61K 31/4523, A61K 31/5377, A61P 35/00. Новые производные феосферида, обладающие противоопухолевой активностью, способ получения и применение этих соединений [Текст] / Абзианидзе В. В., Бельтюков П. П., Захаренкова С. А., Кузнецов В. А., Лукина Д. С., Уколов А. И., Криворотов Д. В., Радилов А. С.; заявитель и патентообладатель ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России. – № 2018134127, заявл. 27.09.2018; опубл. 26.05.2021, Бюл. № 15. – 18 с.