

Федеральное государственное унитарное предприятие
"Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии
человека" Федерального медико-биологического агентства

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель
доктор химических наук,
профессор Тришин Юрий Георгиевич

Санкт-Петербург - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И НАПРАВЛЕНИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ВЕЩЕСТВ	
(литературный обзор)	10
1.1 Природные соединения как лекарственные средства	11
1.2 Природные противоопухолевые соединения	16
1.3 Полусинтетические и синтетические противоопухолевые препараты	21
1.4 Основные подходы к синтезу биологически активных веществ (БАВ)....	27
1.5 Связь между строением вещества и его биологической активностью.....	35
1.5.1 Влияние алкильных групп.....	37
1.5.2 Влияние гидроксильных групп.....	38
1.5.3 Эффект галогенов в органических соединениях	39
1.5.4 Влияние азотсодержащих групп.....	43
1.5.5 Влияние гетероциклического фрагмента	44
ГЛАВА 2 ВВЕДЕНИЕ ФАРМАКОФОРНЫХ ГРУППИРОВОК В МОЛЕКУЛУ ПРИРОДНОГО ФЕОСФЕРИДА А КАК ПУТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ (обсуждение результатов)	46
2.1 Ацилирование РРА с участием группы ОН у атома С(4) хлорангидридами ω-хлоркарбоновых кислот.....	50
2.2 Замещение хлора в 4-хлорхлорацетилпроизводном РРА 2.4 на тиобензогетероциклические группы	53
2.2.1 Замещение хлора в 4-хлорхлорацетилпроизводном РРА 2.4 на циклогетерилсульфидные группы	57
2.3 Синтез 4-аминопроизводных РРА через 4-метансульфонатное производное РРА.....	63
2.4 Взаимодействие РРА с диэтиламиносератрифторидом (DAST).....	75
2.5 Оценка цитотоксической активности синтезированных соединений	81
2.6 Острая токсичность производных РРА 2.16 и 2.25	84
2.7 Множественная лекарственная устойчивость к производным 2.8, 2.16 и 2.25.....	85
ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	88

3.1 Исходные вещества.....	88
3.1.1 Галогенсодержащие реагенты	88
3.1.2 Гетероциклические тиолы.....	88
3.1.3 Азотсодержащие реагенты.....	88
3.1.4 Прочие реагенты	89
3.1.5 Растворители.....	89
3.2 Синтез производных РРА.....	90
3.2.1 Ацилирование РРА	90
3.2.2 Замещение хлора в хлорацетоксипроизводном РРА 2.4 на тиобензогетероциклические группы	91
3.2.3 Замещение хлора в хлорацетоксипроизводном РРА 2.4 на тиогетероциклические группы.....	93
3.2.4 Синтез 4-аминопроизводных РРА через 4-мезилатное производное РРА.....	96
3.2.5 Замещение мезилатной группы в производном РРА 2.17 на первичные амины.....	97
3.3.6 Замещение мезилатной группы в производном РРА 2.17 вторичными аминами	100
3.3.7 Взаимодействие РРА с диэтиламиносератрифтормидом (DAST).....	102
3.4 Оценка цитотоксической активности	102
3.4.1 Клеточная культура.....	102
3.4.2 Оценка цитотоксичности методом МТТ (3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) - 2,5-дифенилтетразолийбромид))	103
3.5 Исследование множественной лекарственной устойчивости	103
3.5.1 Клеточная культура.....	103
3.5.2 Исследования действия производных РРА на опухолевые клетки с фенотипом множественной лекарственной устойчивости	104
3.6 Оценка острой токсичности при внутрибрюшинном введении.....	105
3.7 Масс-спектрометрия	105
3.8 Спектральные исследования	106
3.9 Определение других физико-химических характеристик	106
3.10 Получение индивидуальных веществ методом препаративной ВЭХЖ	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	107

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное).....	120

ВВЕДЕНИЕ

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 C(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-OCH_3 и экзоциклической связи $\text{C}=\text{C}$, приводят к соединениям с более низкой цитотоксической активностью по сравнению с исходным субстратом.

Цели и задачи: разработка методов введения в положение C(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 C(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 хлорацетилокси-, 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, этопозида. 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 С(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 С(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, доксорубицин, 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 феосферида А и Н.И. Моисеевой (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) за осуществление биологических испытаний.

ГЛАВА 1

**СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И НАПРАВЛЕНИЯ ПОЛУЧЕНИЯ
НОВЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ВЕЩЕСТВ****(литературный обзор)**

Известно, что причиной возникновения рака являются генетические мутации, происходящие под воздействием экзогенных (проистекающих из внешней среды) и эндогенных (возникающие внутри организма человека) факторов. Роль эндогенных факторов (возраст, расовая и этническая принадлежность, семейная предрасположенность, патологии иммунной системы, влияние гормонов) важна, но не так значительно меняется в истории человечества, как экзогенных факторов. В то же время физические (солнечный ультрафиолет, ионизирующее излучение, электромагнитные поля, флуоресцентное освещение), химические (контакт с агрессивными химическими веществами на различных производствах, загрязнение воды, воздуха и почвы веществами-канцерогенами) и биологические факторы (особенности рациона питания, употребление алкоголя, курение табака, инфицирование различными типами вирусов. Бесконтрольное применение ряда лекарственных препаратов и несоблюдение врачебных рекомендаций) с развитием цивилизации способствуют постоянному росту онкологических заболеваний [1-7].

Хотя прогресс в лечении рака совершенно очевиден, это заболевание остается одной из основных причин смертности в мире, относится к числу наиболее дорогостоящих болезней в лечении, что представляет для человечества огромную социально-экономическую проблему. Как известно, для лечения онкологических заболеваний используются хирургические, радиологические и химиотерапевтические методы [6]. Однако, несмотря на широкий спектр имеющихся лекарственных средств, разработка новых, в том числе таргетных, препаратов остается одной из самых важных задач медицинской химии [7]. Особая роль при этом отводится природным соединениям и их полусинтетическим производным, которые часто

превосходят исходные природные соединения с точки зрения клинической эффективности. На фармакологическом рынке представлены производные природных соединений, имеющие терапевтическую значимость в реальной медицинской практике, например, иринотекан **1.1** и этопозид **1.2** (рисунок 1.1) [8].

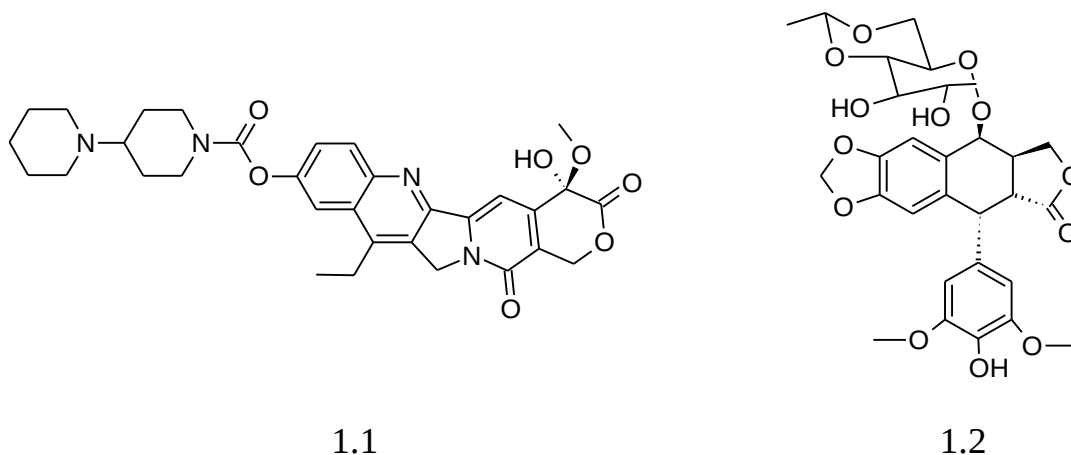


Рисунок 1.1 – Структурные формулы иринотекана **1.1** и этопозид **1.2**

Таким образом, химическая модификация природных соединений для получения новых веществ с заданными свойствами является не просто теоретической концепцией, но также экспериментальной задачей, а в итоге - клинической реальностью [9].

1.1 Природные соединения как лекарственные средства

Лекарства, полученные из природных источников, использовались для лечения различных заболеваний тысячи лет. Первоначально они представляли собой настойки, чаи, припарки, порошки и другие по происхождению и методам получения составы [10, 11].

Например, коренное население бассейна Амазонки, горные народы Папуа-Новой Гвинеи и аборигены Австралии до настоящего времени используют некоторые растения как средства от различных недугов от насморка и кишечных расстройств до массивных ран. История также показывает, что вымершим цивилизациям хорошо были известны лекарственные природные вещества [12]. Так, почти 3000 лет назад индейцы майя использовали грибы, выращенные на зеленой кукурузе, для лечения

кишечных заболеваний [13]. Монахи-бенедиктинцы (800 г. н.э.), следуя примеру древних греков, применяли *Papaver somniferum* как обезболивающее и болеутоляющее средство [14]. В древних текстах описывается более трех тысяч лекарственных растений, употреблявшихся с 2800 г. до новой эры. Современное лекарство, эфедрин, полученное Нагаи Нагаеси в 1885 году экстракцией хвойника двухколоскового, было введено в медицинскую практику в 1920-х годах для остановки кровотечений и как противокашлевое средство. В то же время оно использовалось в Китае в течение 5 тыс. лет в виде неочищенного растительного экстракта "ма хуан" [15].

Использование растений в качестве лекарств в научной медицине начинается в начале 19 века с выделения активных соединений, например, морфина **1.3** из опиума (рисунок 1.2) [16].

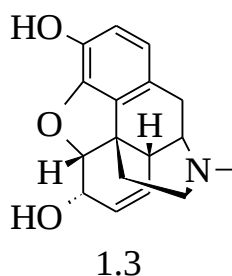


Рисунок 1.2 - Структурная формула морфина **1.3**

Затем из лекарственных растений были выделены такие наркотические средства, как кокаин **1.4**, кодеин **1.5**, дигитоксин **1.6** и хинин **1.7** (рисунок 1.3). Некоторые из них используются в медицинской практике до сих пор [17,18].

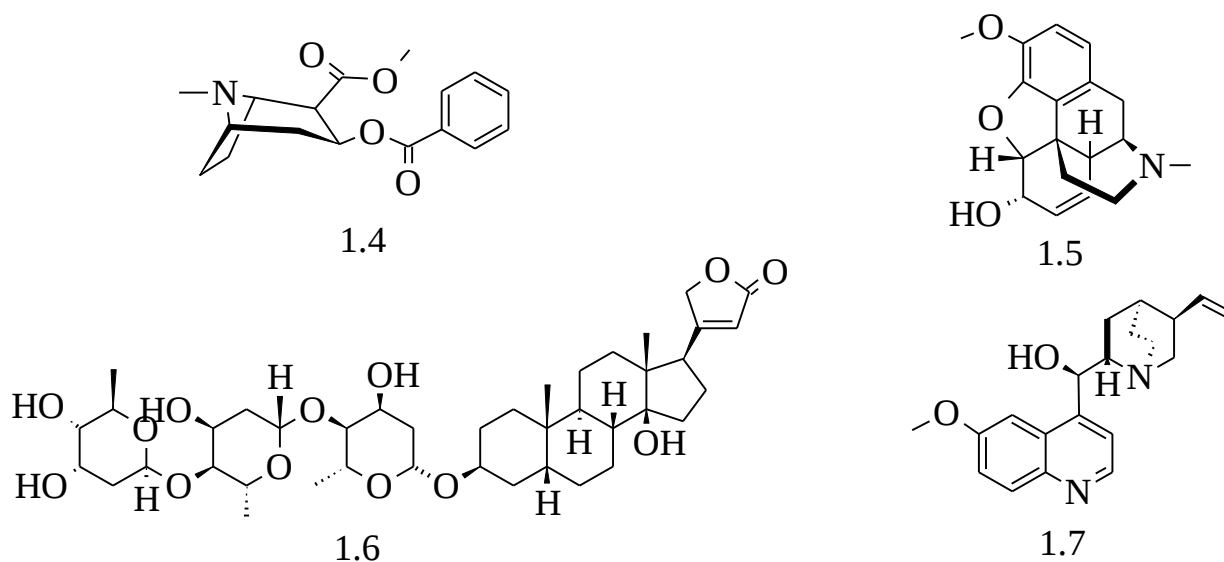


Рисунок 1.3 - Структурные формулы кокаина **1.4**, кодеина **1.5**, дигитоксина **1.6** и хинина **1.7**

Также было установлено [19], что чай, кофе, какао и орехи кола содержат один и тот же алкалоид, кофеин **1.8** (рисунок 1.4), применяемый в составе средств от головной боли, как стимулятор дыхания и сердечной деятельности и др.

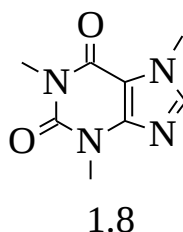


Рисунок 1.4 - Структурная формула кофеина **1.8**

Несмотря на колоссальные достижения синтетической химии и химической технологии, природные соединения имеют важное значение в современной медицине. Эти вещества лежат в основе около 40% рецептурных лекарств. Более 50% новых химических соединений, зарегистрированных FDA в период 1981-2002 годов как противораковые, противомигреневые и гипотензивные агенты являлись природными соединениями или их производными [20]. В период с 1989 г. по 1995 г. 60% одобренных лекарств и новых лекарственных кандидатов относились к веществам природного

происхождения [14]. С 1983 г. по 1994 г. более 60% всех одобренных лекарств в терапии рака представляли собой соединения природного происхождения, как и 78% всех новых одобренных антибактериальных средств [21]. На сегодняшний день представительный ряд препаратов находится на стадии доклинической разработки.

Количество ресурсов в виде растений и микроорганизмов, для промышленного производства лекарственных субстанций ограничено. Однако, химическое разнообразие вторичных метаболитов, производимых природой поразительно [22].

Исследователи обратили на них внимание, благодаря их мощной терапевтической эффективности, минимальным побочным эффектам, а также экономической целесообразности производства. Природные соединения растительного происхождения менее токсичны для нормальных клеток и лучше переносятся организмом [23]. Терапевтическая эффективность растений зависит от наличия в их составе алкалоидов, флавоноидов, полифенолов, сапонинов, терпеноидов, стероидов, гликозидов, дубильных веществ, эфирных масел и других компонентов. Растения и травы обладают антиоксидантными, противовирусными, противораковыми, антимикробными, противогрибковыми и противопаразитарными фармакологическими свойствами [24]. В настоящее время больше 60% используемых противораковых агентов получают из природных источников, таких как растения, морские организмы и микроорганизмы. Противоопухолевая активность большинства природных соединений часто проявляется через регулируемую иммунную функцию, вызывая апоптоз, аутофагию и ингибирование пролиферации клеток [25].

В прошлом веке научный прогресс позволил выделить природные соединения из растений и других источников, определить структуру и состав ключевых активных компонентов. Благодаря этому ряд природных соединений стал доступен в чистом виде в качестве лекарственных средств. К

числу таких веществ прежде всего относятся морфин **1.2**, кокаин **1.4**, хинин **1.7**, резерпин **1.9** и эфедрин **1.10** (рисунки 1.2, 1.3, 1.5) [26].

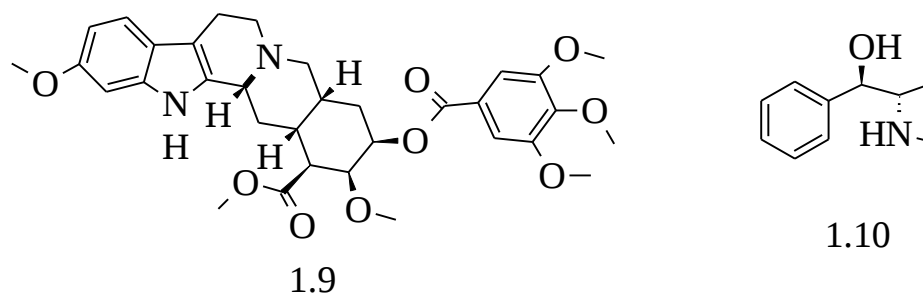


Рисунок 1.5 - Структурные формулы резерпина **1.9** и эфедрина **1.10**

Затем арсенал лекарственных средств на основе природных соединений был значительно расширен добавлением вторичных метаболитов микробного происхождения [27-29].

Представление Пастера о том, что процесс брожения вызван живыми организмами стимулировал исследования микробов как источника биоактивных природных соединений. Это привело Флеминга и Чейна к открытию антибиотиков, сначала пенициллина G **1.11** (рисунок 1.6) из гриба *Penicillium notatum*, а затем тетрациклинов и других классов антибиотиков [30-32]. Открытие этих антибактериальных средств считается одними из самых значимых прорывов в истории медицины.

Грибной метаболит, ловастатин **1.12** (рисунок 1.6), способен ингибировать биосинтез холестерина, благодаря чему он применяется под коммерческим названием Мевакор для лечения заболеваний сердечнососудистой системы [33, 34].

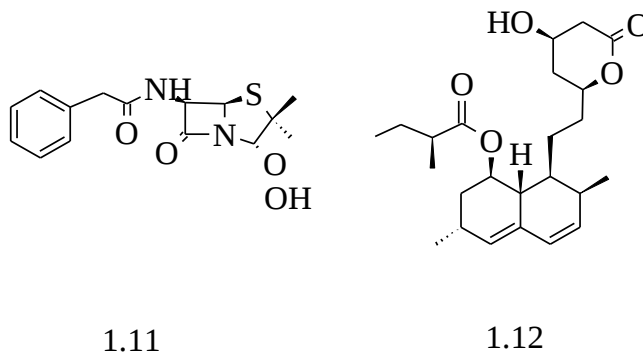


Рисунок 1.6 - Структурные формулы пенициллина **1.11** и ловастатина

1.2 Природные противоопухолевые соединения

Поиск природных соединений как потенциальных противоопухолевых агентов восходит к папирусу Эберса 1550 г. до н.э. [35].

Но поиск противораковых средств из растительных источников всерьез начался в 1950-х годах с открытия и разработки алкалоидов барвинка, винбластина и винкристина и выделения цитотоксических подофиллотоксинов [36].

В результате Национальный институт рака США (NCI) в 1960 году инициировал обширную программу сбора растений в основном в регионах с умеренным климатом. Это привело к открытию многих новых хемотипов, обладающих широким диапазоном цитотоксической активности [37].

Их разработка в клинически активные агенты продолжалась на протяжении 30 лет с начала 1960-х по 1990-е годы. Программа сбора растений была прекращена в 1982 году, но в 1986 г. развитие новых технологий скрининга привело к возрождению составления коллекций растений и других организмов тропического и субтропического регионов мира.

Природные соединения из морских источников также находят все большее применение при лечении заболеваний человека, особенно в качестве противораковых агентов [38].

Так, эктеинасцидин 743 (ЕТ 743) **1.13** (рисунок 1.7), алкалоид, выделенный из морских асцидий, продается как препарат Йонделис и используется клинически для лечения липосаркомы или лейомиосаркомы [39].

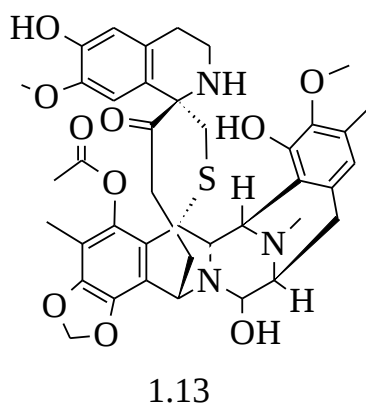


Рисунок 1.7 - Структурная формула эктеинасцидина 1.13

Были найдены природные соединения микробного происхождения для использования в онкологии. Митомицин С **1.14** и даунорубицин **1.15** (рисунок 1.8) применяются клинически до сих пор для лечения ряда раковых заболеваний [16, 40, 41].

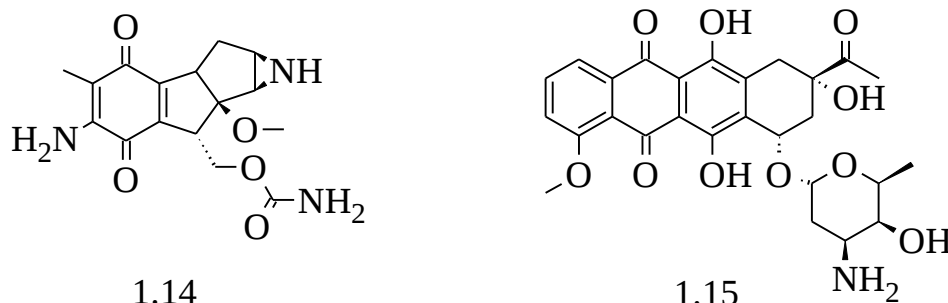


Рисунок 1.8 - Структурные формулы митомицина С **1.14** и даунорубицина **1.15**

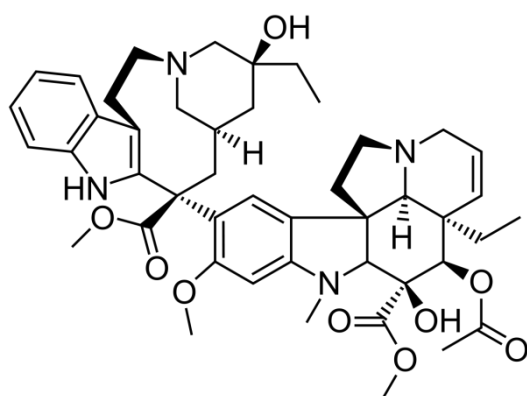
Получение противоопухолевых препаратов из природных соединений начинается с тестирования неочищенных экстрактов *in vitro* на цитотоксичность в отношении раковых клеток, при этом важно, чтобы они не затрагивали здоровые клетки. Затем положительные результаты подтверждают *in vivo*, а далее следуют клинические испытания [4]. Если у неочищенного экстракта подтверждается цитотоксичность по отношению к линиям раковых клеток, осуществляют фракционирование экстракта. После биологического испытания каждую фракцию очищают до индивидуального биологически активного соединения, которое затем становится противораковым лекарственным средством.

Таким образом, основной целью исследователей в обсуждаемой области научной деятельности является доведение биоактивных природных соединений и их аналогов до фазы химиотерапевтических агентов [42].

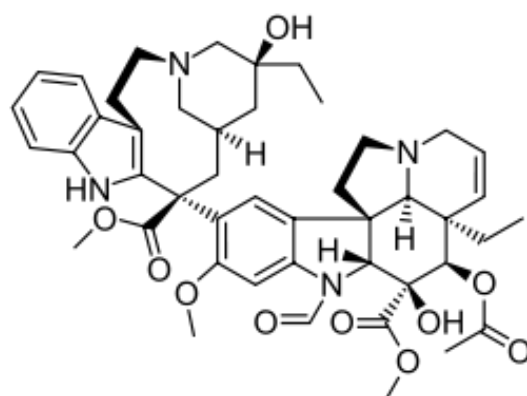
Противоопухолевыми препаратами растительного происхождения являются соединения различных классов, полученные из растений. В настоящее время они доступны для клинического использования и обладают разнообразным механизмом действия. Утвержденными растительными онкологическими химиотерапевтическими агентами являются алкалоиды

барвинка, лигнаны эпиподофиллотоксина, дитерпеноиды таксана и алкалоидные производные камптотецина и хинолина. Установлено, что соединения этих классов действуют на две важные биохимические мишени: тубулин и топоизомеразу.

Бисиндольные алкалоиды барвинка, винбластин **1.16** и винкрестин **1.17** (рисунок 1.9), являются первыми значимыми противораковыми алкалоидами, которые использовались в клинической практике для химиотерапии ряда гематологических и твердых опухолей на протяжении многих лет. Винбластин и винкрестин выделены из *Catharanthus roseus* G. Don. (Аросynaceae), который применялся разными народами для лечения диабета [16]. Экстракты, содержащие винбластин и винкрестин, снижают количество лейкоцитов и проявляют активность против лимфолейкоза у мышей. Принцип действия этих алкалоидов заключается в задержке клеток в метафазе из-за того, что они тормозят сборку и динамику микротрубочек [43].



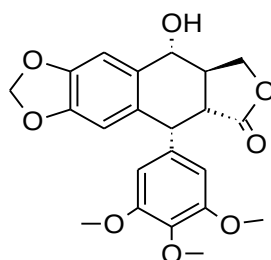
1.16



1.17

Рисунок 1.9 - Структурные формулы винбластина **1.16** и винкрестина **1.17**

Подофиллотоксин **1.18** (рисунок 1.10), биоактивный лигнан, был впервые выделен Подсоцким в 1880 году из североамериканского растения *Podophyllum peltatum* Linnaeus, широко известного как американская мандрагора или майское яблоко [44].



1.18

Рисунок 1.10 - Структурная формула подофиллотоксина **1.18**

По химическому составу это лигнан арилтетралин, содержащий лактоновое звено. Подофиллотоксин содержит систему из пяти колец. Считается, что диоксановое и бензольное кольца, связанные с тремя метоксильными группами, а также лактоновый цикл обеспечивают активность соединения, а объемные заместители в положении С(4) шестичленного кольца увеличивают как противораковую, так и топоизомеразную активности. Его применяют против зарождения раковых клеток яичек и яичников, лимфомы и острых миелогенной и лимфобластной лейкемии [35].

Таксол **1.19** (известный под общим названием Паклитаксел) (рисунок 1.11) представляет собой сложный полиоксигенированный дитерпеноид, выделенный из тиса тихоокеанского (*Taxus brevifolia*) исследовательской группой докторов Уолла и Вани [45]. Он был обнаружен путем систематических исследований различных растительных материалов для применения в качестве противоопухолевых препаратов в конце 1960-х гг. Затем это соединение было выделено из нескольких других видов *Taxus*, включая *Taxus wallichiana*, тис гималайский. Всего из разных видов *Taxus* выделено и охарактеризовано более 300 таксоидов [46]. Таксол до формы препарата был разработан Национальным институтом рака (США). В основе структуры таксола лежит тетрациклическая кольцевая система, к которой присоединена боковая цепь N-бензоил-L-фенилизосерина через сложноэфирную связь у атома С(13) [35]. В 1992 году Таксол был одобрен FDA США для лечения лекарственно-рефрактерного метастатического рака яичников [47]. В дальнейшем была установлена его активность против

нескольких видов злокачественных новообразований, в том числе метастатического рака молочной железы и яичников, мелкоклеточного рака легкого, пищевода, аденокарциномы и гормонорезистентного рака простаты. Механизм действия таксола заключается в связывании с субъединицами β -тубулина микротрубочек [24, 48-50].

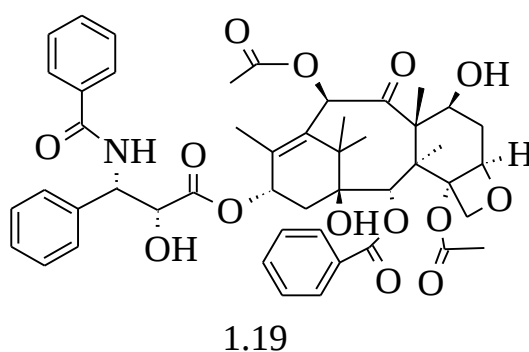


Рисунок 1.11 - Структурная формула таксола **1.19**

Камптотецин **1.20** (рисунок 1.12) - препарат растительного происхождения, который избирательно ингибирует топоизомеразу I, тем самым препятствуя репликации ДНК. В основном проявляет противоопухолевую активность против раковых клеток толстой кишки и поджелудочной железы. Он был открыт в начале шестидесятых годов XX века в результате извлечения из стволовой древесины китайского декоративного дерева *Camptotheca acuminata* [51]. Предварительные исследования выявили существенную противоопухолевую активность в стандартной тест-системе *in vitro*, а также в лейкозных клетках мышей. В период 1966–2004 гг. более 3000 исследовательских работ были посвящены камптотецину. В результате было установлено, что он принадлежит к группе хинолиноалкалоидов. Его структура состоит из пентациклического каркаса, который включает пиррол(3,4b)хинолиновый фрагмент и один асимметричный центр внутри гидроксилактонного кольца. Считается, что именно планарная пентациклическая кольцевая структура обуславливает активность этого соединения. Пиридиновое кольцо необходимо для проявления

противоопухолевой активности. Камптотецин содержится в разных частях растения, таких как корни, веточки и листья.

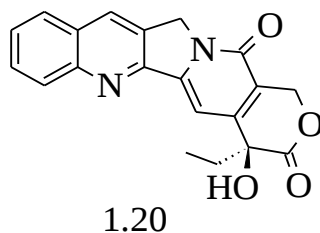


Рисунок 1.12 - Структурная формула камптотецина **1.20**

К числу перспективных противоопухолевых препаратов относится бетулиновая кислота **1.21** (рисунок 1.13) (пентациклический тритерпеноид), которая содержится в коре некоторых видов растений, главным образом берёзы пушистой (*Betula pubescens*). В 1995 г. сообщалось, что бетулиновая кислота является селективным ингибитором человеческой меланомы. Также было обнаружено, что бетулиновая кислота активна *in vitro* против нейроэктодермальных (нейробластома, медуллобластома, саркома Юинга) и злокачественных опухолей головного мозга, карциномы яичников в клетках лейкемии HL-60 человека и клеточных линиях злокачественной плоскоклеточной карциномы головы и шеи SCC25 и SCC9 [52].

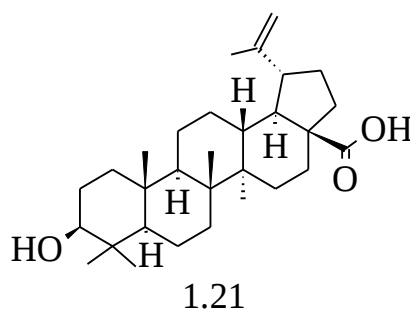
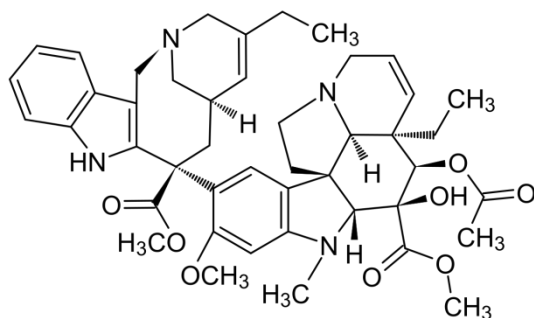


Рисунок 1.13 - Структурная формула бетулиновой кислоты **1.21**

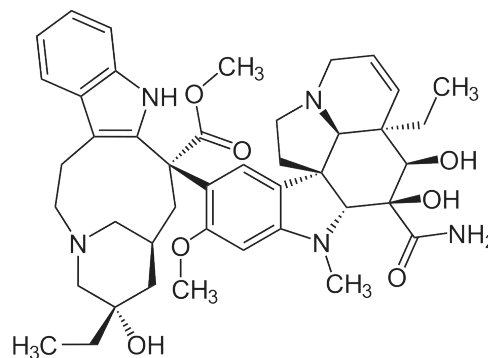
1.3 Полусинтетические и синтетические противоопухолевые препараты

Полусинтетическими аналогами винбластина и винкристина являются винорелбин **1.22** и виндезин **1.23** (рисунок 1.14). По сравнению с винбластином в винорелбине отщеплена молекула воды из пиперидинового цикла, а в виндезине путем гидролиза удалена ацетоксильная группа из

циклогексанового кольца, а карбоксильная группа при этом же кольце превращена в амидную. Соединения **1.22** и **1.23** используются в основном в комбинации с другими химиотерапевтическими препаратами для лечения различных видов рака, включая лейкемии, лимфомы, рака яичек последней стадии, рака груди и легких, и саркому Капоши.



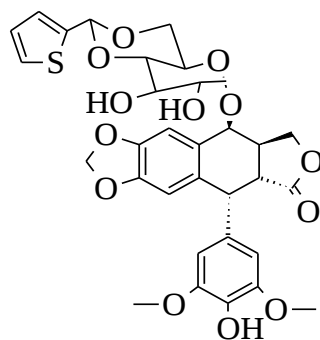
1.22



1.23

Рисунок 1.14 - Структурные формулы винорелбина **1.22** и виндезина **1.23**

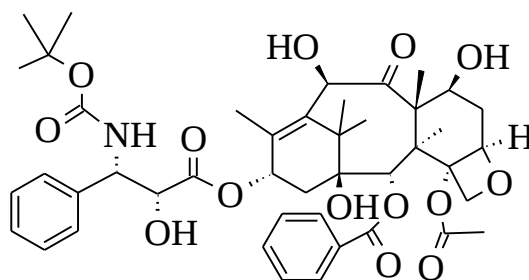
Попытки использовать подофиллотоксин **1.18** в лечении новообразований человека в большинстве своем были безуспешными из-за тяжелых побочных эффектов [37] таких как тошнота, рвота, затрагивание здоровых тканей и т. д. Поэтому были осуществлены масштабные модификации его структуры, в результате которых образовались два полусинтетических глюкозидных циклических ацетала эпиподофиллотоксина, этопозид **1.2** (рисунок 1.1) и тенипозид **1.24** (рисунок 1.15). Тенипозид **1.24** отличается от этопозиды **1.2** наличием в молекуле тиофенового фрагмента. Это наиболее широко используемые производные в химиотерапии первой линии для лечения лимфом острого лейкоза, рака яичек и яичников, мелкоклеточного рака легких, мочевого пузыря и мозга [53].



1.24

Рисунок 1.15 - Структурная формула тенипозиды 1.24

Синтетическим аналогом таксола **1.19** является доцетаксел **1.25** (рисунок 1.16). Его противоопухолевая активность выше, чем у таксола [54, 55].



1.25

Рисунок 1.16 - Структурная формула доцетаксела 1.25

Он также обладает лучшими фармакологическими свойствами, такими как повышенная растворимость в воде и выраженное действие на микротрубочки. Доцетаксел усиливает полимеризацию тубулина в стабильные пучки микротрубочек, ведущих к некрозу клеток. Он используется для лечения пациентов с метастатическим раком молочной железы и немелкоклеточным раком легких [56].

Камптотецин **1.20** как таковой не может использоваться в качестве предпочтительного противоракового препарата из-за его сильной токсичности. Однако удалось синтезировать производные камптотецина, обладающие меньшей токсичностью и лучшей растворимостью в воде. Так, разработка топотекана **1.26** и иринотекана **1.1** способствовала изучению механизма действия камптотецина, а также выявлению аналогов с

улучшенными свойствами. Топотекан **1.26** (рисунок 1.17) применяется для лечения рака яичников и мелкоклеточного рака легких, а иринотекан **1.1** - для лечения рака прямой кишки.

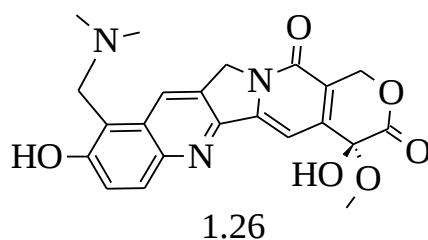


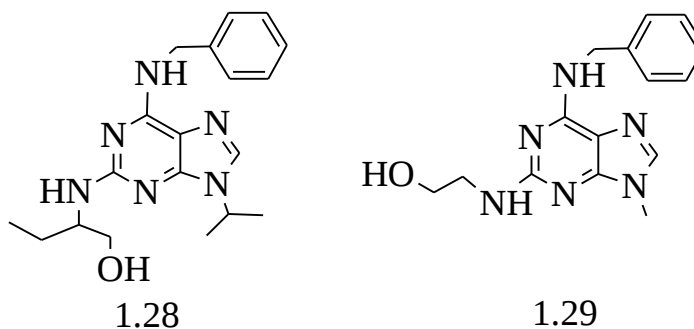
Рисунок 1.17 - Структурная формула топотекана **1.26**

Соединения **1.1** и **1.26** взаимодействуют с топоизомеразой I (ТОРІ), повсеместным ферментом, участвующим в регулировании топологии ДНК при репликации, рекомбинации и транскрипции. В настоящее время камптотецины являются клиническими препаратами и занимают заметную долю на рынке противораковых лекарств [35].

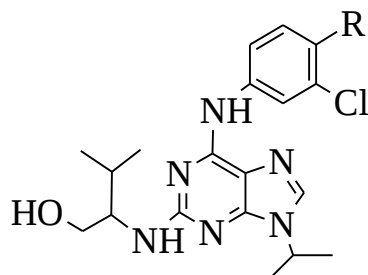
Противораковыми свойствами характеризуются также фитохимические соединения из класса флавоноидов. Флавопиридол **1.27** (рисунок 1.18) является полностью синтетическим соединением, в основе которого лежит флавоноидная структура рогитукина - природного соединения, выделенного из *Dysoxylum binectariferum* Hook f. (Meliaceae) и обладающего противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью. Флавопиридол **1.27** один из 100 аналогов, синтезированных в ходе исследований зависимости структура – активность, он обладает активностью против тирозинкиназы и сильной ингибирующей активностью в отношении рака груди и линии клеток карциномы легких [57].

Флавопиридол (альвоцидиб) **1.27** блокирует деление клеток, индуцирует апоптоз, ингибирует циклинф и циклин-зависимые киназы.

Росковитин **1.28** - еще одна полусинтетическая противоопухолевая субстанция на основе оломуцина **1.29** (рисунок 1.19), выделенного из семян редиса *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae) [58].



Было показано, что оломуцин **1.29** ингибирует циклин-зависимые киназы (Cdk) – белки, которые играют важную роль в развитии клеточного цикла. Его химическая модификация привела к более сильному ингибитору – росковитину **1.28**. Дальнейшее развитие этой серии синтеза с помощью методов комбинаторной химии позволило получить пурваланолы **1.30** и **1.31** (рисунок 1.20), которые являются еще более эффективными соединениями, чем исходный природный продукт [59].



R=COOH, Пурваланол В 1.30

R=H, Пурваланол А 1.31

Рисунок 1.20 - Структурные формулы пурваланолов **1.30** и **1.31**

Интересна химическая модификация бетулиновой кислоты **1.21**, которая, как указывалось выше, обладает выраженной противораковой активностью. Однако препятствием для клинической разработки бетулиновой кислоты и ее аналогов является их плохая растворимость в водных средах, таких как сыворотка крови, и полярных растворителях, используемых для биологических анализов. Для решения этой проблемы и улучшения фармакологических свойств синтезирован представительный ряд производных. При этом было показано, что модификации при атоме С(20) приводят к потере цитотоксичности. Установлена важность наличия группы -COOH, поскольку соединения, замещенные в этом положении, такие как лулеол и метилбетулинат, менее активны в отношении меланомы человека, чем бетулиновая кислота. Более того, некоторые С(28) аминокислотные **1.32** и С(3) фталатные **1.33** производные (рисунок 1.21) проявляли более высокую цитотоксическую активность против линий раковых клеток с улучшенной селективной токсичностью и растворимостью в воде. Чаттерджи и др. получили 28-О-β-D-глюкопиранозид бетулиновой кислоты **1.34** (рисунок 1.21) путем микробной трансформации с использованием грибов видов *Cunninghamella*. Этот глюкозид не проявил какой-либо значительной активности *in vitro* на клеточных линиях меланомы человека (MEL-2) и колоректальной аденокарциномы человека (HT-29), что подтверждает важность функции карбоновой кислоты для сохранения цитотоксичности. Недавно [60] синтезирована серия 3-О-гликозидов бетулиновой кислоты, для

которых установлена высокая противораковая активность *in vitro* против линий раковых клеток человека [49, 61, 62].

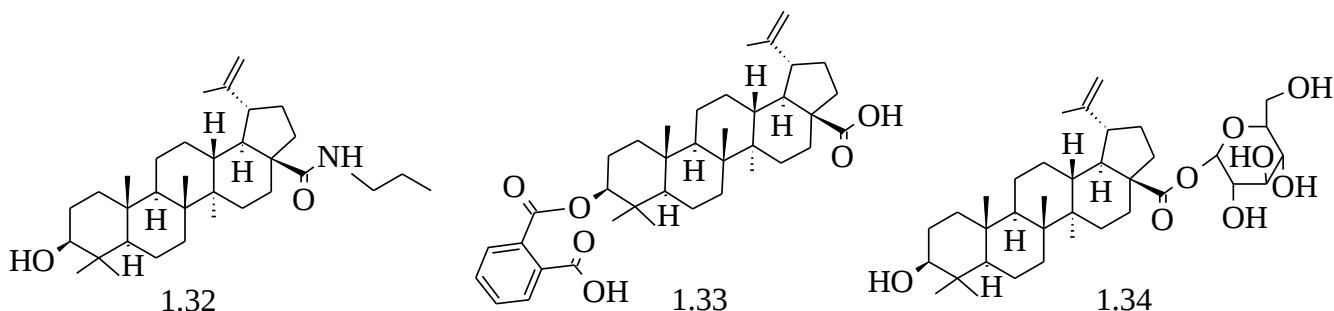


Рисунок 1.21 - Структурные формулы производных бетулиновой кислоты 1.32-1.34

Таким образом, к настоящему времени известно значительное количество химически модифицированных природных веществ, обладающих противораковыми свойствами, которые внедрены в медицинскую практику или относятся к числу перспективных, находящихся на стадии исследования химиотерапевтических субстанций.

1.4 Основные подходы к синтезу биологически активных веществ (БАВ)

Как известно, БАВ представляют собой обычно органические соединения сложного строения. Их активность напрямую зависит от структуры молекулы и расположения функциональных групп. Особую группу таких веществ составляют лекарственные вещества, главная особенность которых заключается в поддержании жизнедеятельности и физиологической активности человека. Мишенью для таких препаратов служат рецепторы, ферменты, клетки, ткани, органы, функциональные системы. Для этого необходимы особые требования к чистоте препаратов, избирательность действия, стабильность при хранении и отсутствие нежелательных побочных эффектов для организма [63]. Для получения потенциальных БАВ химики-синтетики руководствуются принципами целенаправленного синтеза, выработанными при тщательном и глубоком изучении зависимости лекарственной активности от химического и стереохимического строения

органического соединения. На сегодняшний день стратегия и тактика создания новейших лекарственных веществ опираются на ряд принципов.

Принцип химического модифицирования структуры известных синтетических и природных лекарственных веществ является интуитивным, умозрительным и основан на введении разнообразных группировок в молекулы известных лекарственных субстанций. При этом ожидается, что биоактивность модифицированного вещества окажется большей. Примером может служить модификация структуры пенициллинов **1.35** и цефалоспоринов **1.36** (рисунок 1.22) по указанным стрелками радикалам (R), что позволило получить многочисленные новые препараты с улучшенными антибиотическими свойствами.

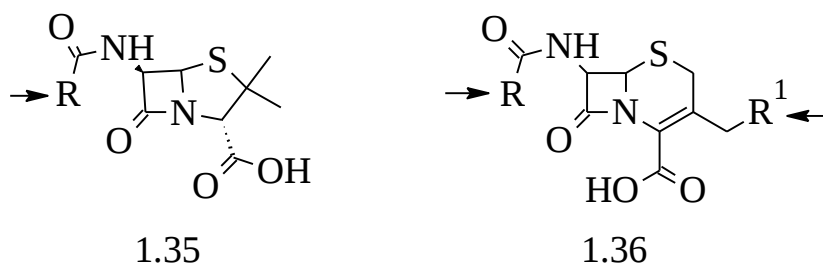


Рисунок 1.22 - Структурные формулы пенициллинов **1.35** и цефалоспоринов **1.36**

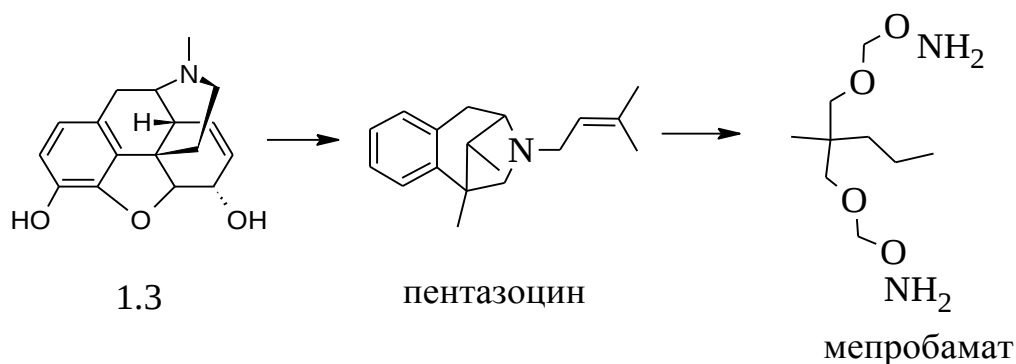
Указанный прием широко и с успехом используется в настоящее время в синтезе многочисленных производных практически всех классов лекарственных веществ [15].

Химическая модификация включает в себя несколько подходов [64]:

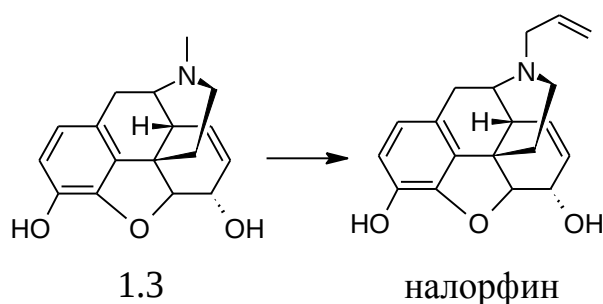
1. Гомологический



2. Молекулярное разъединение

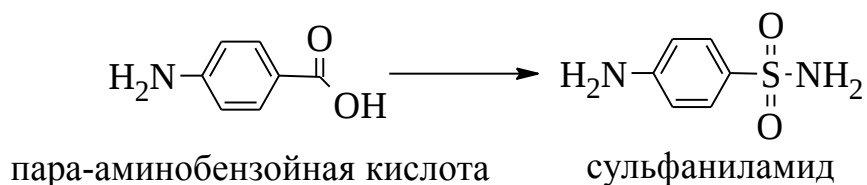


3. Молекулярное присоединение



4. Изостерические замены.

Изостерическая замена в создаваемом лекарстве — это замена атома или группы на похожую по размеру или валентности. Если при этом сохраняется физиологическая активность, то замена называется «биоизостерической» [65].



Принцип введения фармакофорной группы известной лекарственной субстанции в молекулу нового вещества. Фармакофорный структурный элемент или фрагмент молекулы обеспечивает фармакологическую активность. Так, на основе азотистого иприта **1.37** было получено семейство противораковых препаратов путем введения в различные вещества N,N-дихлордиэтиламинного или азиридинового фрагмента. Пример, сарколизин **1.38** (рисунок 1.23), растворяющий саркому, в молекуле которого объединены структуры азотистого иприта **1.37** и незаменимой аминокислоты фенилаланина.

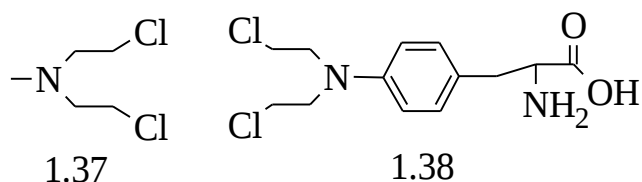


Рисунок 1.23 - Структурные формулы азотистого иприта **1.37** и сарколизина **1.38**

Он продлевает жизнь больных миеломными заболеваниями на 5-10 лет. Его используют в комплексном лечении злокачественных опухолей в сочетании с препаратами, которые характеризуются другими механизмами противораковой активности, а также в сочетании с лучевой терапией [15].

Принцип молекулярного моделирования включает в себя теоретические и вычислительные методы, используемые для моделирования или имитации поведения молекул [66]. В сочетании с рентгеноструктурным анализом этот подход позволяет установить стереохимические особенности молекулы лекарственного вещества и биорецептора, конфигурацию их хиральных центров, измерить расстояния между отдельными атомами, группами атомов или между зарядами в случае цвиттер-ионных структур лекарства и биорецепторного участка его захвата. Получаемые таким образом данные позволяют более целенаправленно проводить синтезы биоактивных молекул с заданными на молекулярном уровне параметрами. Этот метод был успешно использован в синтезе высокоэффективных анальгетиков - аналогов морфина, а также для получения ряда лекарственных веществ, действующих на центральную нервную систему подобно природному нейромедиатору γ -аминомасляной кислоте. Примером является финигода **1.42** – отечественный транквилизатор, применяемый в психиатрической практике, который представляет собой 3-арилзамещенное производное γ -аминомасляной кислоты. Его получают (схема 1.1) конденсацией ароматических альдегидов с нитрометаном через β -нитростирола **1.39**, которые реакцией присоединения диэтилмалоната превращают в этилат 2-этоксикарбонил-3-арил-4-нитробутановой кислоты **1.40**. Это нитропроизводное затем восстанавливают

водородом в присутствии никеля Ренея до лактама **1.41**, последующий гидролиз которого в 20%-ной HCl сопровождается термическим декарбоксилированием и приводит к фенигаме **1.42**.

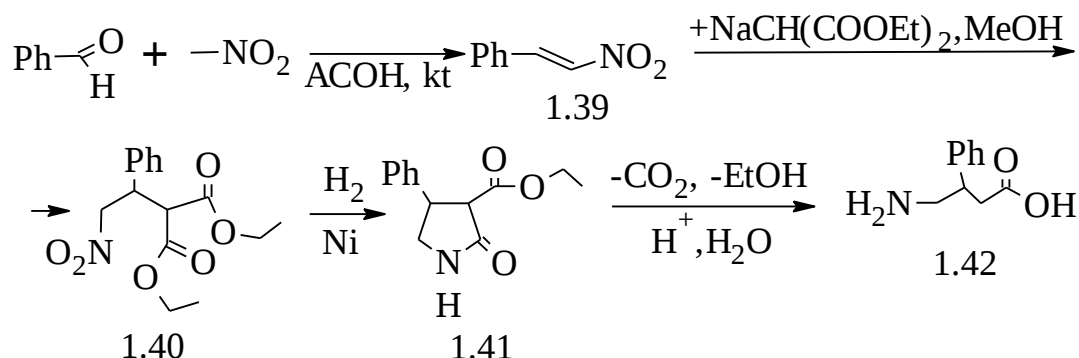


Схема 1.1 - Синтез финигамы **1.42**

Стратегия пролекарств. Лекарственный препарат после введения в организм сразу же подвергается атаке ферментными системами, защищающими организм от чужеродных веществ (*ксенобиотиков*). Лекарственное вещество таким образом биodeградируется с образованием различных производных, называемых *метаболитами*. В ряде случаев установлено, что не само введенное лекарственное вещество (его в этом случае называют *пролекарством*), а его метаболит оказывает лечебный эффект. Поэтому тщательное изучение метаболизма лекарственных веществ, синтез и биотестирование его метаболитов могут привести к созданию новых лекарственных веществ. На этой основе возникла идея заведомого синтеза пролекарства, которое само по себе не обладает лечебным действием, но имеет такие структурные группировки, которые позволяют ему легко преодолевать в организме защитные барьеры и точно доставляться в больной орган. При попадании в биоминеральную среду это пролекарство метаболизируется и превращается в истинное лекарство. Считается, что почти четвертая часть всех новых лекарственных веществ вводится в настоящее время в виде пролекарств. Например, кодеин **1.5** оказывает обезболивающее действие благодаря превращению в организме в морфин **1.3** (схема 1.2).

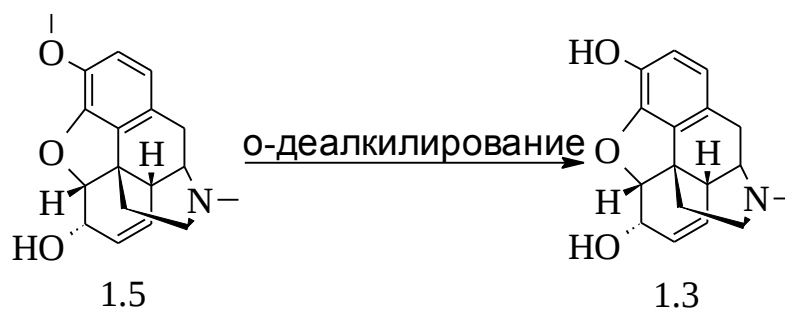


Схема 1.2 - Превращение кодеина 1.5 в морфин 1.3

Концепция антиметаболитов строится на создании синтетического лекарственного вещества, структурно близкого к какому-либо естественному метаболиту организма человека. Задача такого синтетического вещества, называемого *антиметаболитом*, состоит в подмене метаболита в естественных биореакциях. Антиметаболиты должны быть способны лишь частично выполнять в организме функции метаболитов. Являясь химическими имитаторами метаболитов, лекарственные вещества такого рода «обманывают» контролирующие ферментные системы, встраиваются в метаболическую схему и заменяют собой настоящий метаболит, например, в растущей цепочке ДНК или РНК. Подобный прием успешно был использован в синтезе противораковых веществ. Например, производные урацила (фторафур и др.), замещенные пурины (меркаптопурин **1.43**) и птеридины (метотрексат **1.44**) (рисунок 1.24).

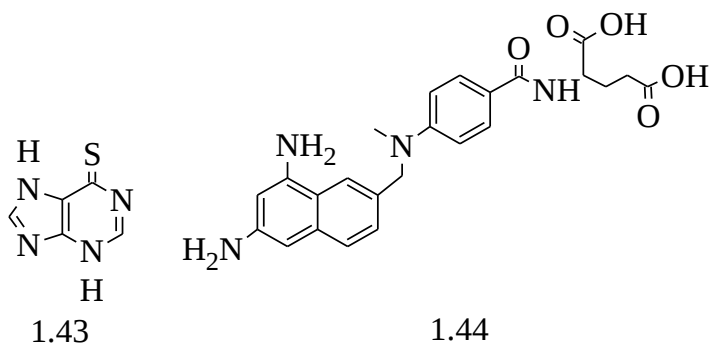


Рисунок 1.24 - Структурные формулы меркаптопурина 1.43 и метотрексата 1.44

Первым противоопухолевым препаратом диоксопиримидинового ряда был фторурацил **1.45**. Пиримидиновое ядро в его синтезе конструируют

циклоконденсацией эфира натрийоксометиленфторуксусной кислоты **1.46** с S-метилизотиомочевинной **1.47**. После гидролиза метилтиольной группы в пириимидине получают синтетический антиметаболит (схема 1.3).

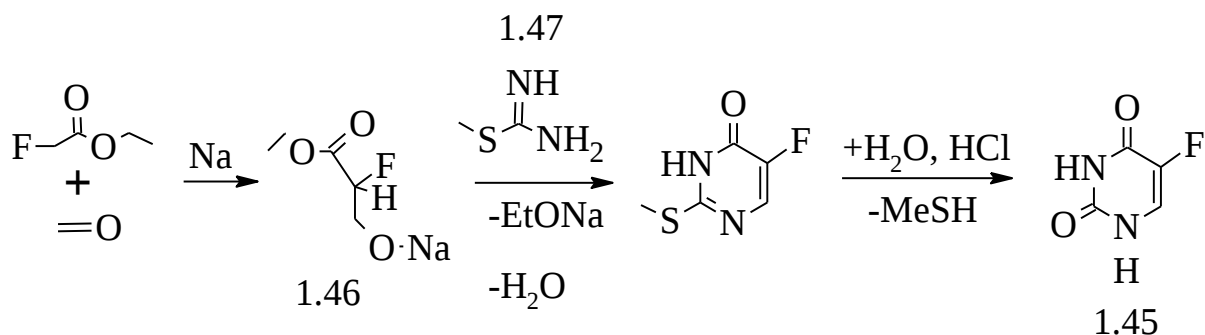


Схема 1.3 - Синтез фторурацила 1.45

Важной характеристикой синтетических антиметаболитов является то, что они обладают малой токсичностью и не оказывают нежелательных побочных эффектов, благодаря высокой степени их узнаваемости системами организма, для которых эти лекарственные вещества структурно «выглядят» почти нечужеродными, биогенными [15]. Так, например, были синтезированы норадреналин **1.48**, адреналин **1.49**, γ -аминомасляная кислота, простагландины, ряд гормонов и другие физиологически активные соединения (схема 1.4) [64].

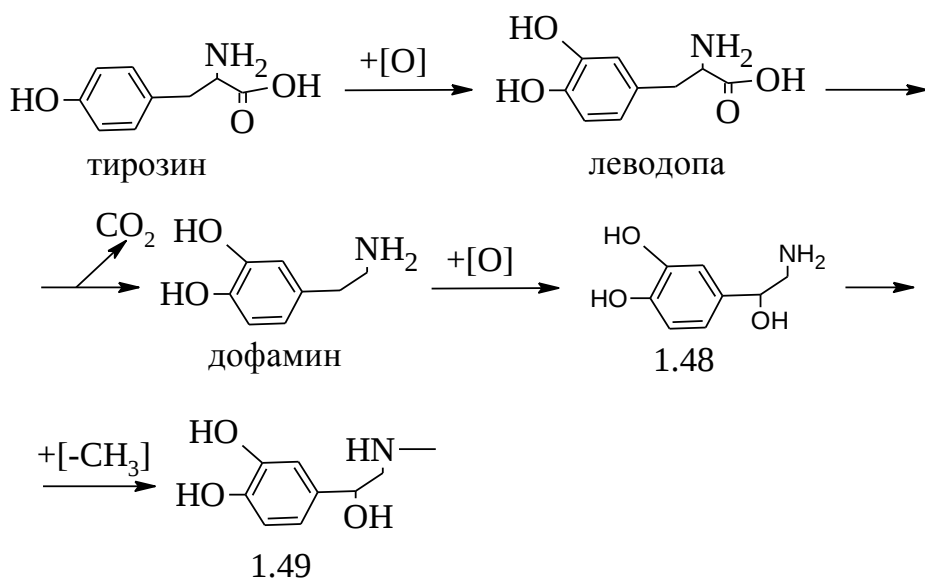


Схема 1.4 - Синтез норадреналина 1.48 и адреналина 1.49

Методология комбинаторной химии основана на совмещении методов химического синтеза и биологии. Она изобретена Фуркой А. (Университет Этвёша Лоранда в Будапеште, Венгрия) и стала быстро развиваться в 1990-х годах как часть общей стратегии открытия новых лекарственных веществ. Первые опыты были сделаны с короткими пептидами. Стратегия комбинаторной химии основана на недавней разработке нескольких революционных химических и биологических методов параллельного синтеза и испытания большого числа соединений. Типичным примером может служить синтез библиотеки антибактериальных 1,3-оксазолидин-2-онов **1.50**, основанный на принципе защитных групп. Осуществляется твердофазный синтез на полистирольной смоле (схема 1.5).

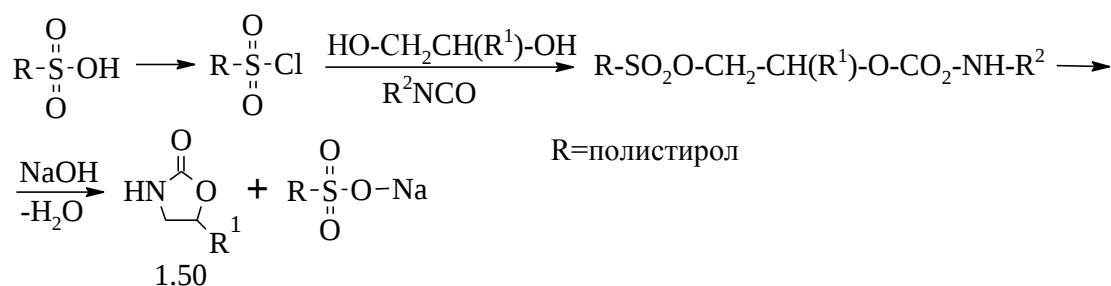


Схема 1.5 - Синтез антибактериальных 1,3-оксазолидин-2-онов **1.50** на полистирольной смоле

В результате получают сотни производных 1,3-оксазолидин-2-онов **1.50**, которые затем испытывают на биологическую активность [15].

Очевидно, что комбинаторная химия и прочие методологии синтетической химии вращаются вокруг определенных основных химических структур, служащих нескончаемым источником для фармацевтической промышленности. Это помогает избежать многочисленных шагов, необходимых для обнаружения одного природного соединения. Важно подчеркнуть, что основная цель комбинаторной химии - дополнять и содействовать открытию и развитию лекарств из природных соединений, а не заменять их. По этой причине некоторые крупные фармацевтические компании сохраняют интерес к химии природных соединений. Отмечается,

что природные соединения, являющиеся источником дорогостоящего продукта, могут быть проще получены и более экономичны в производстве, что будет снижать рыночную стоимость конечного лекарства.

Превосходные клинические показатели некоторых из природных соединений мотивировали химиков синтезировать структурные аналоги с улучшенными лекарственными свойствами. В результате были получены новые полусинтетические лекарственные вещества, клиническая полезность которых проистекала из свойств природных соединений [67].

1.5 Связь между строением вещества и его биологической активностью

Химическое и пространственное строение вещества определяет наличие у него биоактивности. Она в значительной степени может зависеть от разнообразных факторов. Многие лекарственные вещества должны иметь хорошую липофильность и обладать способностью проникать через клеточные полупроницаемые мембраны. Лекарственная молекула, кроме основной фармакофорной группировки, непосредственно отвечающей за терапевтический эффект, также должна содержать гидрофильные фрагменты.

При конструировании лекарственного препарата стараются учитывать приведенные выше факторы, вводя соответствующие химические группировки в потенциальное лекарственное вещество. Так, введение в структуру фенольных группировок, карбоксильных или сульфогрупп, основного или аммонийного атома азота (четвертичная соль) улучшает водорастворимость лекарственного вещества, изменяет ее основность или кислотность, усиливает, как правило, ее биодействие. Наличие *n*-алкильных цепей, их удлинение, а также введение галогенов, наоборот, повышает липофильность лекарственных веществ (растворимость в жировых тканях, которые могут служить лекарственным депо) и облегчает их прохождение через биомембраны. Разветвленные алкильные заместители и присутствие атомов галогенов затрудняет метаболизм (в частности, биоокисление) лекарственных веществ. Циклоалкильные группировки улучшают

связываемость с биорецептором за счет ван-дер-ваальсовых сил. Использование лекарственных веществ с биоактивной спиртовой или карбоксильной группой в виде их сложных или простых эфиров изменяет полярность молекулы лекарственного вещества, улучшает проявление фармакологической активности и замедляет биодекарбоксилирование. При действии на биологические системы синтетических лекарственных веществ часто не делают различия между веществами, в которых вместо, например, бензольного кольца присутствует пиридиновое, вместо фуранового - пиррольное или тиофеновое, то есть замена одного плоского ядра на другое не сказывается существенным образом на полезном биодействии. Поэтому подобные замены могут составлять часть стратегии при дизайне синтетических лекарственных веществ для изменения полярности молекулы, введения различных заместителей в ароматическое кольцо в целях усиления взаимодействия лекарственного вещества со специфическим рецептором и улучшения фармакологического действия препарата.

При создании новых лекарственных средств, имеющих хиральные центры, следует иметь в виду, что различные энантиомеры могут обладать различным, и даже противоположным биодействием. Пример - талидомид, (+)-R-изомер **1.51** которого является хорошим снотворным и транквилизатором, а (-)-S-энантиомер **1.52** вызывает врожденные уродства (рисунок 1.25) [15].

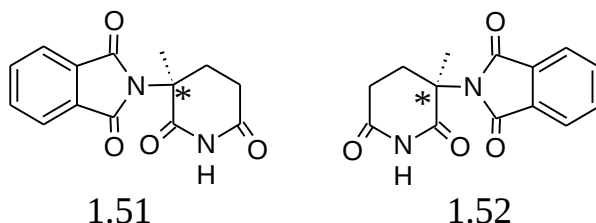


Рисунок 1.25 - Структурные формулы (+)-R- талидомида **1.51** и (-)-S- талидомида **1.52**

Направленный синтез лекарственных препаратов с заданными свойствами является в настоящее время одним из самых приоритетных подходов современной теоретической и синтетической органической химии.

1.5.1 Влияние алкильных групп

Очень токсичные соединения несколько утрачивают интенсивность своего действия, если к ним присоединяют простые алкильные группы. Например, при замещении алкильными радикалами водорода в HCN получаются нитрилы RCN и изонитрилы RNC, которые становятся токсичными в организме только в результате отщепления HCN.

Во многих случаях замещение водорода в гидроксильной группе на метильную группу снижает физиологическую активность. Например, пирокатехин **1.53** активнее гваякола **1.54**, а анисовая (*о*-метоксибензойная) кислота **1.55** менее активна, чем салициловая кислота **1.56** (метилирование в *орто*- и *пара*-положения) (рисунок 1.26).

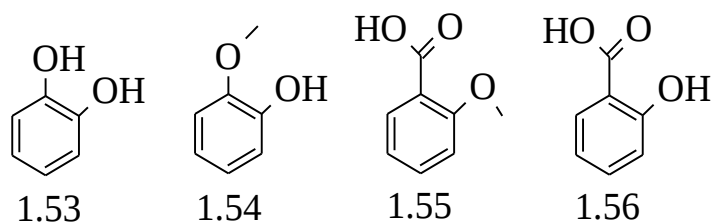


Рисунок 1.26 - Структурные формулы пирокатехина **1.53** и гваякола **1.54**, анисовой **1.55** и салициловой **1.56** кислот

С другой стороны, в некоторых случаях при *мета*-метилировании гидроксильной группы токсичность соединений возрастает. Так, например, диметилловый эфир резорцина **1.57** значительно токсичней, чем сам резорцин **1.58** (рисунок 1.27).

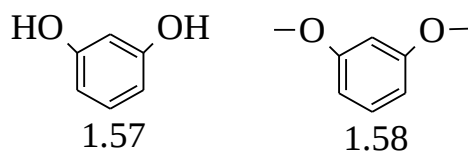


Рисунок 1.27 - Структурные формулы резорцина **1.57** и его диметилового эфира **1.58**

1.5.2 Влияние гидроксильных групп

Введение гидроксильных групп в алифатические соединения обычно приводит к ослаблению биологической активности, причем степень этого ослабления пропорциональна числу введенных групп. Чем больше гидроксильных групп (многоатомные спирты), тем слабее, например, наркотический эффект. Так, из спиртов, обладающих наркотическими и токсическими свойствами, при этом получают неактивные соединения – глицерин, маннит и т.д. Кроме того, вещества приобретают сладкий привкус.

Из весьма активных альдегидов - менее активны альдоли, как например, соединение $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CHO}$, а при введении большего числа гидроксильных групп образуются полностью неактивные альдозы - в частности, глюкоза $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CHO}$. Подобные эффекты наблюдаются во многих других соединениях. Так, кофеин теряет свое биологическое действие при переходе в оксикофеин.

Исключение составляет этиленгликоль, который является более токсичным, чем этанол или глицерин, но это связано с его частичным превращением в организме в щавелевую кислоту.

Введение OH -групп в ароматические соединения обычно ведет к повышению физиологической активности и токсичности. Так, при введении гидроксильной группы в молекулу бензола значительно возрастает его токсичность и одновременно появляются хорошо известные для фенола сильные антисептические свойства. Чем больше OH - групп, тем сильнее антисептические свойства. Одновременное введение галогенов еще больше усиливает эффект (рисунок 1.28) [68].

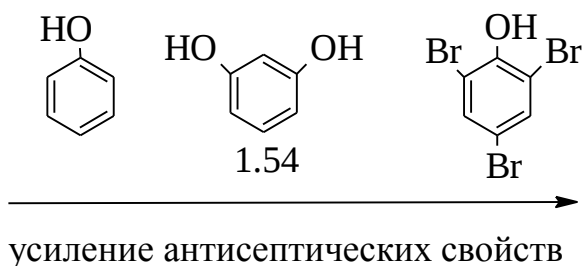


Рисунок 1.28 - Антисептические свойства ароматических соединений

Введение группы OH в структуру более инертного ароматического вещества – бензойной кислоты – также сопровождается повышением ее биологической активности [69].

Установлено [70], что антипролиферативная и цитотоксическая активности фенольных соединений зависят от числа OH-заместителей в кольце. По мере увеличения числа OH-заместителей в бензольном кольце антипролиферативная и цитотоксическая активность фенолов также увеличивается. Например, галловая кислота **1.59** значительно активнее кофейной **1.60** (рисунок 1.29). Так, тригидроксилированные фенолы показали значительный цитотоксический эффект в отношении клеточной линии лимфобластной лейкемии. Это связано с увеличенной антиоксидантной способностью ненасыщенных фенолов.

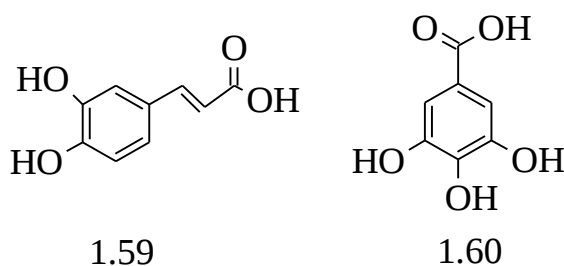


Рисунок 1.29 - Структурные формулы галловой **1.59** и кофейной **1.60** кислот

1.5.3 Эффект галогенов в органических соединениях

Углеводороды, в молекулах которых один или несколько атомов водорода замещены галогеном, находят применение в медицине как наркотические, анестезирующие и дезинфицирующие препараты (хлороформ-CHCl₃, хлорэтан- C₂H₅Cl, иodoформ-CHI₃ соответственно) [71]. В молекулах таких соединений может присутствовать любой из четырех галогенов: фтор, хлор, бром и йод. Так, перфторуглеводороды (углеводороды, в которых все атомы водорода замещены на атомы фтора) являются эффективными газопереносящими средами, что позволяет использовать их для жидкостного дыхания или в качестве искусственной крови. Например, перфторан **1.61** (рисунок 1.30) [72].

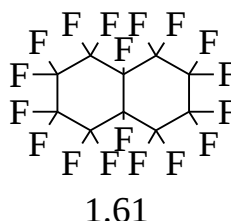


Рисунок 1.30 - Структурная формула перфторана **1.61**

Иногда разные атомы галогенов присутствуют одновременно, но каждый из них оказывает своё особое влияние на химические, физические и фармакологические свойства соединений.

При введении атомов галогена в ароматическое кольцо физиологическое действие падает, вместе с тем уменьшается и токсичность. Так, дихлорбензол более токсичный, чем трихлорбензол. При введении хлора или брома в боковую цепь образуются слезоточивые вещества (лакриматоры), такие как бромистый бензил [68].

Между бром- и хлорпроизводными как алифатического, так и ароматического рядов имеется большое сходство [69].

Ранняя терапия рака базировалась на алкилирующих агентах (цитостатиках), первыми из которых были азотистый иприт **1.37** и аналогичные ему вещества **1.62**, **1.63** (рисунок 1.31), содержащие в качестве фармакофорной группы 2,2'-дихлордиэтиламинный фрагмент, связанный с алифатической, ароматической или гетероароматической основой.

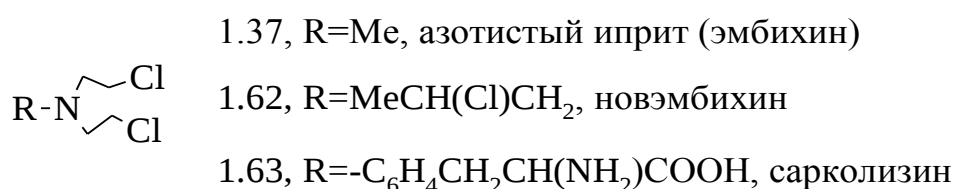


Рисунок 1.31 - Структурные формулы азотистого иприта **1.37**, новэмбихина **1.62**, сарколизина **1.63**

Предполагают, что эти агенты алкилируют гуаниновое основание ДНК опухолевой клетки по имидазольной части, приводя к отщеплению сахарофосфата и останавливая таким образом размножение клеток.

Самым распространенным лекарственным веществом этого класса является циклофосфан **1.64**, а более новым препаратом, имеющим аналогичную активность, но на более широком круге опухолей, является трофосфамид **1.65** (Схема 1.6):

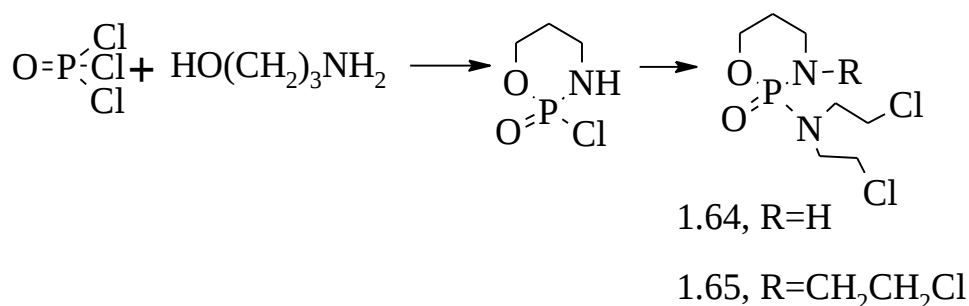


Схема 1.6 - Синтез циклофосфана **1.64** и трофосфамида **1.65**

Циклофосфан получают конденсацией оксихлорида фосфора (POCl₃) с пропаноламином с последующим замещением атома хлора в промежуточном хлороксиде оксаазафосфорана на бис(2-хлорэтил)аминную группу (схема 1.6) [15].

Из-за большой электроотрицательности атома фтора функциональные группы, такие как F, CF₃, CF₃O и CF₃SO₂ - все электроноакцепторные, применяются в биологически активных веществах (пример, флударобин **1.66**, флудамид **1.67**) (рисунок 1.32). Введение атома фтора обычно увеличивает растворимость липидов, усиливая скорость абсорбции и транспортировки лекарств *in vivo*.

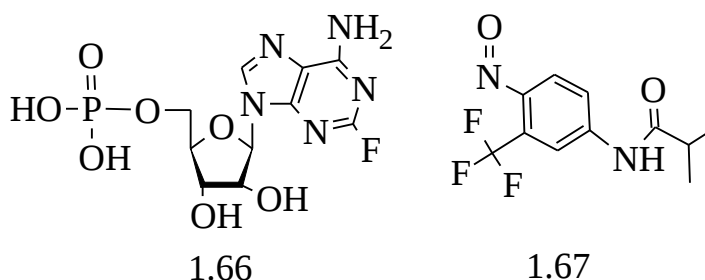


Рисунок 1.32 - Структурные формулы флударобина **1.66** и флудамида **1.67**

Наибольший эффект фтора в биохимической отрасли, несомненно, связан с лекарственной химией. Таким образом, избирательное фторирование

биоактивных молекул является хорошо зарекомендованной стратегией в разработке новых лекарств. Это становится заметным в непрерывном увеличении количества фторированных лекарств и новых кандидатов на лекарства, поступающих в клинические испытания. Как результат, некоторые из наиболее эффективных и самых продаваемых препаратов на фармацевтическом рынке содержат атомы фтора в их составе (например, витафтор, фторотан, эльгифлюор).

Преимуществом введения атомов фтора или фторалкильных групп в органические соединения является изменение их физико-химических характеристик, которые в некоторых случаях существенно отличаются по сравнению с их нефторированными аналогами, например, по кислотности и липофильности. Все это может быть достигнуто путем рациональной замены атомов водорода или функциональных групп фтором и может привести к улучшению биологических и / или фармакологических свойств. Другим полезным свойством является блокирование потенциальных участков окисления с целью предотвращения нежелательных метаболитных путей, примером которых является замена метилареновых замещенных трифторметилом.

В 2010 году было подсчитано, что около 20% вводимых в оборот препаратов содержат атомы фтора или фторалкильные группы. Однако в последние годы тенденция возрастает с 20% до 30% для всех новых утвержденных лекарств. Препараты, содержащие фтор, охватывают все возможные терапевтические области, обладают широким структурным разнообразием. Несколько фторсодержащих лекарств являются одними из наиболее назначаемых и приносящих пользу, например, флудрокортизон **1.68** (рисунок 1.33) [73].

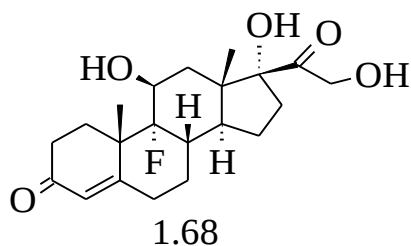


Рисунок 1.33 - Структурная формула флудрокортизона **1.68**

1.5.4 Влияние азотсодержащих групп

Вещества, содержащие в своей молекуле третичный атом азота, часто являются малотоксичными или лишенными какой-либо токсичности. Например, фурадонин **1.69** (рисунок 1.34) успешно применяется при инфекциях мочевыводящих путей [74].

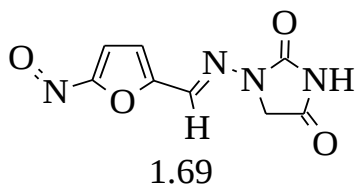


Рисунок 1.34 - Структурная формула фурадонина **1.69**

Введение аминогруппы ($-\text{NH}_2$) усиливает жаропонижающие свойства и сильно увеличивает токсичность веществ. Так, анилин - антипиретик с высокой токсичностью. Одновременное введение гидроксила и аминогруппы придает веществам анестезирующие свойства, которые еще больше возрастают при превращении гидроксила (4-аминофенол **1.70**) в группу простого эфира (4-этоксифенол **1.71**) (рисунок 1.35)

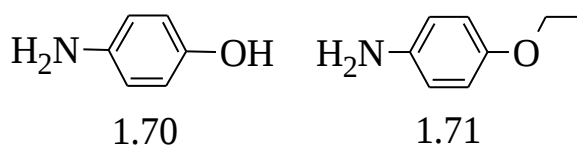


Рисунок 1.35 - Структурные формулы 4-аминофенола **1.70** и 4-этоксифенола **1.71**

Введение нитрозогруппы ($-\text{N}=\text{O}$) Действует на центр продолговатого мозга, ответственный за расширение кровеносных сосудов (амилнитрит **1.72** (рисунок 1.36), натрия нитрит) [68].

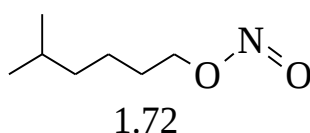


Рисунок 1.36 - Структурная формула амилнитрита **1.72**

1.5.5 Влияние гетероциклического фрагмента

Вещества, содержащие в своем составе гетероциклические фрагменты, численно занимают первое место в общем арсенале лекарственных препаратов (более 60%), а из 25 ведущих по сумме продаж лекарственных веществ в 1990 г. они составили 70%. Структура гетероциклических лекарственных веществ выглядит обычно намного сложнее, чем негетероциклических, тем не менее их синтез часто оказывается более простым [69].

Например, для получения фурацилина **1.73** (схема 1.7) — семикарбазона 5-нитрофурфурола — фурфурол нитруют азотной кислотой в присутствии уксусного ангидрида (защищающего альдегидную группу от окисления), а затем проводят реакцию с семикарбазидом.

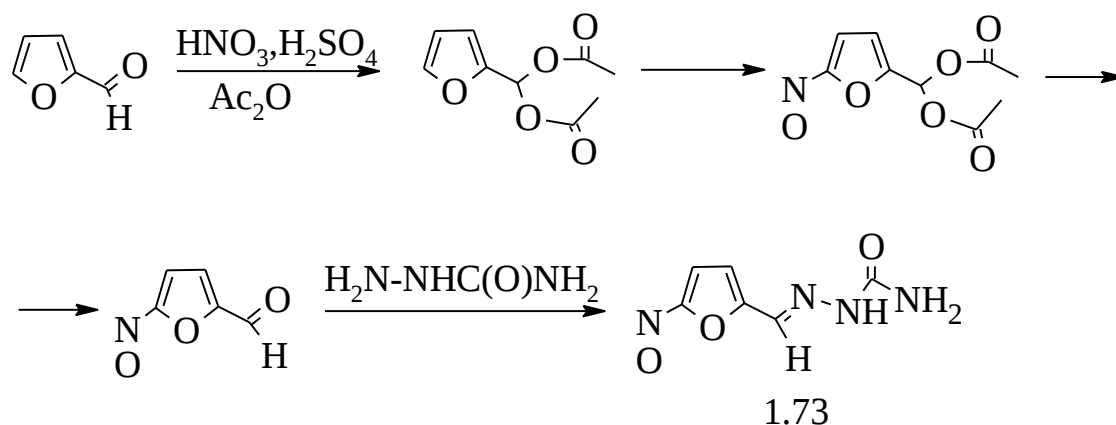


Схема 1.7 - Синтез фурацилина **1.73**

Фурацилин **1.73** применяют наружно в растворах и мазях как антисептик для обработки ран, кожи, слизистых оболочек, промывания серозных и суставных полостей. Также он способствует заживлению ран и не вызывает раздражения тканей [74].

Таким образом, модификация природных соединений является зарекомендованным подходом к получению лекарственных средств с заданной активностью, иногда даже превосходящей исходное соединение. Введение фармакофорной группы является конструктивным методом для получения перспективных субстанций, обладающих высокой биологической активностью. В полной мере это относится к синтезу цитотоксических производных природного феосфериды А.

ГЛАВА 2

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

(обсуждение результатов)

Одним из природных соединений, проявляющих цитотоксическую активность, является феосферид А (PPA) **2.1**, (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, который был выделен впервые в 2006 году Кларди с коллегами из эндофитного гриба, FA39 (*Phaeosphaeria avenaria*) в ходе поиска природных соединений-ингибиторов STAT3. PPA был получен в виде оптически активного желтого прозрачного вещества ($[\alpha]_{20}^D -93,6$ (с 2,0, CH₂Cl₂)). По данным масс-спектрометрии молекулярная масса вещества имела значение 298.1656, что соответствовало брутто формуле C₁₅H₂₃NO₅+H. На основании спектров ЯМР ¹H и ¹³C была предположена структура соединения, представленная на рисунке 2.1. При определении цитотоксичности было установлено, что оно способно ингибировать STAT3 / ДНК связывание с индексом IC₅₀ 0.61 мМ, в то же время демонстрируя перспективное ингибирование роста клеток в STAT3-зависимых U266 клетках множественной миеломы с EC₅₀ 6.7 мМ. Хотя относительная стереохимия феосферид А была установлена на основе экспериментов NOESY, его абсолютная конфигурация оставалась неопределенной [75].

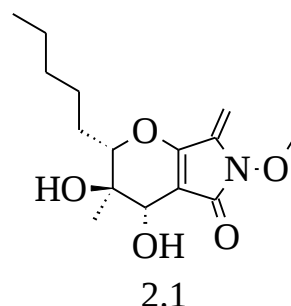


Рисунок 2.1 - Структурная формула феосферид А **2.1**

Несколько исследовательских групп осуществили попытку синтезировать PPA для более широкого изучения его биомедицинской

активности. В 2011 году Кобаяши и сотрудники [76] получили соединение, которое принципиально соответствовало РРА, но имело некоторые различия в данных ЯМР ^1H и ^{13}C по сравнению с природным РРА [77,78].

В 2011 году в результате скрининга грибов-фитопатогенов специалистами Всероссийского института защиты растений (ВНИИЗР, г. Санкт-Петербург) в Хабаровском крае был обнаружен новый штамм гриба, выделенный в чистую культуру из листьев бодяка полевого, пораженных пятнистостью. На основании совокупности морфолого-культуральных и филогенетических признаков гриб охарактеризован как *Paraphoma* sp. 1.46. Из экстрактов мицелия гриба было выделено мажорное соединение, проявившее высокий уровень гербицидной активности. Характеристики спектров ЯМР ^1H , ^{13}C , двумерные и УФ, а также масс-спектр и оптический угол вращения полностью соответствовали данным для соединения **2.1**, полученного Кларди. Таким образом была решена проблема доступности РРА для отечественных исследователей, что позволило с 2015 года в ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России В.В.Абзианидзе с сотрудниками и учеными других организаций развернуть систематическое изучение РРА [79]. В результате в 2015 году методом рентгеновской кристаллографии была определена молекулярная структура РРА и абсолютная конфигурация хиральных атомов углерода. В частности, было установлено, что феосферид А в кристалле существует в виде энантиомерной пары (I и II) (рисунок 2.2) [80]. Каждая молекула РРА (нумерация атомов произведена по Кларди [75], первооткрывателю этого соединения) содержит две основные части: алкильную группу C(9)-C(13) при атоме C(8) и 9-членный бициклический каркас, состоящий из пятичленного и шестичленного аннелированных гетероциклов.

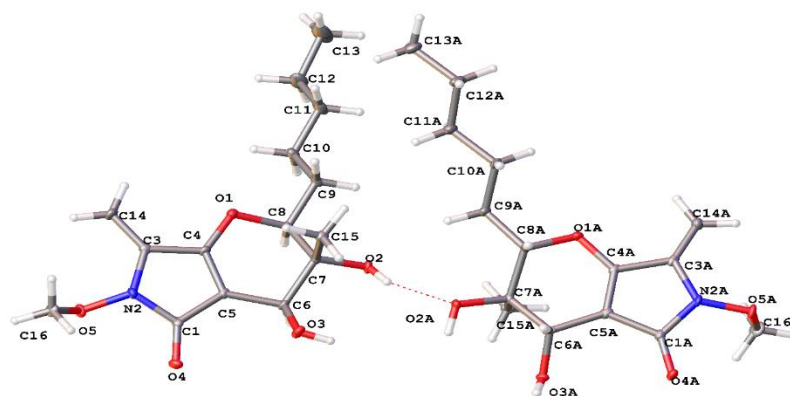


Рисунок 2.2 - Геометрия молекулы I (левая) и II (правая) PPA в кристалле.

Следует отметить, что нумерация атомов по Кларди является «исторической» и не соответствует номенклатуре ИЮПАК (рисунок 2.3).

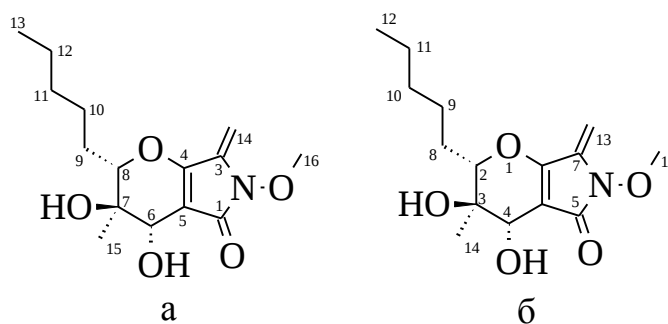


Рисунок 2.3 – Нумерация атомов PPA по Кларди (а) и номенклатуре ИЮПАК (б)

В кристалле молекула соединения **2.1** образует слоистую структуру (рисунок 2.4).

В 2012 году исследовательской группой Шарли [81] методами органического синтеза был получен PPA и диастереомерный ему феосферид В (PPB) **2.2**, отличающийся конфигурацией хирального атома C(4) (рисунок 2.4). В 2017 году Кобаяши [82] также синтезировал PPB. Следует отметить, что этот изомер наряду с PPA был выделен еще в 2006 году из экстрактов эндофитного гриба *Phaeosphaeria avenaria* 39 [75]. Кроме того, в 2015 году Сяо и сотрудники [83] выделили из *Paraphaeosphaeria neglecta* FT462 так называемый, парафеосферид С **2.3** (рисунок 2.5), который представляет собой N-деметоксилированный PPA (молекулярная масса 267.3208).

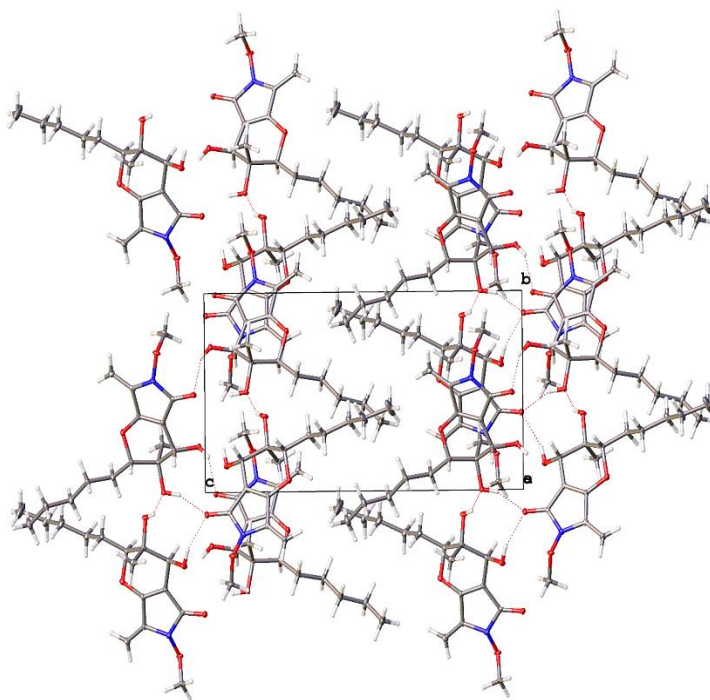


Рисунок 2.4 - Упаковка молекул РРА в кристалле на плоскости (001) (межмолекулярные взаимодействия между молекулами показаны пунктиром)

Это соединение ингибирует STAT3, оно активно на клеточных линиях A2780 и A2780cisR (устойчивая к цисплатину A2780) с IC_{50} 15 и 54,2 μM соответственно. Таким образом, парафеосферид С является потенциальным «веществом-лидером» для открытия новых противораковых лекарств наряду с РРА [77,78].

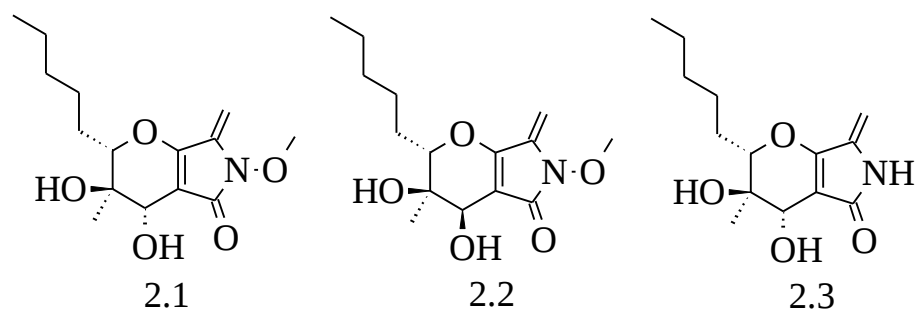


Рисунок 2.5 - Структурные формулы РРА 2.1, феосферид В 2.2 и парафеосферид С 2.3.

Как показано в литературном обзоре, производные природных соединений могут обладать повышенной противораковой активностью [8, 84]. В недавно выполненных исследованиях В.В. Абзианидзе и сотрудников было установлено [85, 86], что реакции, протекающие по азотсодержащему циклу РРА (с участием группы $N-OCH_3$ и экзоциклической связи $C=C$), приводят к

соединениям с более низкой цитотоксической активностью по сравнению с исходным субстратом. В то же время, введение фармакофорных группировок к атому C(4) обеспечивает более высокую цитотоксическую активность получаемых веществ по сравнению с цитотоксичностью исходного РРА. Поэтому в данной работе, осуществлен синтез серии производных феосферида А с участием гидроксильной группы при атоме C(4) гетероцикла и оценено влияние введенных структурных фрагментов в молекулах на цитотоксическую активность образующихся веществ.

Таким образом, цель данной работы - разработка методов синтеза C(4) - производных феосферида А путем введения фармакофорных групп и определение их противораковой активности.

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

Как известно [87], ацилирование органических соединений применяется для получения ацильных производных как целевых продуктов, а также для временного введения ацильной группы, чтобы сделать возможными последующие превращения ацилированного продукта, которые при наличии свободных групп ОН недостижимы или идут с трудом. Выбор ацилирующего агента зависит от относительной реакционной способности исходного соединения. Для ацилирования спиртов чаще всего используют ангидриды или более реакционноспособные галогенангидриды карбоновых кислот [87].

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 [88] в среде безводного хлористого метилена нами получены соответствующие 4-ω-хлорацетил-производные РРА **2.4** и **2.5** (схема 2.1). Хлорацетил-производное **2.4** ранее было получено в нашей лаборатории путем ацилирования РРА хлорацетилхлоридом в присутствии третичного амина (модификация Эйнхорна), который активирует ацилхлорид

за счёт образования ациламмонийной соли и нейтрализации образующегося HCl [89] и обнаружило несколько более высокую цитотоксичность, чем у исходного РРА **2.1**, на клеточной линии A549 (EC_{50} $33 \pm 7 \mu M$ и $46 \pm 7 \mu M$ соответственно) [90]. Необходимо было провести более широкое исследование цитотоксической активности этого соединения **2.4**, а кроме того нами планировалось использовать его в качестве исходного соединения для получения более сложно построенных производных РРА **2.1** путем замещения атома хлора в хлорметильной группе. Производное **2.5**, полученное впервые, использовано нами для сравнительной оценки влияния длины цепи ω -хлорацетоксильной группы на цитотоксическую активность соединения.

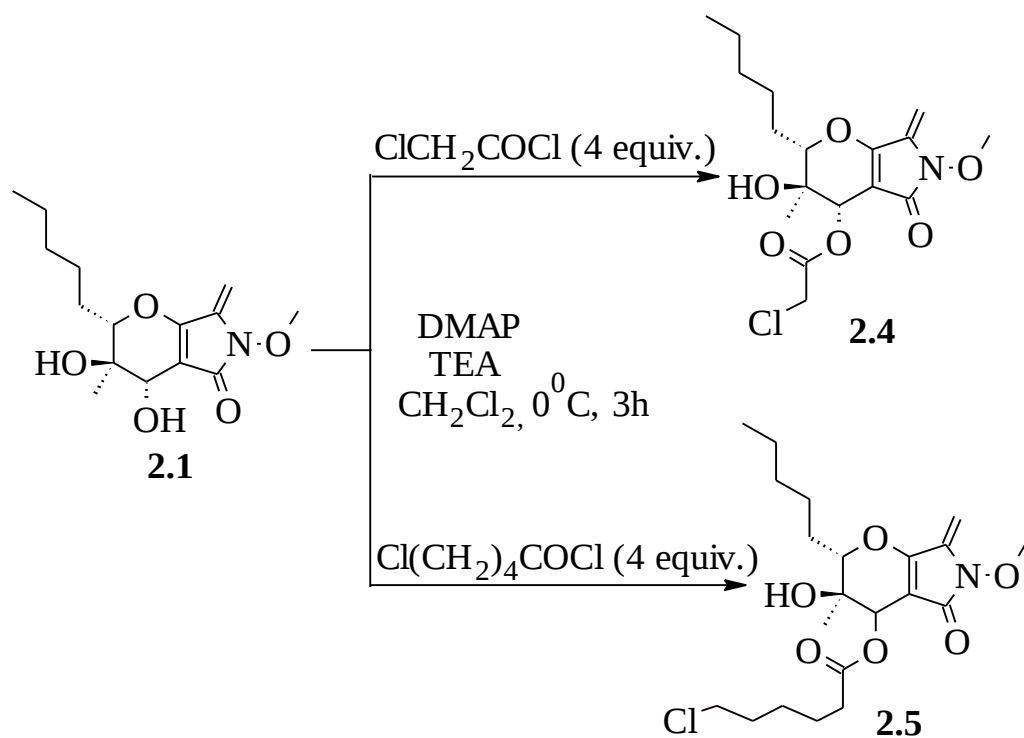


Схема 2.1 - Синтез соединений **2.4** и **2.5**

Строение ранее описанного (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-илхлорацетата **2.4**, выделенного нами с выходом 29%, подтверждено совпадением всех спектральных характеристик, в частности присутствием в спектре ЯМР 1H (рисунок 2.6) сигнала протонов метиленовой группы CH_2Cl в виде двух дуплетов с химическим сдвигом δ 4.42 и 4.51 м.д., Неэквивалентность протонов группы CH_2Cl связана, вероятно, с образованием

цикла за счет внутримолекулярных водородных связей между группой ОН при атоме С(3) и группой С=О хлорацетильного радикала.

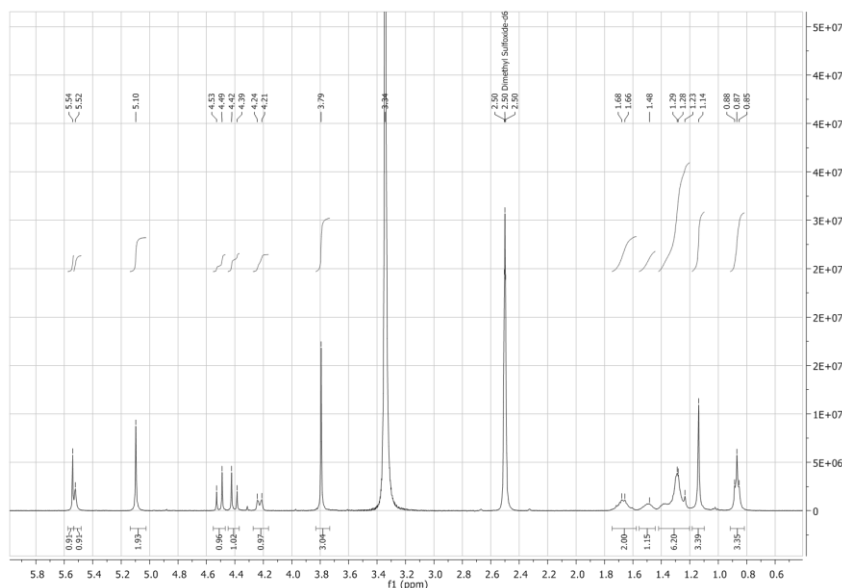


Рисунок 2.6 - Спектр ЯМР ^1H (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-илхлорацетата **2.4**

Впервые полученное соединение **2.5**, 3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-5-хлорпентаноат, образуется в результате реакции по данным ЯМР ^1H с выходом 85%. Из реакционной смеси оно выделено методом колоночной хроматографии (хлористый метилен - метанол 20:1) с выходом 38%, что объясняется сложностью метода выделения, а также малым количеством взятого в очистку вещества (36 мг).

Состав и строение соединения **2.5** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии (приложение А). Так, в спектре ЯМР ^1H (рисунок 2.7) сигнал с химическим сдвигом δ 2.33-2.62 м.д. соответствуют метиленовым протонам группы $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$, а с δ 1.73-1.86 м.д. - протонам двух метиленовых групп CH_2CH_2 . Протоны метиленовой группы CH_2Cl проявляются мультиплетом δ 3.56 м.д. Сигнал при δ 3.36 м.д. относится к протону группы ОН при атоме С(3). Сигналы с химическим сдвигом δ 5.06 и 5.02 м.д., 2J 1.4 Гц соответствуют этиленовым протонам связи $\text{C}=\text{CH}_2$. В спектре присутствуют также сигналы других протонов исходного РРА. О

введении δ -хлорвалерилоксильной группы к атому C(4) PPA 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.). Состав соединения **2.5** подтверждается значением пика $[\text{M}+\text{H}]^+$ в масс-спектре 416.18 Da. ИК спектр содержит полосы поглощения групп C=O (1726 см^{-1}) и C=C (1638 см^{-1}).

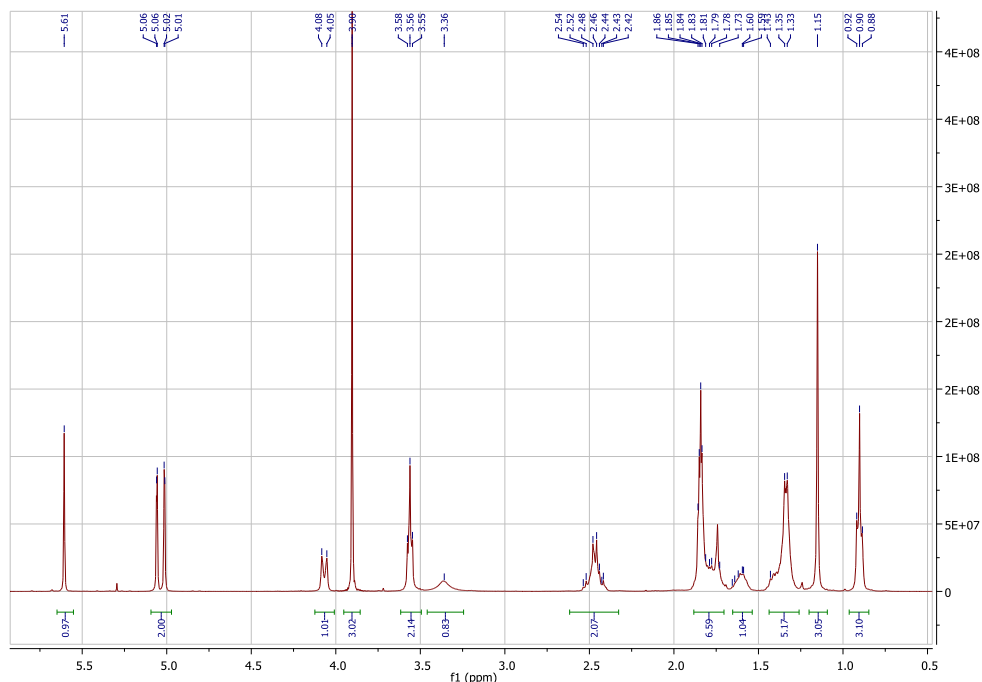


Рисунок 2.7 - Спектр ЯМР ^1H 3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-5-хлорпентаноата **2.5**

2.2 Замещение хлора в 4-хлорхлорацетилпроизводном PPA **2.4** на тиобензогетероциклические группы

Хлорацетоксильное производное PPA **2.4** использовано нами также в качестве промежуточного продукта для введения других фармакофорных группировок, в частности, азотсодержащих гетероциклов, путем реакций нуклеофильного замещения атома хлора.

Известно [91], что азотсодержащие гетероциклические соединения характеризуются широким спектром биологической активности. Так, производные бензимидазола обладают противомикробной, обезболивающей, противовоспалительной, анти-ВИЧ и противораковой активностью [92, 93].

Ядро бензоксазола входит в состав как природных, так и синтетических соединений, которые проявляют антибактериальные,

противовоспалительные, циклооксигеназные, ингибирующие, противовирусные, противораковые, противогрибковые и антигельминтные свойства. Например, бензоксазол является составной частью флуноксапрофена **2.6** (рисунок 2.8), нестероидного противовоспалительного лекарственного средства [94].

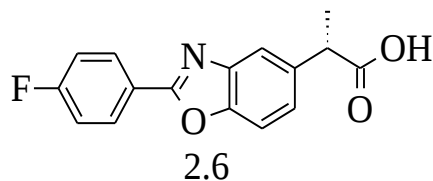


Рисунок 2.8 - Структурная формула флуноксапрофена **2.6**

К важным и широко используемым в органическом синтезе, в частности в медицинской химии, 1,3-гетероазольным циклическим соединениям относятся 2-меркаптобензогетероциклы (рисунок 2.9).

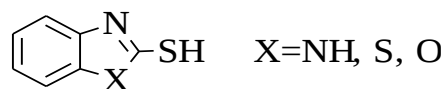


Рисунок 2.9 - Структурная формула 2-меркапто-1,3-циклогетероазолов

Так, присутствие 2-тиобензотиазольного фрагмента в молекулах многих веществ обеспечивает их противовирусные, противомикробные, противосудорожные, антиоксидантные, а также противораковые свойства [88, 95-97].

В общем, гетероциклические тиолаты характеризуются как электронообогащенные и многофункциональные лиганды, которые обнаруживают различные виды координации и образуют мономерные или полимерные комплексы, в результате чего, например, 2-тио-1,3-гетероазольные лиганды играют важную роль в медицине [98].

Различные тиолы, 2-меркаптобензоксазол, 2-меркаптобензимидазол и 2-меркаптобензотиазол, будучи строительными блоками при получении терапевтических субстанций, способствовали появлению или интенсификации различных видов биологической активности содержащих их

веществ: противовирусной, противомикробной, противосудорожной, антиоксидантной [99, 100] и противораковой [99, 101, 102].

Введение тиобензогетероазольных фрагментов в молекулу РРА осуществлено нами [103] взаимодействием 4(2-хлор)ацетоксильного производного РРА **2.4** с соответствующими меркаптобензогетероциклическими соединениями, содержащими два атома азота, азот и серу, азот и кислород в кольце, что позволило оценить, какой из гетероатомов в гетероциклическом заместителе в большей степени влияет на биологическую активность производных РРА (схема 2.2) [104].

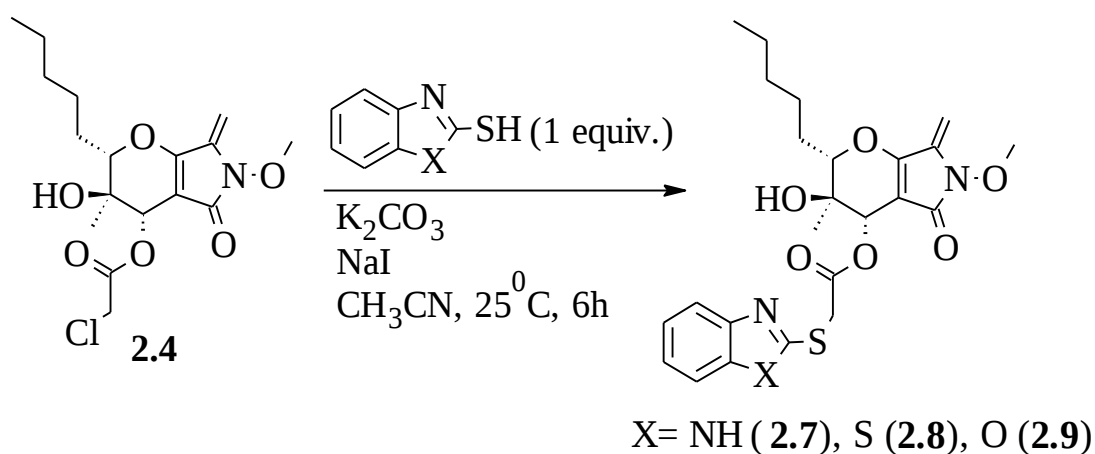


Схема 2.2 - Синтез тиобензогетероциклических производных РРА **2.7-2.9**

Реакции замещения хлора в соединении **2.4** осуществляли в присутствии карбоната калия и иодистого натрия с использованием ацетонитрила в качестве растворителя. Карбонат калия 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. Иодистый натрий за счет обмена хлора в хлорацетоксильном радикале на иод ускоряет реакцию и препятствует образованию побочных продуктов с дисульфидной связью.

Полученные соединения: (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1Н-бензимидазол-2-илтио)ацетат **2.7**, (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-

4-ил-(1,3-бензотиазол-2-илтио)ацетат **2.8**, (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензоксазол-2-илтио)ацетат **2.9** в результате реакций образовывались по данным ЯМР ^1H с выходами 75-85%. Методом препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования они получены в чистом виде с выходами от 25 до 40%. Незначительный выход выделенных продуктов связан с малым количеством используемых исходных веществ (от 80 до 150 мг).

Состав и строение соединений **2.7**, **2.8**, **2.9** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии (приложение А). Так, например, в спектре ЯМР ^1H соединения **2.7** отсутствует сигнал группы CH_2Cl (δ 4.42 и 4.51 м.д.) исходного соединения **2.4**, а сигнал группы S-CH_2 с химическим сдвигом δ 3.86 м.д. накладывается на сигналы исходного РРА (рисунок 2.10). Химические сдвиги протонов феосферидного каркаса практически не отличаются от их положения в спектре исходного соединения **2.4**. Сигналы протонов введенного гетероциклического фрагмента представлены мультиплетом δ 7.20-7.60 м.д. О введении тиобензоимидазольной группы вместо атома хлора свидетельствует также присутствие в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп C(=O) (δ 165.05 м.д.) и SCH_2 (δ 64.74 м.д.), при отсутствии сигнала группы CH_2Cl . Состав соединения **2.7** подтверждается значением пика $[\text{M}+\text{H}]^+$ в масс-спектре 488.18 Да. ИК спектр содержит полосы поглощения групп C=O (1722 см^{-1}) и C=C (1637 см^{-1}).

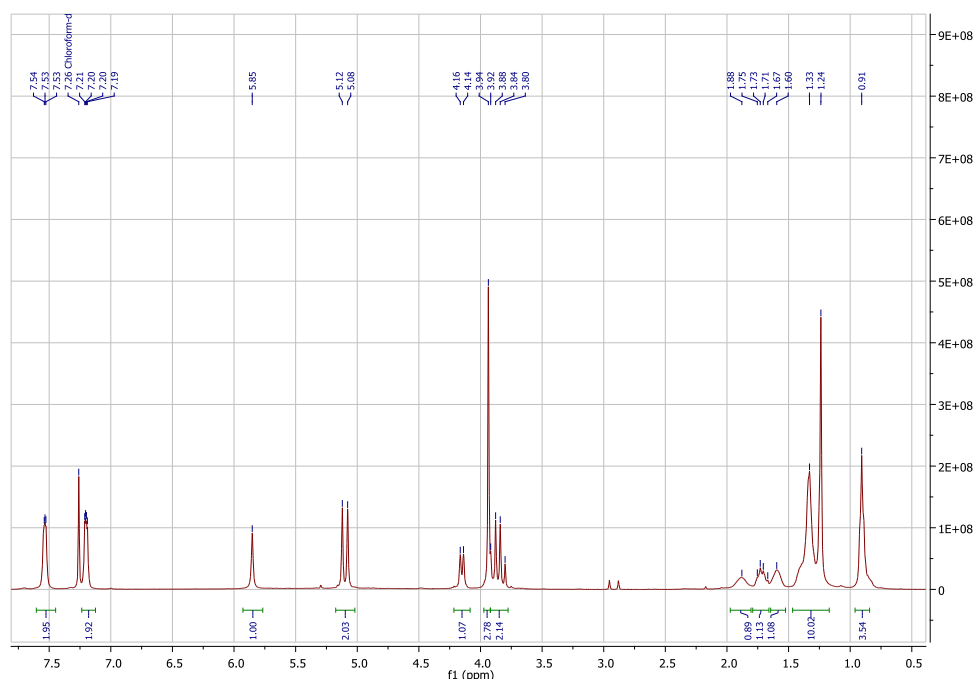


Рисунок 2.10 - Спектр ЯМР ^1H (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензоксазол-2-илтио)- ацетата **2.7**

Аналогичные спектральные данные характерны для соединений **2.8** и **2.9** (см. приложение А и экспериментальную часть).

2.2.1 Замещение хлора в 4-хлорхлорацетилпроизводном РРА **2.4** на циклогетерилсульфидные группы

Известно [105], что введение циклогетерилсульфидных групп в природные соединения увеличивает их биологическую активность. Так, наличие S-азагетероциклических группировок в арилэтанонах обеспечивает ингибирование роста раковых клеток толстой кишки HT-29 на уровне фторурацила [106].

Введение S-азагетероциклических фрагментов в молекулу РРА осуществлено нами по той же методике, как и в случае S-бензогетероциклических производных **2.7-2.9** [103]. В качестве исходных азотсодержащих гетероциклических тиолов использованы пяти- и шестичленные циклические тиолы, содержащие в гетероцикле различное количество атомов азота и относящиеся к известным фармакоформным группировкам (ди-, три- и тетразольные, пиридиновые и пиримидиновые).

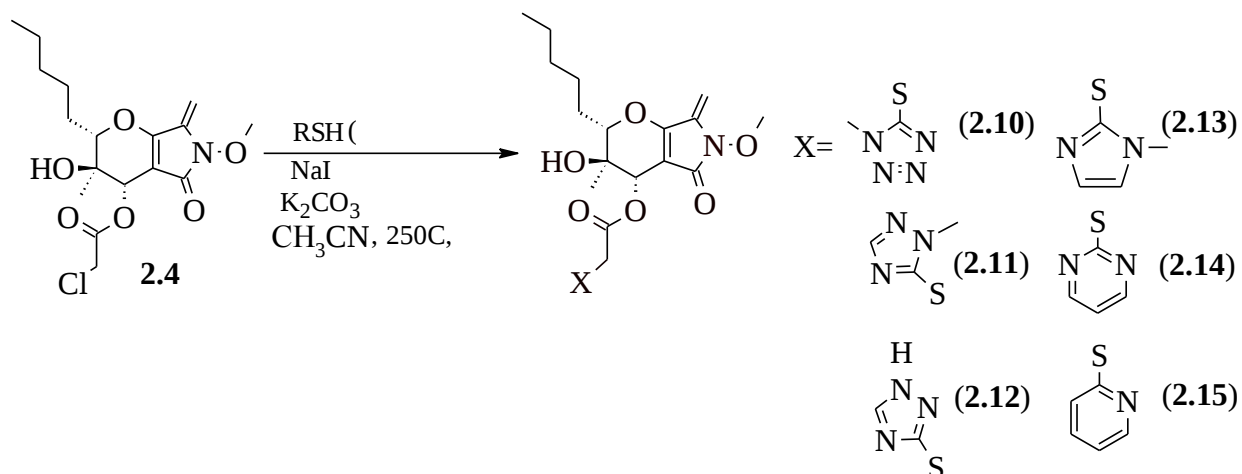


Схема 2.3 - Синтез производных РРА взаимодействием соединения **2.4** с азотсодержащими циклическими тиолами

Синтезирован ряд производных РРА (схема 2.3) [107]: (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1H-тетразол-5-ил)тио]ацетат **2.10**, (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(4H-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетат **2.11**, (2S,3R,4S)-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(1H-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетат **2.12**, (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-(2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1H-имидазол-2-ил)тио]ацетат **2.13**, (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(пиримидин-2-илтио)ацетат **2.14**, (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(пиридин-2-илтио)ацетат **2.15**, содержание которых в реакционных смесях по данным ЯМР ^1H составляет 70-80 %. В чистом виде из реакционной смеси они выделены методом колоночной хроматографии (хлористый метилен - метанол 100:1) с выходами 12-18%, что объясняется значительными потерями при препаративном хроматографическом методе выделения, а также очень малыми количествами неочищенного вещества (около 50 мг).

Состав и строение производных РРА **2.10-2.15** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии (приложение А).

Так, в спектре ЯМР ^1H соединения **2.10**, содержащего S-2-метилтетразольную группировку (рисунок 2.11) сигнал группы CH_3 метилтетразольного заместителя проявляется в виде синглета при δ 3.96 м. д., а сигнал протонов группы SCH_2 - мультиплетом при δ 4.06-4.10 м.д. Протон гидроксильной группы при атоме C(3) проявляется уширенным сигналом δ 3.78 м.д. Этиленовым протонам связи $\text{C}=\text{CH}_2$ соответствуют сигналы с химическим сдвигом δ 5.02 и 5.06 м.д., 2J 1.4 Гц, мало отличающиеся от их положения в исходном соединении **2.4**. О наличии S-тетразолилацетоксильной группы в соединении **2.10** свидетельствует присутствие в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп C(O) (δ 164.68 м.д.) и S- CH_2 (δ 64.86 м.д.). Состав соединения **2.10** подтверждается значением пика $[\text{M}+\text{H}]^+$ в масс-спектре 439.16 Da. ИК спектр содержит полосы поглощения групп C=O (1734 см^{-1}) и C=C (1636 см^{-1}).

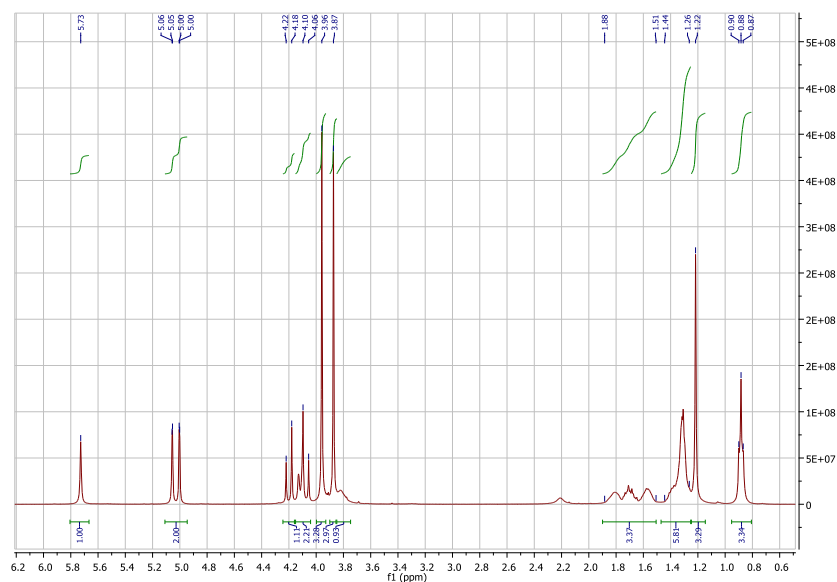


Рисунок 2.11 - Спектр ЯМР ^1H (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано [2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)тио]ацетата **2.10**

Строение триазольных производных **2.11** и **2.12** подтверждено данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии. Так, в спектре ЯМР ^1H соединения **2.12** (рисунок 2.12) сигналу триазольного кольца соответствует

химический сдвиг δ 8.16 м.д. Сигналы с химическим сдвигом δ 5.06 и 5.02 м.д., 2J 1.4 Гц принадлежат двум этиленовым протонам связи $C=CH_2$. Сигнал метиленовой группы SCH_2 проявляется мультиплетом δ 3.94-3.97 м.д. Присутствие S-триазиолилацетоксильной группы в составе соединения **2.12** подтверждается наличием в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп $C(O)$ (δ 164.68 м.д.), SCH_2 (δ 64.66 м.д.) и гетероароматического кольца. Сохранение ацильной группы и неизменность феоcферидного каркаса подтверждается ИК спектром, который содержит полосы поглощения групп $C=O$ (1720 см^{-1}) и $C=C$ (1637 см^{-1}). Значение пика $[M+H]^+$ в масс-спектре 454.17 Да соответствует составу соединения **2.12**. Аналогичные данные характерны для соединения **2.11**, в спектрах ЯМР 1H и ^{13}C которого дополнительно присутствуют сигналы протонов и углерода группы NCH_3 (δ_H 3.97 м.д., δ_C 33.85 м.д.).

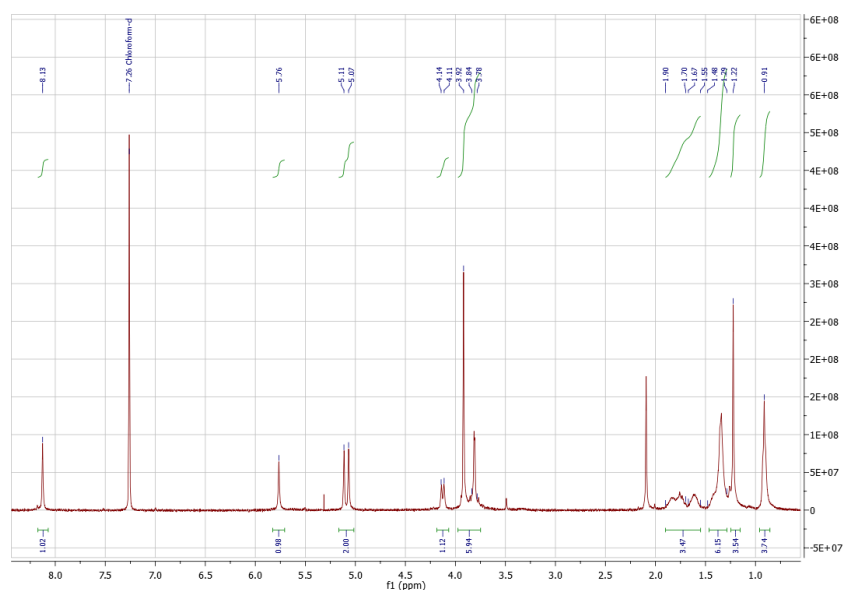


Рисунок 2.12 - Спектр ЯМР 1H (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(4H-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата **2.12**

В спектре ЯМР 1H соединения **2.13** (рисунок 2.13) сигнал с химическим сдвигом δ 6.97-7.03 м.д. соответствует ароматическим протонам имидазольного кольца, а при δ 3.73 м.д. - метильной группе метилимидазольного кольца. Сигнал метиленовой группы SCH_2 проявляется

синглетом δ 3.61 м.д. Двум этиленовым протонам связи $C=CH_2$ принадлежат сигналы с химическим сдвигом δ 5.06 и 5.02 м.д., 2J 1.4 Гц, а протону гидроксильной группы при атоме C(3) - уширенный синглет δ 6.76 м.д. Спектр ЯМР ^{13}C подтверждает наличие в соединении **2.13** атомов углерода групп C(O) (δ 164.66 м.д.), SCH_2 (δ 64.59 м.д.) и гетероароматического кольца. Составу соединения **2.13** соответствует значение пика $[M+H]^+$ в масс-спектре, равное 452.19 Da. ИК спектр содержит полосы поглощения групп C=O (1739 см^{-1}) и C=C (1637 см^{-1}).

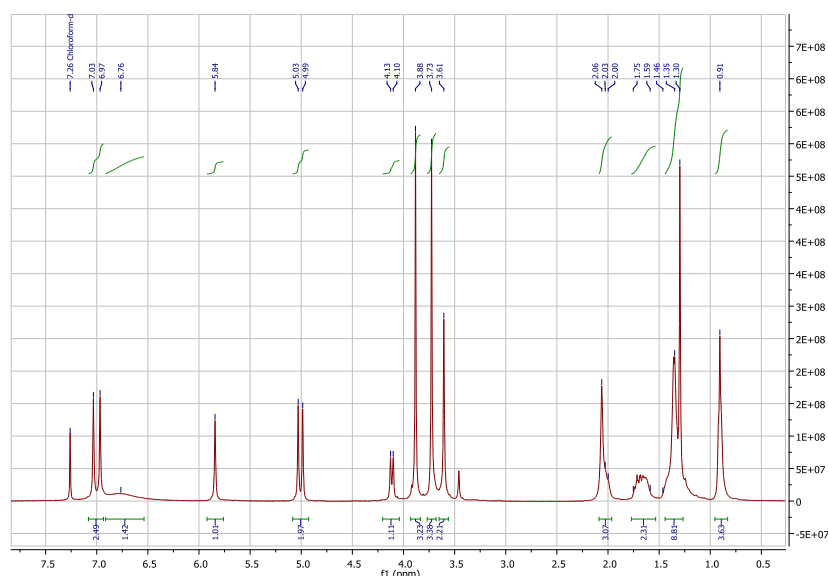


Рисунок 2.13 - Спектр ЯМР 1H (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1H-имидазол-2-ил)тио]ацетата **2.13**

В спектре ЯМР 1H соединения **2.14** (рисунок 2.14) сигналы протонов пиримидинового кольца проявляются при δ 6.98 и 8.50 м.д., J 4.8 Гц. Этиленовым протонам связи $C=CH_2$ соответствуют сигналы с химическим сдвигом δ 5.06 и 5.02 м.д., 2J 1.4 Гц. Сигнал метиленовой группы SCH_2 проявляется мультиплетом δ 3.98-4.02 м.д., а протона гидроксильной группы при атоме C(3) - синглетом δ 3.35 м.д. О введении пиримидиновой группы в молекулу исходного соединения **2.4** свидетельствует также присутствие в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп C(O) (δ 164.70 м.д.), SCH_2 (δ 64.65 м.д.) и гетероароматического кольца. Состав соединения **2.14** подтверждается значением пика $[M+H]^+$ в масс-спектре 450.16 Da. Полосы

поглощения групп C=O (1724 см^{-1}) и C=C (1636 см^{-1}) в ИК спектре также соответствуют структуре соединения **2.14**.

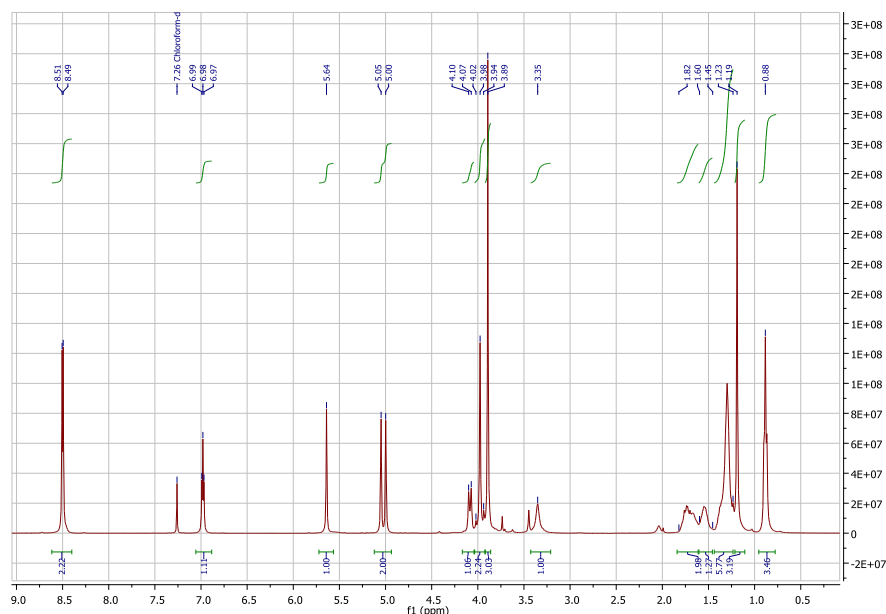


Рисунок 2.14 - Спектр ЯМР ^1H (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил (пиримидин-2-илтио)ацетата **2.14**

В спектре ЯМР ^1H соединения **2.15** (рисунок 2.15), полученного замещением хлора на тиопиридиновую группу, сигналы протонов пиридинового кольца проявляются в диапазонах δ 6.98-7.03, 7.48-7.53, 8.37-8.40 м.д, сигнал протонов группы SCH_2 представлен мультиплетом δ 4.04-4.09 м.д. Сигналы с химическим сдвигом δ 5.06 и 5.02 м.д., 2J 1.4 Гц соответствуют двум этиленовым протонам связи $\text{C}=\text{CH}_2$. О введении тиопиридиновой группы в ацетоксильный заместитель у атома C(4) PPA свидетельствует присутствие в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп C(O) (δ 164.66 м.д.), SCH_2 (δ 64.68 м.д.) и гетероароматического кольца. Значение пика $[\text{M}+\text{H}]^+$ в масс-спектре соединения **2.15**, равное 449.17 Da, подтверждает его состав. В ИК спектре содержатся полосы поглощения групп C=O (1727 см^{-1}) и C=C (1638 см^{-1}).

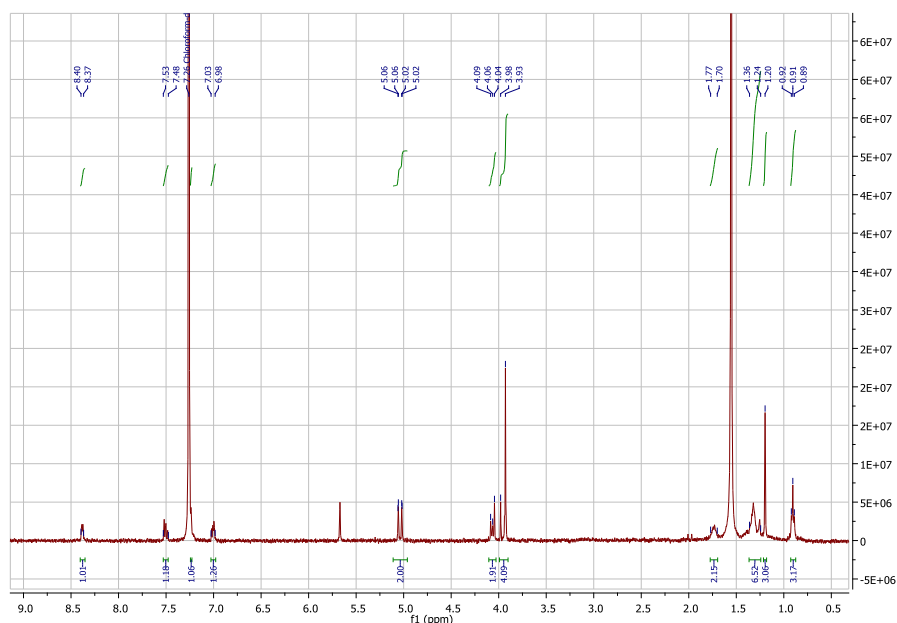


Рисунок 2.15 - Спектр ЯМР ^1H (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано [2,3-с]пиррол-4-ил (пиридин-2-илтио)ацетата **2.15**

2.3 Синтез 4-аминопроизводных РРА через 4-метансульфонатное производное РРА

Для введения аминогрупп в положение 4 бициклического каркаса РРА нами предложен и реализован двухстадийный путь (схема 2.4), включающий первоначальное получение метансульфонатного производного РРА **2.17** взаимодействием РРА с метансульфохлоридом с последующим замещением хорошо уходящей мезилатной группы при действии избытка амина. Процесс осуществляли без выделения в индивидуальном виде соединения **2.17**.

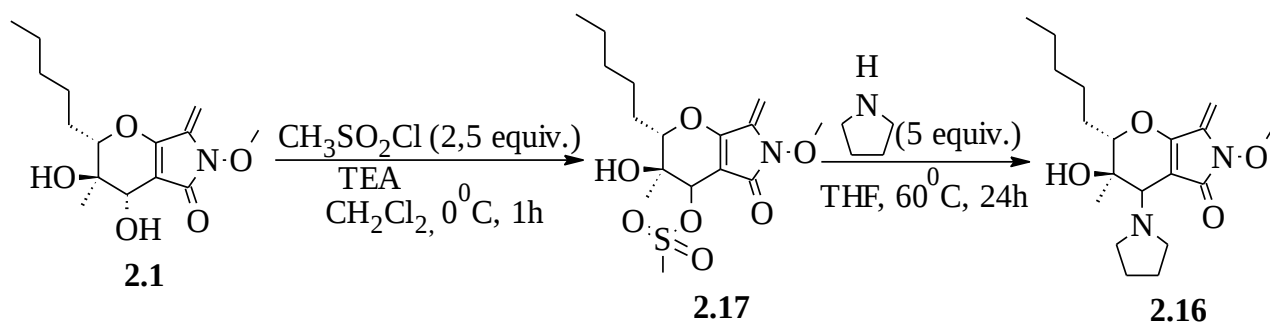


Схема 2.4 - Синтез 3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-4-пирролидин-1-ил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.16** через 4-метансульфонатное РРА

Ранее 4-пирролидиновое производное РРА **2.16**, которое обнаружило высокую противоопухолевую активность на нескольких линиях раковых клеток, было получено с неприемлемо низким выходом (12%) путем замещения хлорацетоксильной группы соединения **2.4** (схема 2.5) [90].

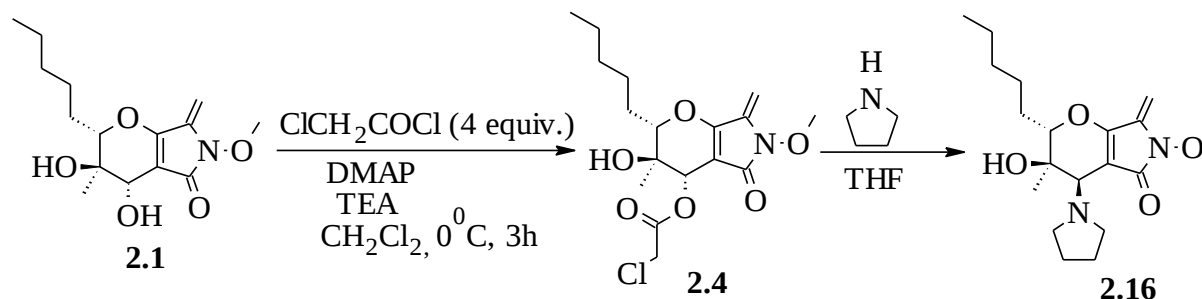


Схема 2.5 - Синтез (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-4-пирролидин-1-ил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.16** через 4-хлорацетилпроизводное РРА

При получении целевого продукта - 3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-4-пирролидин-1-ил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.16** - по предложенному нами способу его содержание в реакционной смеси по данным ЯМР ^1H спектроскопии составляло около 70%. В результате очистки методом препаративной ВЭЖХ оно получено в чистом виде с выходом 27%. На первой стадии процесс осуществляли в атмосфере аргона в хлористом метиле при 0°C в течение 1 часа, используя 2.5-кратный избыток метансульфохлорида и триэтиламин для связывания выделяющегося хлороводорода. После удаления растворителя и избытка метансульфохлорида при пониженном давлении реакционную смесь, содержащую 4-мезилатное производное РРА **2.17**, растворяли в тетрагидрофуране, добавляли 5-кратный избыток пирролидина и перемешивали при 60°C в закрытой ампуле в течение 12 часов. Целевой продукт **2.16** выделяли методом препаративной ВЭЖХ в условиях изократического элюирования (ацетонитрил – муравьиная кислота 30:1).

Соединение **2.16** идентифицировано с помощью ИК, ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии (приложение А) по полному соответствию всех характеристик характеристикам этого же соединения, полученного ранее из 4-

хлорацетоксильного производного РРА **2.4**. Данные по цитотоксичности полученного по новому способу соединения **2.16** характеризуются высокими значениями и приводятся ниже.

Успешное замещение мезилатной группы в соединении **2.17** на пиррольную группу позволило нам распространить эту реакцию на другие амины как циклического, так и открытого строения. Целесообразность расширения круга 4-N-аминозамещенных РРА обусловлена необходимостью оценить влияние природы аминогруппы на противоопухолевую активность таких соединений.

В качестве первичных аминов нами использованы метиламин, 2-аминоэтанол, 4-амино-1-бутанол, аллиламин, бензиламин, отличающиеся строением радикала, с которым связана группа NH_2 , и основностью. Кроме того, такие аминогруппы присутствуют в составе многих биологически активных веществ.

Экспериментальные условия проведения реакций метансульфонатного производного РРА **2.17** с указанными аминами аналогичны тем, в которых осуществляли синтез соединения **2.16**: избыток амина, растворитель – ТГФ, температура процесса 60°C , время реакции 12 часов. Установлено, что более низкая основность первичных аминов по сравнению с пирролидином не приводит к существенным отличиям в протекании этих реакций. В результате нами получены [108] (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-4-метиламино-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.18**, (2S,3R,4R)-3-гидрокси-4-[(2-гидроксиэтил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.19**, 3-гидрокси-4-[(4-гидроксибутил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.20**, 4-диэтиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.21**, 4-бензиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.22** (схема 2.6), содержание которых в реакционных смесях составляло по данным ЯМР ^1H 75-

80%. В чистом виде соединения **2.18-2.22** выделены методом препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования с выходами 14-25%. Низкий выход продуктов связан главным образом с малыми количествами веществ (около 50 мг до очитки).

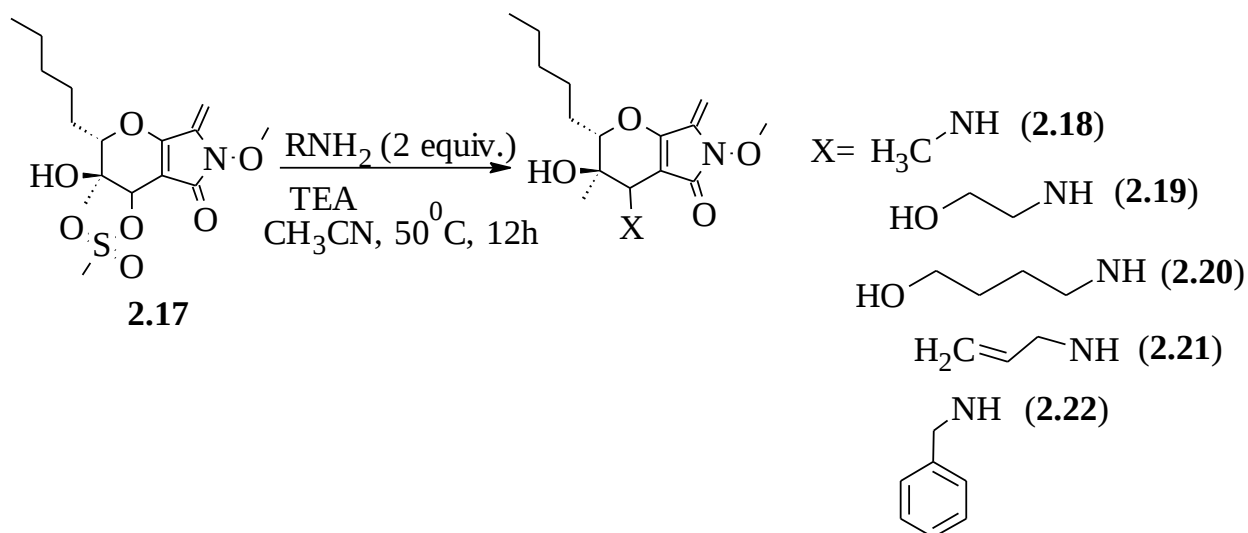


Схема 2.6 - Получение аминопроизводных РРА **2.18-2.22** на основе первичных аминов

Состав и строение соединений **2.18-2.22** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии (приложение А). Для соединений **2.18**, **2.19** отнесение сигналов в ЯМР спектрах уточнено с помощью двумерного ROESY эксперимента. Так, в спектре соединения **2.18** (рисунок 2.16) имеются кросс-пики между метиновым протоном при C(4) с δ 4.05 и протонами метильной группы при C(3) с δ 1.15. Сигнал с δ 2.75 м.д. соответствует метильным протонам группы N-CH₃. В спектре соединения **2.19** (рисунок 2.17) имеются кросс-пики между метиновым протоном при C(4) с δ 3.12 м.д. и протонами метильной группы при C(3) с δ 1.06 м.д. Это означает, что аминогруппа соединений **2.18** и **2.19** находится по одну сторону от плоскости гетероцикла с гидроксильной группой при атоме C(3).

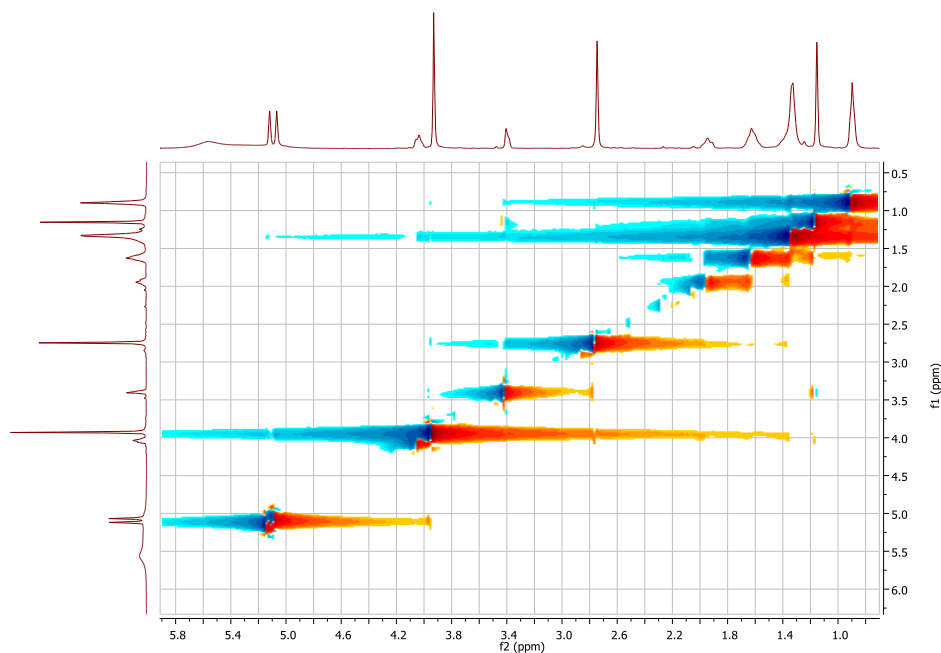


Рисунок 2.16 - Спектр ROESY ^1H - ^1H (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-4-метиламино-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.18**

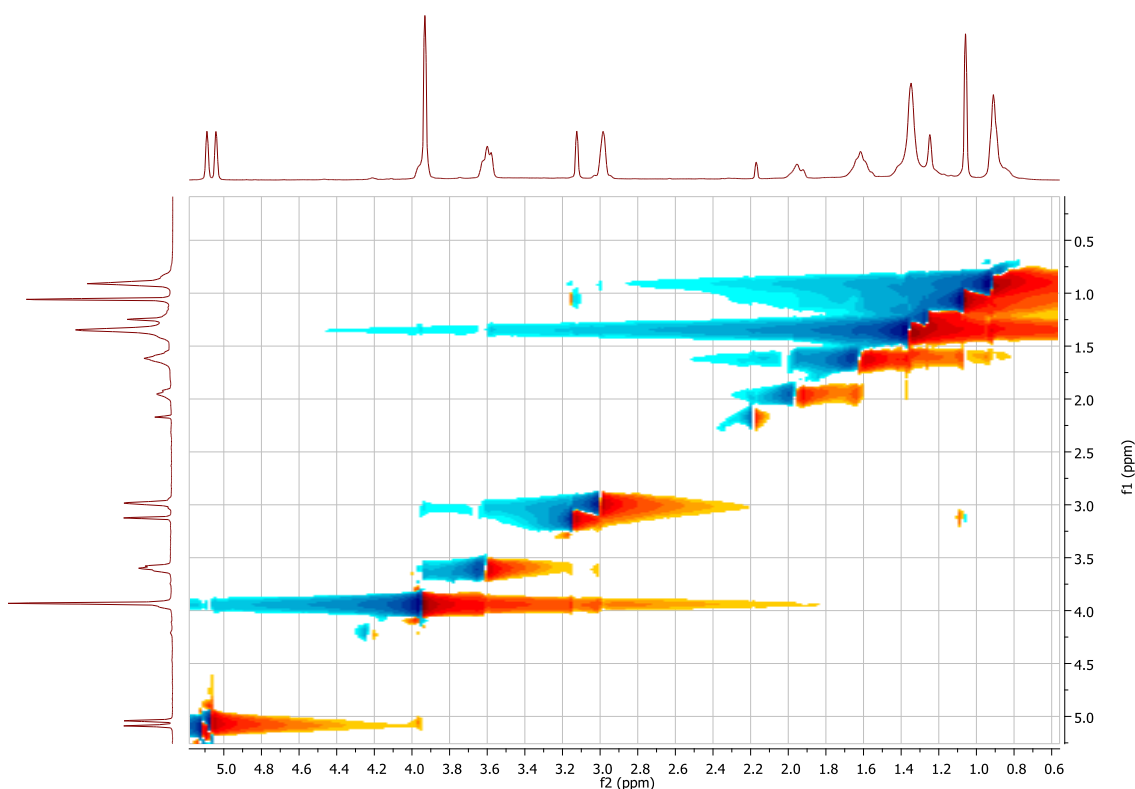


Рисунок 2.17 - Спектр ROESY ^1H - ^1H (2S,3R,4R)-3-гидрокси-4-[(2-гидроксиэтил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.19**

О введении метиламиногруппы к атому C(4) РРА свидетельствует присутствие в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атома углерода группы NCH_3 (δ 33.50

м.д.). Состав соединения **2.19** подтверждается значением пика $[M+H]^+$ в масс-спектре 311.19 Da. ИК спектр содержит полосы поглощения групп C=O (1721 см^{-1}) и C=C (1633 см^{-1}).

О введении 2-гидроксиэтиламиногруппы к атому C(4) PPA свидетельствует присутствие в спектре ЯМР ^{13}C соединения **2.19** сигналов атома углерода группы NCH_2 ($\delta\ 52.07$ м.д.). Состав подтверждается значением пика $[M+H]^+$ в масс-спектре 341.20 Da. ИК спектр содержит полосы поглощения групп C=O (1718 см^{-1}) и C=C (1633 см^{-1}).

В спектре ЯМР ^1H соединения **2.20** (рисунок 2.18) сигнал с химическим сдвигом $\delta\ 3.27\text{--}3.12$ м.д. соответствует протону группы NH, а мультиплет $\delta\ 4.94$ м.д. - протону группы OH. Сигналы с химическим сдвигом $\delta\ 5.06$ и 5.02 м.д., $^2J\ 1.4$ Гц принадлежат двум этиленовым протонам связи $\text{C}=\text{CH}_2$. О введении 4-гидроксibuтиламиногруппы к атому C(4) PPA свидетельствует присутствие в спектре ЯМР ^{13}C сигнала атома углерода группы NCH_2 ($\delta\ 48.77$ м.д.). Значение пика $[M+H]^+$ в масс-спектре, равное 369.23 Da, подтверждает состав соединения **2.20**. В ИК спектре имеются полосы поглощения групп C=O (1712 см^{-1}) и C=C (1632 см^{-1}).

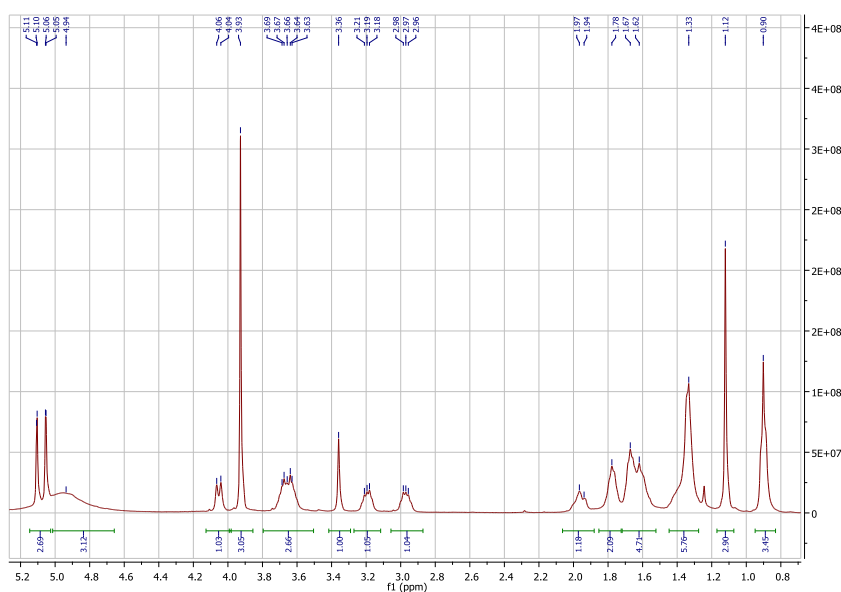


Рисунок 2.18 - Спектр ЯМР ^1H 3-гидрокси-4-[(4-гидроксibuтил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.20**

В спектре ЯМР ^1H соединения **2.21** (рисунок 2.19) метиленовые протоны группы CH_2NH проявляется в виде мультиплета δ 5.89 м.д., олефиновые протоны аллильной группы представлены дуплетом дублетов δ 5.25 м.д., 2J 17.2 Гц и мультиплетом δ 5.12 м.д. Сигнал протона NH группы имеет химический сдвиг δ 3.03 м.д. Сигналы с химическим сдвигом δ 5.02 и 5.06 м.д., 2J 1.4 Гц соответствуют двум этиленовым протонам экзоциклической связи $\text{C}=\text{CH}_2$. Введение аллиламиногруппы к атому C(4) PPA подтверждается также данными спектра ЯМР ^{13}C , в котором присутствуют сигналов атомов углерода групп NCH_2 (δ 52.14 м.д.) и $\text{CH}_2\text{-CH}$ (δ 117.05 м.д.). Составу соединения **2.21** соответствует значение пика $[\text{M}+\text{H}]^+$ в масс-спектре 377.21 Da. ИК спектр содержит полосы поглощения групп $\text{C}=\text{O}$ (1720 см^{-1}) и $\text{C}=\text{C}$ (1634 см^{-1}).

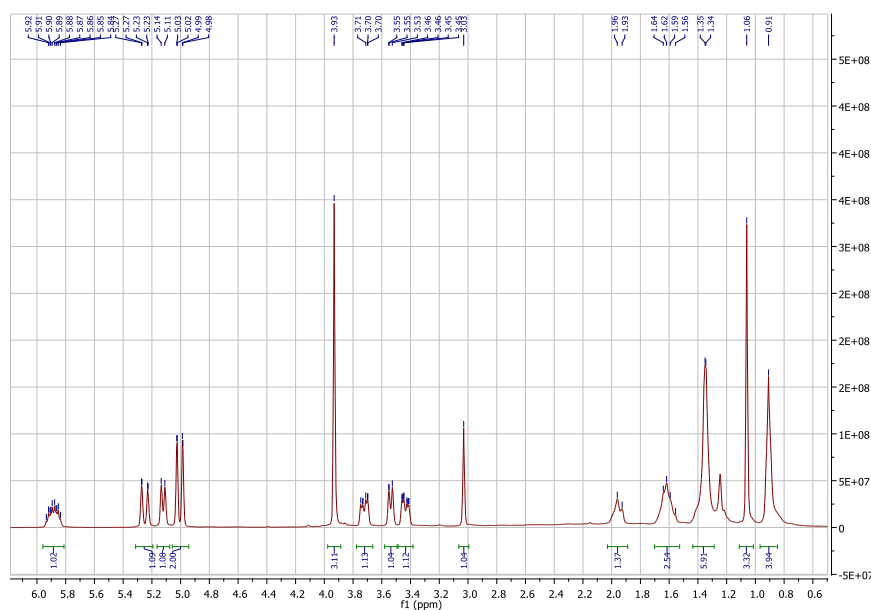


Рисунок 2.19 - Спектр ЯМР ^1H 4-(аллиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он аллиламина **2.21**

В спектре ЯМР ^1H соединения **2.22** (рисунок 2.20) сигналы пяти протонов бензольного кольца проявляются мультиплетом с химическим сдвигом δ 7.26-7.39 м.д. Сигнал протона группы NH имеет химический сдвиг δ 3.12 м.д. Этиленовым протонам экзоциклической связи $\text{C}=\text{CH}_2$ соответствуют сигналы с химическим сдвигом δ 5.02 и 5.06 м.д., 2J 1.4 Гц. О введении бензиламиногруппы к атому C(4) PPA свидетельствует присутствие

в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп NCH_2 (δ 53.62 м.д.) и ароматического кольца (δ 127.47, 128.57, 128.65, 139.35 м.д.). Состав соединения **2.22** подтверждается значением пика $[\text{M}+\text{H}]^+$ в масс-спектре 387.22 Da. ИК спектр содержит полосы поглощения групп $\text{C}=\text{O}$ (1720 см^{-1}) и $\text{C}=\text{C}$ (1633 см^{-1}).

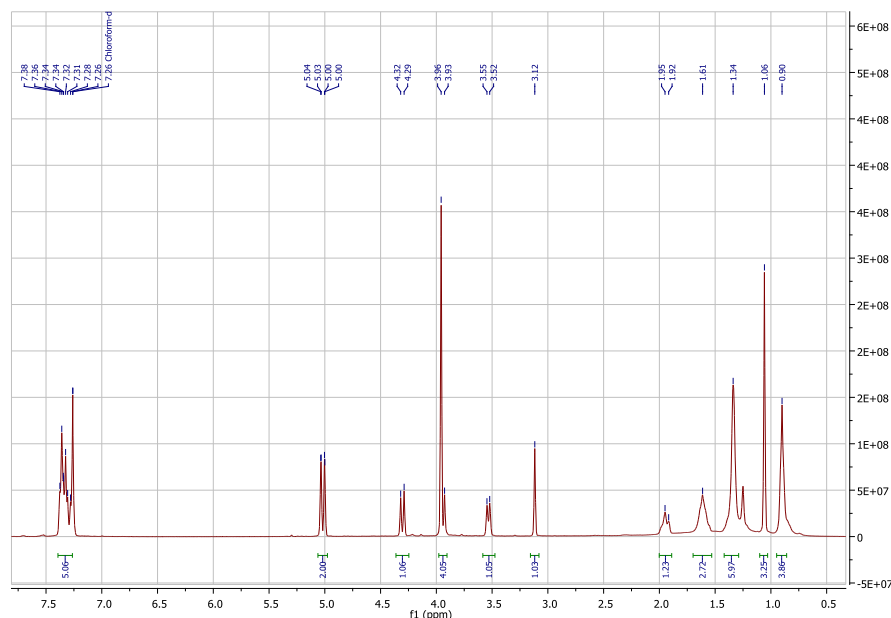


Рисунок 2.20 - Спектр ЯМР ^1H 4-(бензиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.22**

В качестве вторичных аминов для замещения мезилатной группы в соединении **2.17** нами использованы как циклические, так и открытоцепные амины.

Так, в описанных выше условиях удалось успешно осуществить реакции 4-метансульфонатного производного РРА **2.17** с пирролидинпиперидином и 4-гидроксипиридином (схема 2.7). Однако выход целевых продуктов: (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-4-(4-пирролидин-1-илпиперидин-1-ил)-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-она **2.23** и 3-гидрокси-4-(4-гидроксипиперидин-1-ил)-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.24** – в данном случае оказался ниже, чем в реакциях с участием первичных аминов. В чистом виде соединения **2.23**, **2.24** выделены методом

препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования с выходами 11% и 16% соответственно.

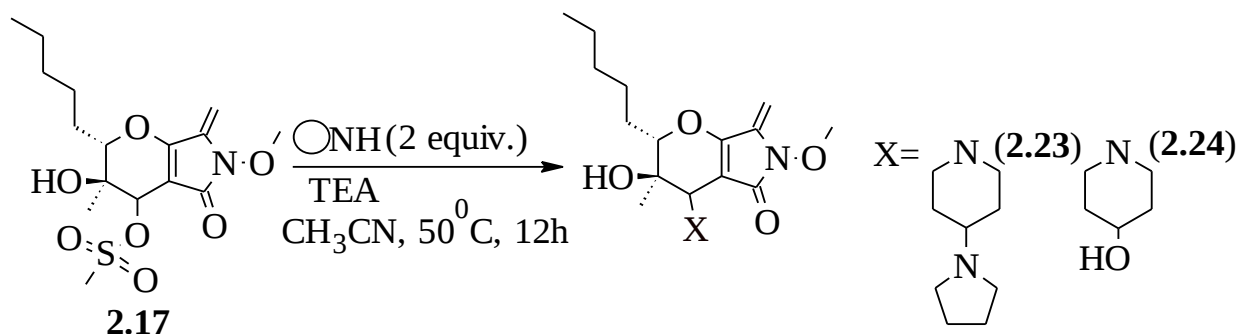


Схема 2.7 - Получение вторичных аминопроизводных РРА **2.23** и **2.24**

Состав и строение соединений **2.23**, **2.24** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии (приложение А). Отнесение сигналов в спектре ЯМР ^1H на примере соединения **2.23** уточнено с помощью двумерного ROESY эксперимента (рисунок 2.21), в котором обнаруживается кросс-пик между метиновым протоном при атоме C(4) с δ 3.29 и протонами метильной группой при атоме C(3) с δ 1.02.

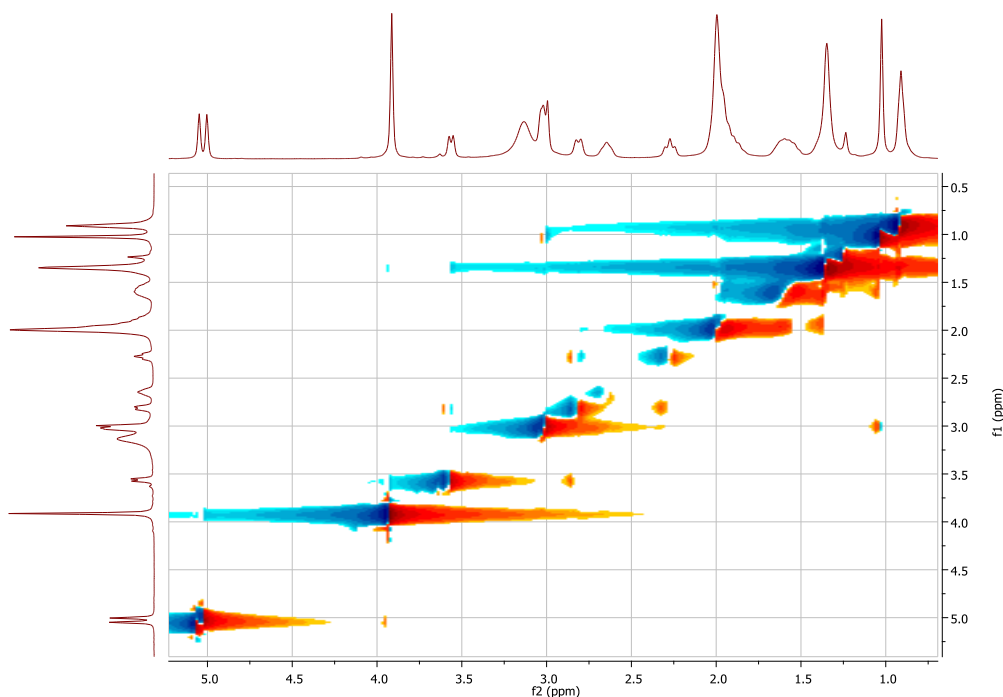


Рисунок 2.21 - Спектр ROESY ^1H - ^1H (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метил-2-пентил-4-(4-пирролидин-1-илпиперидин-1-ил) -3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5 (2H)-он **2.23**

Это означает, что пирролидинпиперидиновый заместитель соединения **2.23** находится по одну сторону от плоскости гетероцикла с гидроксильной группой при атоме C(4). О присутствии пирролидинпиперидильной группы у атома C(4) свидетельствуют сигналы атомов углерода групп N-CH (δ 55.67 м.д.) и N-C (δ 62.51 м.д.) в спектре ЯМР ^{13}C . Состав соединения **2.23** подтверждается значением пика $[\text{M}+\text{H}]^+$ в масс-спектре 434.30 Da. ИК спектр содержит полосы поглощения групп C=O (1724 см^{-1}) и C=C (1635 см^{-1}).

В спектре ЯМР ^1H соединения **2.24** (рисунок 2.22) протонам групп CH_2 4-гидроксипиперидинового кольца соответствуют четыре сигнала с химическими сдвигами δ 1.59, 1.92, 2.87 и 3.68 м.д., протон гидроксила 4-гидроксипиперидинильной группы представлен уширенным синглетом с

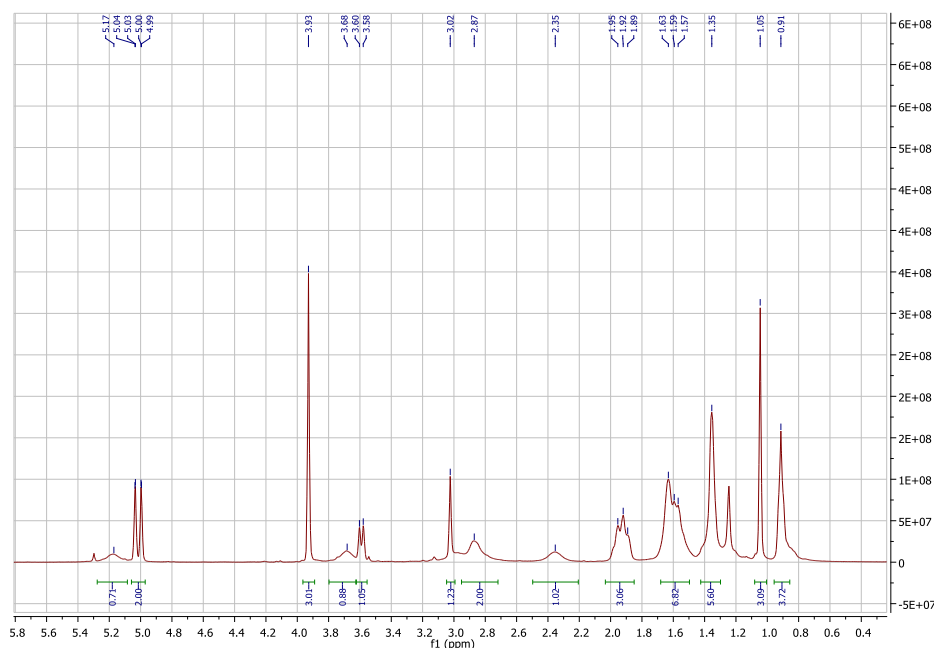


Рисунок 2.22 - Спектр ЯМР ^1H 3-гидрокси-4-(4-гидроксипиперидин-1-ил)-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.24**

химическим сдвигом δ 5.17 м.д. Сигналы с химическим сдвигом δ 4.99 и 5.05 м.д., 2J 1.4 Гц соответствуют двум этиленовым протонам связи $\text{C}=\text{CH}_2$. О введении 4-гидроксипиперидинильной группы к атому C(4) РРА свидетельствует присутствие в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп N-CH (δ 62.45 м.д.) и CH-O (δ 68.20 м.д.). Наличие в ИК спектре полос поглощения групп при 1720 см^{-1} (C=O) и 1634 см^{-1} (C=C) также подтверждает

строение соединения **2.24**, а значение пика $[M+H]^+$ в масс-спектре, равное 381.23 Da, соответствует его составу.

В качестве вторичных алифатических аминов для замещения группы CH_3SO_3 в соединении **2.17** нами использованы диметиламин и диэтиламин (схема 2.8). Диметил- и диэтиламиногруппы часто присутствуют в составе биологически активных веществ, а кроме того диэтиламин можно представить как раскрытый пирролидиновый цикл, наличие которого в производном РРА **2.16** обеспечивало заметно более высокую противоопухолевую активность по сравнению с исходным РРА.

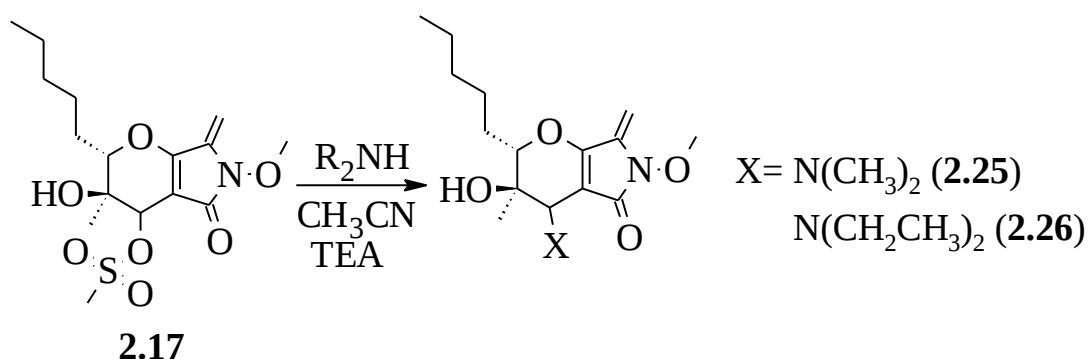


Схема 2.8 - Получение 4-диалкиламинопроизводных РРА **2.25** и **2.26**

В условиях, аналогичных замещению метансульфонатной группы циклическими вторичными аминами, 4-(диметиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.25** и 4-(диэтиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-он **2.26** образуются (по данным ЯМР ^1H) с выходом 70-90 %. В индивидуальном виде они выделены методом препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования с выходами 20 и 43% соответственно, что обусловлено в первую очередь малым количеством веществ (до 50 мг).

Состав и строение соединений **2.25** и **2.26** подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии (приложение А). Так, в спектре ЯМР ^1H соединения **2.25** (рисунок 2.23) метильным протонам диметиламиногруппы соответствует сигнал δ 2.44 м.д. Сигналы с химическим

сдвигом δ 4.99 и 5.03 м.д., 2J 1.4 Гц подтверждают сохранение этиленовой группировки $C=CH_2$ исходного РРА. В спектре ЯМР ^{13}C о введении диметиламиногруппы к атому C(4) РРА свидетельствует присутствие сигналов атомов углерода групп $N-CH_3$ (δ 29.70 м.д.). ИК спектр содержит полосы поглощения групп $C=O$ (1723 см^{-1}) и $C=C$ (1635 см^{-1}). Состав соединения **2.25** подтверждается значением пика $[M+H]^+$ в масс-спектре 325.21 Da.

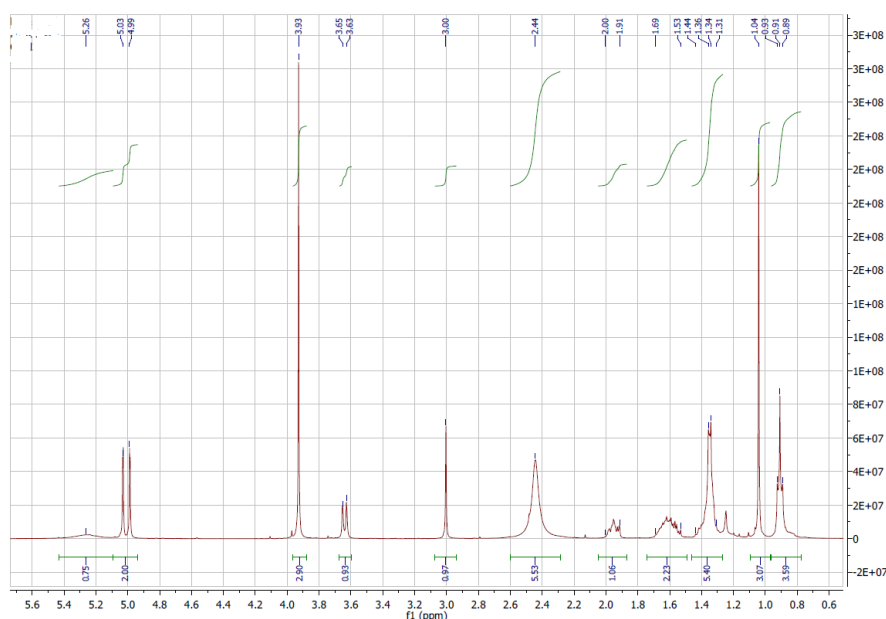


Рисунок 2.23 - Спектр ЯМР 1H 4-(диметиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-он **2.25**

В спектре ЯМР 1H соединения **2.26** (рисунок 2.24) сигналам протонов метиленовых групп диэтиламина соответствует химический сдвиг δ 2.27-3.06 м.д., протонам метильных групп - химический сдвиг δ 1.31-1.47 м.д. Сигналы с химическим сдвигом δ 4.98 и 5.02 м.д., 2J 1.4 Гц относятся к двум этиленовым протонам связи $C=CH_2$. О введении диэтиламиновой группы к атому C(4) феосфера А свидетельствует присутствие в спектре ЯМР ^{13}C сигналов атомов углерода групп $N-CH$ (δ 60.04 м.д.). Состав соединения **2.26** подтверждается значением пика $[M+H]^+$ в масс-спектре 353.24 Da. ИК спектр содержит полосы поглощения групп $C=O$ (1723 см^{-1}) и $C=C$ (1635 см^{-1}).

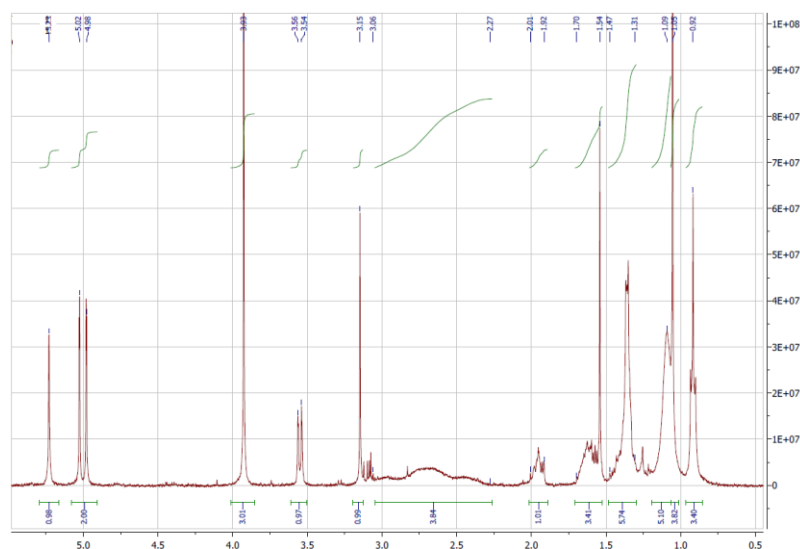


Рисунок 2.24 - Спектр ЯМР ^1H 4-(диэтиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-она **2.26**

2.4 Взаимодействие PPA с диэтиламиносератрифторидом (DAST)

Как отмечено в литературном обзоре, введение атома фтора в органические молекулы, в том числе природного происхождения, относится к числу важных подходов к синтезу биологически активных веществ. Одним из наиболее распространенных методов региоселективного введения атомов фтора в органические молекулы является замещение спиртовой гидроксильной группы под действием HF, SF₄, SeF₄, комплекса SeF₄–пиридин, диэтиламиносульфотрифторида и других фторсодержащих реагентов. При этом склонность групп OH вторичных спиртов к обмену на фтор достаточно велика, но целевые продукты, как правило, получаются с меньшими выходами, чем в случае первичных спиртов [109].

Как правило, замещение гидроксильной группы на фтор с помощью HF не удастся осуществить, однако под действием комплекса пиридин-HF (PPHF) замещение группы OH в циклогексаноле **2.27** происходит с прекрасным выходом продукта реакции (99%) [110] (схема 2.9).

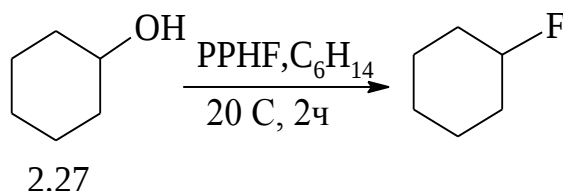


Схема 2.9- Замещение группы OH в циклоалифатическом спирте **2.27** под действием PPHF

Реакция спиртов с таким известным фторирующим реагентом, как SF_4 , как правило, не дает высоких выходов фторпроизводных из-за побочных реакций дегидратации и полимеризации. Однако использование комплекса SeF_4 -пиридин в молярном соотношении 1:1 устраняет эти проблемы. Считается, что наличие пиридина позволяет связывать образующийся в ходе реакции HF, что препятствует протеканию побочных реакций. В результате, например, замещение группы OH в бензиловом спирте **2.28** действием системы $\text{SeF}_4\text{-C}_5\text{H}_5\text{N}$ происходит почти количественно (схема 2.10) [111].

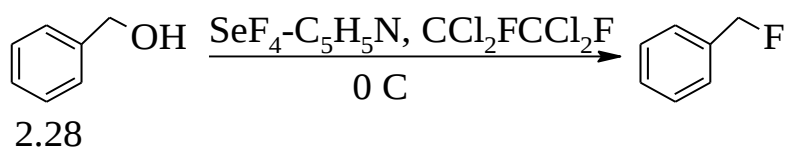


Схема 2.10 - Замещение OH-группы в спирте **2.28** действием системы $\text{SeF}_4\text{-C}_5\text{H}_5\text{N}$

В последнее время в синтетическую практику введен такой эффективный фторирующий реагент, как диэтиламиносульфотрифторид **2.29** (DAST), а также его аналоги: диметиламиносульфотрифторид **2.30**, морфолилсульфотрифторид **2.31**, бис(2-метоксиэтил)аминосulfотрифторид **2.32** (рисунок 2.25). Основным достоинством этих реагентов является то, что они одинаково гладко реагируют с первичными, вторичными и большинством третичных спиртов. Также весьма важным является тот факт, что реакции замещения групп OH под действием этих реагентов протекают при очень мягких условиях. Реакцию начинают, медленно добавляя спирт к раствору диалкиламиносульфотрифторида в инертном растворителе, охлажденному до $-50 \dots -78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для большинства спиртов реакция происходит интенсивно уже при такой низкой температуре. Завершают реакцию, прекращая охлаждение и

давая реакционной смеси самопроизвольно нагреться до комнатной температуры.

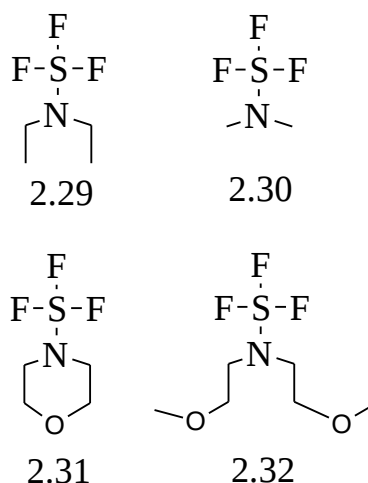


Рисунок 2.25 - Ряд эффективных фторирующих реагентов **2.29-2.32**

Реакции спиртов с диалкиламиносульфотрифторидами иногда сопровождают перегруппировки карбокатионного типа, например, изобутиловый спирт при реакции с DAST образует смесь изобутилфторида (49%) и *трет.*-бутилфторида (21%) [112]. Следует заметить, что при фторировании с помощью диалкиламиносульфотрифторидов перегруппировки карбокатионного типа в целом протекают в меньшей степени, чем при использовании других фторирующих реагентов. Так, вышеупомянутый изобутиловый спирт при реакции с реагентом SeF₄-пиридин в отличие от DAST образует только продукт перегруппировки – *трет.*-бутилфторид (65 %) [111].

Фторирование спиртов с помощью диалкиламиносульфотрифторидов является удобным методом введения фтора. Проведение реакции при низких температурах позволяет селективно заместить только гидроксильную группу, не затрагивая при этом другие реакционноспособные функциональные группы. Например, в соединении **2.33** замещение группы OH происходит, не затрагивая амидную, сложноэфирную, нитрильную группы (схема 2.11) [109].

При этом часто фторирование оптически активных спиртов с использованием DAST протекают с инверсией конфигурации [113].

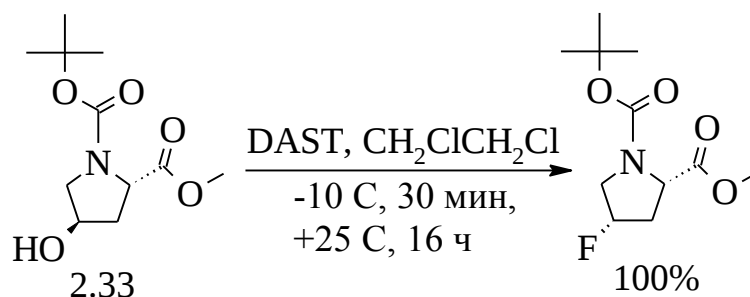


Схема 2.11 - Фторирование спирта **2.33** с помощью DAST

Для введения фтора в положение C(4) PPA нами использован DAST как эффективный и достаточно доступный фторирующий реагент. Реакцию осуществляли в растворе хлористого метилена при 0°C в течение 1 часа. Реакционную смесь по окончании реакции разбавляли хлористым метиленом, промывали, сушили и после отгонки растворителя при пониженном давлении анализировали состав методом ЯМР ^1H и ^{19}F спектроскопии, а также масс-спектрометрически. Установлено образование в качестве основного продукта (около 90%) (2S,3R,4R)-4-фтор-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-она **2.34** (схема 2.12) [104]. По данным масс-спектрометрии в реакционной смеси присутствует в незначительных количествах также дифторпроизводное PPA – продукт замещения обоих гидроксильных групп: у вторичного C(4) и третичного C(3) атомов. Дифторпроизводному соответствует ион $[\text{M} + \text{H}]^+$ с точной массой 302.10, что согласуется с молекулярной формулой $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{NO}_3 + \text{H}$ (рассчитано 302.1562.).

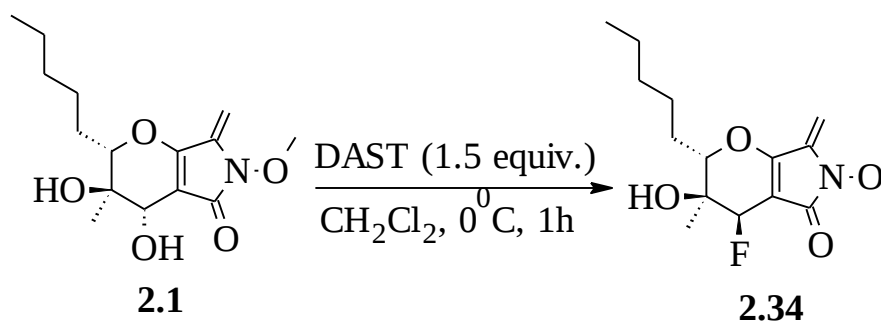


Схема 2.12 - Фторирование PPA **2.1** с помощью DAST

Соединение **2.34** в чистом виде выделено методом колоночной хроматографии (хлористый метилен - метанол 20:1) с выходом 64%. Его состав и строение подтверждены данными масс-спектрометрии, ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F , корреляционной (ROESY) спектроскопии (приложение А). В спектре ЯМР ^1H (рисунок 2.26) присутствуют сигналы протонов экзоциклической связи $\text{C}=\text{CH}_2$ с δ 5.09 и 5.14 м.д., 2J 1.4 Гц. Сигнал протона у атома C(4) смещен в слабое поле по сравнению с его положением в исходном РРА (δ 4.45 м.д.) и представлен дуплетом с химическим сдвигом δ 4.90 ($^2J_{\text{CF}}$ 52 Гц). В спектре ЯМР ^{19}F (рисунок 2.27) химический сдвиг атома фтора δ_{F} -166.42 м.д. является типичным для группы CHF . Наличие фтора у атома C(4) подтверждается также сигналом атома углерода группы CHF (δ 81.78 м.д.) в спектре ЯМР ^{13}C . Составу соединения **2.34** соответствует значение пика $[\text{M}+\text{H}]^+$ в масс-спектре (300.16 Da). В ИК спектре имеются полосы поглощения групп $\text{C}=\text{O}$ (1722 см^{-1}), $\text{C}-\text{F}$ (1279 см^{-1}) и $\text{C}=\text{C}$ (1634 см^{-1}).

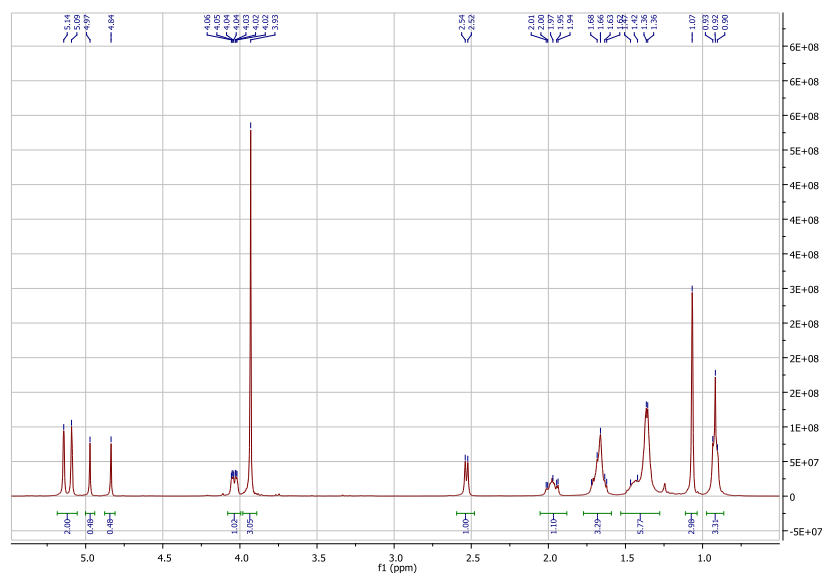


Рисунок 2.26 - Спектр ЯМР ^1H (2S,35R,4R)-4-фтор-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-она **2.34**

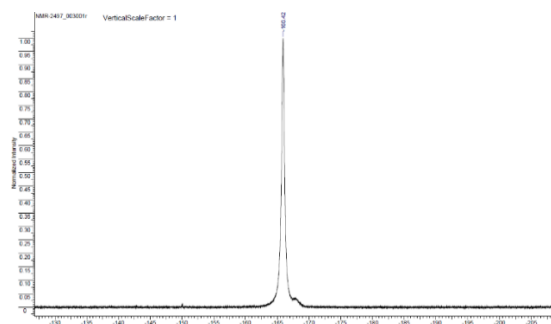


Рисунок 2.27 - Спектр ЯМР ^{19}F (2S,3R,4R)-4-фтор-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-она **2.34**

В спектре ROESY (рисунок 2.28) 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 карбокатион мог предпочтительнее атаковываться с одной стороны, противоположной расположению пространственно препятствующей метильной группы при атоме C(3).

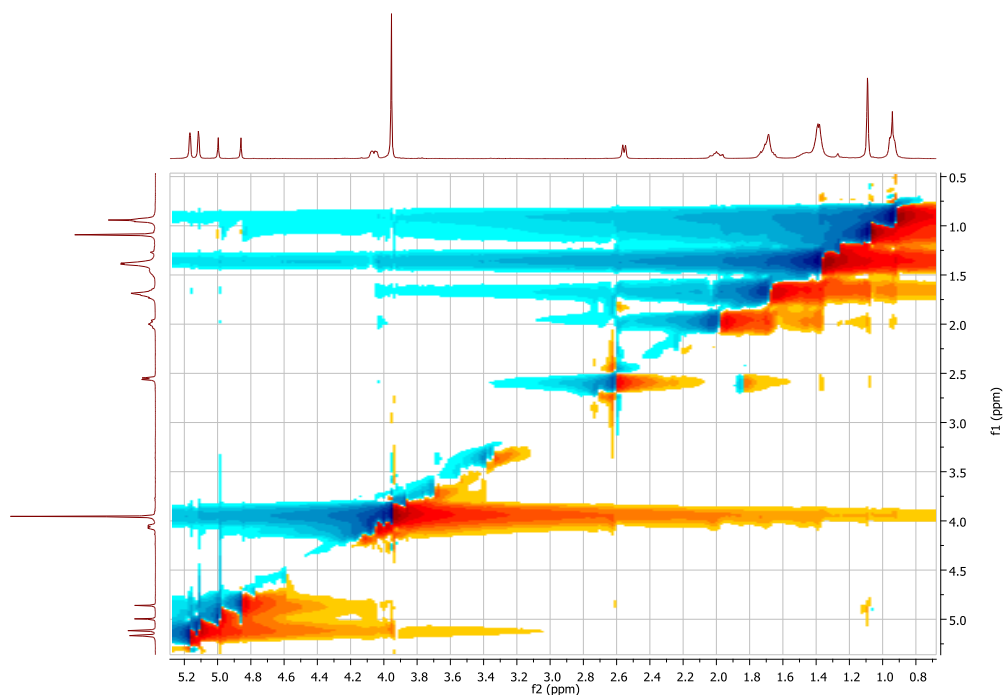


Рисунок 2.28 - Спектр ROESY ^1H - ^1H (2S,3R,4R)-4-фтор-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-она **2.34**

2.5 Оценка цитотоксической активности синтезированных соединений

Оценка цитотоксичности потенциальных противораковых субстанций является необходимым этапом их исследования на доклиническом этапе. Под цитотоксичностью понимают появление патологических изменений в клетках при действии физических, химических и биологических агентов [114]. В данной работе цитотоксичность синтезированных соединений определяли *in vitro* как на адгезионных, так и суспензионных культурах опухолевых клеточных линий эпителиального происхождения. Количественно цитотоксичность оценивали по концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} , то есть по количеству вещества, которое необходимо для прекращения биологического процесса на 50%. Значения IC_{50} для полученных веществ определяли на 10 линиях раковых клеток: MCF-7 (рак молочной железы), PC-3 (аденокарцинома простаты), HCT-116 (колоректальная раковая клетка), A549 (рак легких), K562 (хронический миелоидный лейкоз), THP-1 (острый моноцитарный лейкоз), NCI-H9292 и RPMI8226 (множественная миелома), Jurkat (острая Т-клеточная лейкемия), ФЭЧ (эмбриональные фибробласты человека) HEK293 (эмбриональные почки человека). В качестве контрольного вещества (эталоны) использовали химиотерапевтический препарат полусинтетического происхождения этопозид, который является ингибитором топоизомеразы II и оказывает цитотоксическое действие за счет повреждения ДНК. В медицинской практике он применяется в комбинации с другими лекарственными средствами при лечении различных видов рака [115]. Результаты представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 - Значение IC₅₀ синтезированных производных PPA на адгезионных и суспензионных культурах опухолевых клеточных линий эпителиального происхождения

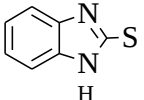
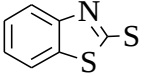
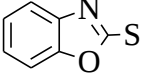
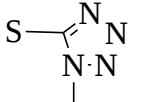
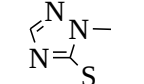
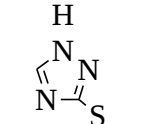
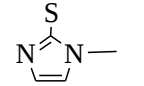
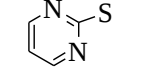
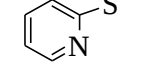
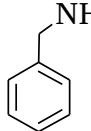
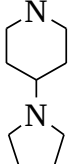
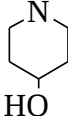
R	Вещества	Адгезивные культуры клеток, IC ₅₀ (мкМ)						Суспензионные культуры клеток, IC ₅₀ (мкМ)				
		HTC-116	MCF-7	PC3	A549	ФЭЧ	HEK293	NCI-H929	THP-1	K562	RPMI8226	Jurkat
ОН	2.1, PPA	44.0	32.0	20.0	41.0	19.0	-	20.0	6.5	10.0	19.0	9.6
ClCH ₂ C(O)O	2.4	3.3	17.0	2.4	20.0	9.1	-	3.3	11.0	7.0	9.7	9.6
ClCH ₂ (CH ₂) ₃ C(O)O	2.5	3.9	5.4	9.2	12.0	11.0	-	2.5	4.6	8.5	4.3	4.2
	2.7	8.2	3.9	6.4	19.0	11.0	-	2.0	5.3	9.3	4.3	8.9
	2.8	4.7	16.0	5.0	5.9	11.0	-	0.4	1.6	4.3	2.0	2.3
	2.9	4.9	3.9	5.8	20.0	9.3	-	4.5	2.3	4.5	5.1	2.6
	2.10	8.0	20.0	4.9	15.0	-	7.4	4.7	1.0	1.9	1.9	3.2
	2.11	9.5	16.0	4.7	37.0	-	4.2	9.5	1.7	3.6	4.2	3.3
	2.12	7.6	9.8	3.4	19.0	-	6.7	7.8	0.9	1.8	3.5	2.2
	2.13	6.9	16.0	6.1	20.0	-	10.0	13.0	1.9	2.1	4.7	4.1
	2.14	7.4	10.0	3.7	26.0	-	6.2	4.3	1.0	1.8	1.9	2.1
	2.15	7.0	10.0	6.0	15.0	-	7.6	8.2	1.1	1.7	3.9	4.5

Таблица 2.1 (продолжение)

R	Вещества	Адгезивные культуры клеток, IC ₅₀ (мкМ)						Суспензионные культуры клеток, IC ₅₀ (мкМ)				
		HTC-116	MCF-7	PC3	A549	ФЭЧ	НЕК293	NCI-H929	THP-1	K562	RPMI8226	Jurkat
	2.16	0.5	0.2	4.8	10.0	4.0	-	0.5	0.2	0.8	2.2	0.3
CH ₃ NH	2.18	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	2.19	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	2.20	4.9	5.6	5.3	11.0	15.0	-	3.8	2.1	1.9	2.2	2.5
H ₂ C=CHNH	2.21	8.4	6.3	4.1	13.0	5.0	-	10.0	2.3	3.2	3.3	6.0
	2.22	13.0	25.0	36.0	38.0	53.0	-	14.0	7.7	10.0	15.0	16.0
	2.23	4.3	3.2	2.3	12.0	22.0	-	6.4	3.2	1.0	4.9	10.0
	2.24	2.6	4.3	3.5	9.4	6.7	-	3.2	1.9	1.8	1.9	1.6
(CH ₃) ₂ N	2.25	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	2.26	22.0	2.5	3.6	23.0	-	-	3.9	1.0	1.9	2.3	1.7
F	2.34	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

Из приведенных данных следует, что все производные РРА проявляют заметную цитотоксическую активность, как правило, превосходящую активность РРА (отмечено зеленым цветом). Во многих случаях это превосходство весьма существенно (отмечено красным цветом). Более половины соединений обладают большей цитотоксической активностью, чем лекарственный препарат этопозид.

Выявление закономерностей типа «структура – свойство» приводит к следующим заключениям:

- длина углеродной цепи в ω -хлорацетоксильной группе при атоме С(4) мало влияет на цитотоксичность;
- введение атома фтора в положение С(4) существенно не увеличивает цитотоксичность;
- присутствие гетероциклических фармакофорных групп значительно повышает цитотоксичность, особенно на суспензионных культурах клеток;
- наиболее высокую цитотоксическую активность по сравнению с цитотоксичностью исходного РРА проявляют производные, содержащие у атома С(4) аминогруппы открытого и циклического строения.

К веществам-лидерам следует отнести соединения **2.8**, **2.16** и **2.25**.

Соединение **2.8**, содержащие у атома С(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 **2.16** и **2.25** обнаружили на 6 линиях раковых клеток активность, заметно превосходящую активность контрольного этопозид.

2.6 Острая токсичность производных РРА **2.16** и **2.25**

Наряду с высокой цитотоксичностью важнейшее значение для потенциальных противораковых субстанций имеет их общетоксическое действие на живой организм. Острая токсичность - токсикометрическая характеристика фармакологического вещества или лекарственного препарата, выражающая его

способность вызывать гибель животных при однократном введении или при введении через короткие (не более 6 ч) интервалы времени в течение суток. Ее величина определяется значением ЛД₅₀, то есть средней дозой вещества на кг живого веса, которая вызывает гибель 50% группы испытуемых животных [116].

Соединения **2.16** и **2.25** как обладающие наиболее высокими противоопухолевыми эффектами исследованы на острую токсичность при внутрибрюшинном и пероральном введениях на белых беспородных мышах. При этом установлено, что соединение **2.16** имеет LD₅₀ 126 мг/кг, а соединение **2.25** - 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).

2.7 Множественная лекарственная устойчивость к производным

2.8, 2.16 и 2.25

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) - это невосприимчивость клеток или организма одновременно к целому ряду лекарственных препаратов разного химического строения и с разным механизмом действия. Она определяется как снижение чувствительности до такой степени, что клетки способны размножаться при воздействии на них препарата в критической или более высокой концентрации. Феномен МЛУ имеет важное клиническое значение, поскольку представляет собой серьезное препятствие на пути успешного лечения многих заболеваний, в том числе злокачественных опухолей [117]. Производные РРА **2.8, 2.16 и 2.25** при исследовании множественной лекарственной устойчивости в сравнении с применяемыми на практике этопозидом, доксорубицином и бартезомибом показали сравнимые или превосходящие характеристики (таблицы 2.2 и 2.3)

Таблица 2.2 - Преодоление множественной лекарственной устойчивости веществами **2.8** и **2.16**

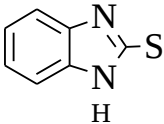
Вещества	IC ₅₀ , мкМ	
	HBL-100	HBL-100/Dox
Доксорубицин	0.26 ± 0.15	55.70 ± 34.00
Этопозид	4.40 ± 1.10	89.70 ± 24.80
2.8 , 	4.60 ± 1.90	7.60 ± 1.40
2.16 , 	4.80 ± 2.20	10.50 ± 2.30

Таблица 2.3 - Преодоление множественной лекарственной устойчивости веществами **2.16** и **2.25**

Вещества	IC ₅₀ , мкМ				
	K562	K562iS9	K562iS9vlc	RPMI	RPMIBTZ2D
Доксорубицин	0.49±0.16	14.60±4.79	15.45±5.01	0.55±0.15	0.76±0.20
Бартезомиб	16.40±4.85	12.93±0.79	149.00±43.67	9.40±5.72	44.75±30.06
2.16 , 	4.10±0.56	3.65±0.57	3.45±0.84	1.33±0.49	1.45±0.40
2.25 , (CH ₃) ₂ N	2.77±0.64	3.05±1.30	2.10±0.54	1.57±0.21	1.29±0.45

Из совокупности исследований по преодолению лекарственной устойчивости следует, что производные РРА **2.8**, **2.16** и **2.25** являются перспективными для создания новых противоопухолевых препаратов, направленных на лечение химиорезистентных злокачественных новообразований.

Таким образом, в результате выполнения диссертационной работы разработаны методики введения разнообразных фармакофорных группировок к атому C(4) молекулы РРА, с применением которых синтезирован представительный ряд (20 веществ) новых производных РРА - потенциальных противораковых субстанций. В результате биологических исследований выявлены «соединения-лидеры» для дальнейшей разработки противораковых лекарств.

.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Исходные вещества

Феосферид А (РРА) предоставлен в.н.с., к.б.н. А.О. Берестецким из коллекции чистых культур Всероссийского института защиты растений (г.Санкт-Петербург) для химического моделирования структуры. Соединение по данным ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопии, а также масс-спектрометрии полностью соответствует ранее полученным образцам, охарактеризованным в том числе рентгеноструктурным анализом. Содержание основного вещества около 99 %.

3.1.1 Галогенсодержащие реагенты

Диэтиламиносульфотрифторид (DAST) (95%, «Sigma-Aldrich»);

Хлорацетилхлорид ($\geq 99.0\%$ (GC), «Sigma-Aldrich»);

Хлорвалеридхлорид (96%, «Sigma-Aldrich»);

Метансульфонилхлорид ($\geq 99.7\%$, «Sigma-Aldrich»).

3.1.2 Гетероциклические тиолы

Меркаптобензотиазол (97%, «Sigma-Aldrich»);

Меркаптобензоксазол (95%, «Sigma-Aldrich»);

Меркаптобензоимидазол (98%, «Sigma-Aldrich»);

2-Меркаптопиридин (99%, «Sigma-Aldrich»);

2-Меркаптопиримидин (98%, «Sigma-Aldrich»);

Метилимидазол ($\geq 99\%$, «Sigma-Aldrich»);

2,4-Дигидро-3H-1,2,4-триазол-3-тион (97%, «Sigma-Aldrich»);

1H-1,2,4-триазол-3-тиол (97%, «Sigma-Aldrich»);

5-Меркапто-1-метилтетразол (97%, «Sigma-Aldrich»).

3.1.3 Азотсодержащие реагенты

Метиламин гидрохлорид ($\geq 98\%$, «Sigma-Aldrich»);

Этаноламин ($\geq 99,5\%$, «Sigma-Aldrich»);

Бутаноламин (97%, «Sigma-Aldrich»);

Аллиламин (99%, «Sigma-Aldrich»);
Бензиламин (99%, «Sigma-Aldrich»);
4-(1-Пирролидинил)пиперидин (95%, «Sigma-Aldrich»);
Гидроксипиперидин (96% (GC), «Sigma-Aldrich»);
Пирролидин ($\geq 99\%$, «Sigma-Aldrich»);
Диметиламин гидрохлорид (99%, «Sigma-Aldrich»);
Диэтиламин (ТУ6-09-68-79) «Ч» (Реахим).

3.1.4 Прочие реагенты

Калий углекислый «ИМП ЧДА» (ЗАО «Вектон»);
Натрий йодистый, безводный, «ИМП» (ЗАО «Вектон»);
Хлорид натрия (ГОСТ 4233-77). «ХЧ» (ЗАО «Вектон»);
Сульфат магния (безводный, $\geq 99,5\%$, «Sigma-Aldrich»).

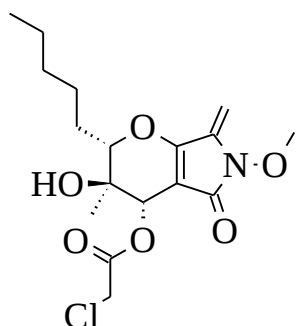
3.1.5 Растворители

Ацетонитрил (ТУ6-09-14-2167-84) «ОСЧ» (НПК «КРИОХРОМ»);
Диметиламинопиридин «ИМП» (ООО «Sigma-Aldrich»);
Метанол (ГОСТ 6995-77) «ОСЧ» (ЗАО «Вектон»);
Пиридин (безводный, $\geq 99,8\%$, «Sigma-Aldrich»);
Тетрагидрофуран (ТУ 2631-125-444931179-08) «ХЧ» (ЗАО «Вектон»);
Триэтиламин (ГОСТ 9966-88) «ХЧ» (ООО «Sigma-Aldrich»);
Хлористый метилен (ГОСТ 9968-86). «ХЧ» (ЗАО «Вектон»);

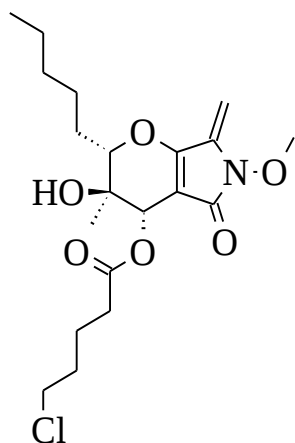
3.2 Синтез производных РРА

3.2.1 Ацилирование РРА

К раствору РРА (0.1 ммоль) в хлористом метиле (4 мл), охлажденному до 0° С добавили по каплям триэтиламин (0.45 ммоль), диметиламинопиридин (0.005 ммоль) и соответствующий хлорангидрид ω-хлоркарбоновой кислоты (0.4 ммоль). Реакционную массу перемешали в течение 1 часа при 0° С, разбавили хлористым метилом (20 мл), промыли насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой высушили над Mg₂SO₄ и упарили на роторном испарителе. Полученную смесь разделили методом колоночной хроматографии (хлористый метил - метанол 20:1), растворитель удалили на роторном испарителе.



(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3с]пиррол-4-илхлорацетат (2.4). Бесцветное масло, 12.1 мг (29%). $[\alpha]_{20}^D = -17.20^\circ$ (с 1.07, CH₂Cl₂), R_f 0.65 (20:1 CH₂Cl₂-MeOH). Физические свойства и спектральные характеристики соединения **2.4** соответствуют литературным данным [90].

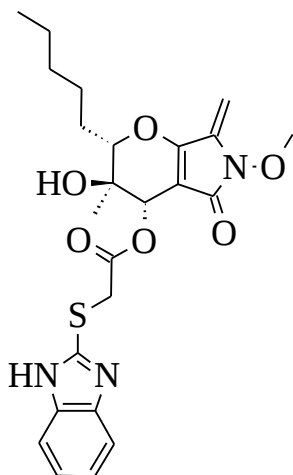


3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3с]пиррол-4-ил-5-хлорпентаноат (2.5). Бесцветное масло, 16 мг (38%), $[\alpha]_{20}^D = -45.84^\circ$ (с 1.07, CH₂Cl₂), R_f 0.4 (20:1 CH₂Cl₂-MeOH). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.): δ 5.61 (с, 1H), 5.04 (дд, J 17.9, 1.6 Hz, 2H), 4.07 (м, 1H), 3.90 (с, 3H), 3.56 (м, 2H), 3.36 (с, 1H),

2.62 – 2.33 (м, 2H), 1.86 – 1.73 (м, 6H), 1.61 (м, 1H), 1.43 – 1.33 (м, 5H), 1.15 (с, 3H), 0.90 (t, J 6.8 Hz, 3H). Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д.): δ 164.43, 158.00, 136.11, 101.16, 92.28, 86.15, 70.87, 64.58, 44.55, 33.36, 31.67, 31.50, 27.37, 26.05, 22.53, 22.08, 16.89, 14.05. ИК спектр (ν , см⁻¹): 3459, 2956, 2929, 2859, 1726, 1638, 1548, 1446, 1378, 1276, 1168, 1135, 994. Масс-спектр: найдено 416.18386, вычислено m/z 416.18344 $[M+H]^+$ для C₂₀H₃₁ClNO₆.

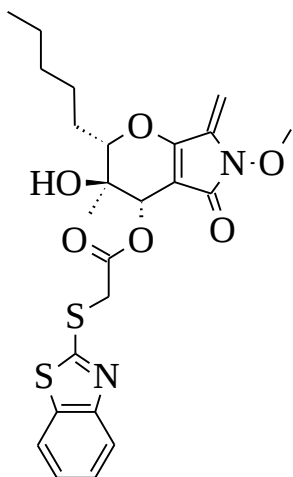
3.2.2 Замещение хлора в хлорацетоксипроизводном РРА 2.4 на тиобензогетероциклические группы

К раствору соответствующего 2-меркаптобензогетероциклического соединения (0.07 ммоль) в ацетонитриле (25 мл) добавили карбонат калия (0.11 ммоль) и йодид натрия (0.007 ммоль). Смесь перемешали при 55° в течение 10 минут, а затем прибавили раствор соединения **2.4** (0.1 ммоль) в ацетонитриле (4 мл). Реакционную смесь перемешали при 55° в течение 6 часов, охладили до комнатной температуры, разбавили хлористым метиленом (20 мл), промыли насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой высушили над Mg₂SO₄ и упарили на роторном испарителе. Полученную смесь разделили методом колоночной хроматографии (хлористый метилен - метанол 30:1), растворитель удалили на роторном испарителе.



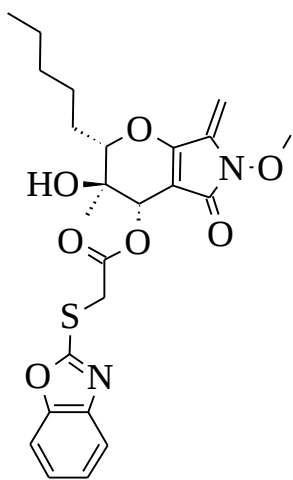
(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1H-бензимидазол-2-илтио)-ацетат (2.7). Бесцветное масло, 11 мг (25%), $[\alpha]_{20}^D = -42.95^\circ$ (с 0.63, CH₂Cl₂), R_f 0.65 (30:1 CH₂Cl₂-MeOH). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.): δ 7.60 – 7.45 (м, 2H), 7.20 (дд, J 5.6, 2.9 Hz, 2H), 5.85 (с, 1H), 5.10 (д, J 17.3 Hz, 2H), 4.15 (м, 1H), 3.94 (с, 3H), 3.86 (дд, J 30.9, 15.9 Hz, 2H), 1.88 (м, 1H), 1.71 (м, 1H), 1.60 (м, 1H), 1.43 – 1.24 (м,

10H), 0.91 (с, 3H). Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д.): δ 169.61, 165.05, 158.22, 147.17, 139.02, 135.90, 122.83, 114.74, 101.01, 93.39, 86.35, 70.70, 64.74, 35.51, 31.50, 29.72, 27.23, 25.96, 22.65, 14.12. ИК спектр (ν, см⁻¹): 3188, 2956, 2928, 2857, 1706, 1636, 1494, 1441, 1267, 1149, 994. Масс-спектр: найдено 488.18578, вычислено m/z 488.18498 [M+H]⁺ для C₂₄H₃₀N₃O₆S.



(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензотиазол-2-илтио)-ацетат (2.8). Бесцветное масло, 35 мг (40 %), $[\alpha]_{20}^D = -99.50^\circ$ (с 1.60, CH_2Cl_2), Rf 0.7 (20:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): δ 7.81 (д, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.75 (д, $J 7.9$ Hz, 1H), 7.40 (т, $J 7.7$ Hz, 1H), 7.30 (т, $J 7.6$ Hz, 1H), 5.72 (с, 1H), 5.04 (д, $J 17.5$ Hz, 2H), 4.19 (дд, $J 16.3$ Hz, 2H), 4.09 (м, 1H), 3.90 (с, 3H), 3.34 (с, 1H), 1.75 –

1.44 (м, 3H), 1.38 – 1.18 (м, 8H), 0.88 (т, $J 6.7$ Hz, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): δ 168.69, 164.79, 164.59, 157.94, 152.74, 136.21, 135.53, 126.25, 124.66, 121.60, 121.18, 100.76, 92.45, 86.18, 71.10, 64.63, 35.15, 31.37, 27.33, 26.04, 22.54, 17.68, 14.05. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3350, 2955, 2928, 2857, 1723, 1636, 1455, 1429, 1240, 1145, 997. Масс-спектр: найдено 505.14681, вычислено m/z 505.14615 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$.

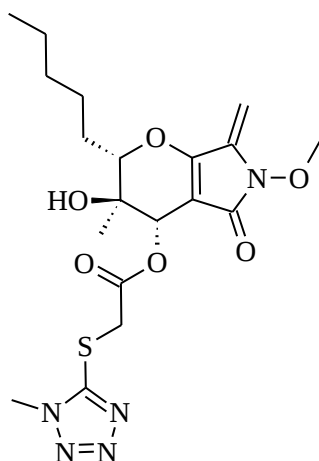


(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензоксазол-2-илтио)-ацетат (2.9). Бесцветное масло, 24 мг (31%), $[\alpha]_{20}^D = -76.35^\circ$ (с 1.33, CH_2Cl_2), Rf 0.30 (20:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): δ 7.56 (м, 1H), 7.44 (м, 1H), 7.32 – 7.21 (м, 2H), 5.77 (с, 1H), 5.04 (дд, $J 17.5$, 1.4 Hz, 2H), 4.20 – 4.07 (м, 2H), 3.90 (с, 3H), 3.43 (с, 1H), 1.72 (м, 2H), 1.53 (м, 1H), 1.38 – 1.22 (м, 8H), 0.89 (т, $J 6.8$ Hz, 3H).

Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): δ 168.30, 164.48, 163.55, 157.97, 152.04, 141.47, 136.17, 124.56, 124.34, 118.47, 110.14, 100.80, 92.47, 86.15, 71.03, 64.62, 34.16, 31.42, 27.34, 26.01, 22.54, 17.49, 14.05. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3400, 2956, 2930, 2859, 1722, 1637, 1505, 1454, 1239, 1133, 1097, 994. Масс-спектр: найдено 489.16926, вычислено m/z 489.16900 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$.

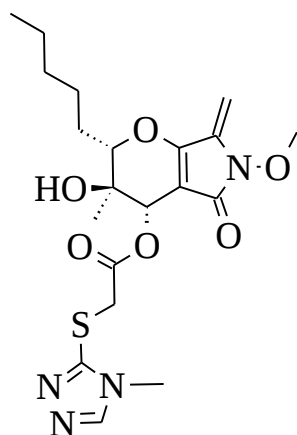
3.2.3 Замещение хлора в хлорацетоксипроизводном РРА 2.4 на тиогетероциклические группы

К раствору соответствующего 2-меркаптоазагетероциклического соединения (0.07 ммоль) в ацетонитриле (25 мл). добавили карбонат калия (0.11 ммоль) и иодид натрия (0.007 ммоль), Смесь перемешали при 55° в течение 10 минут, а затем прибавили раствор соединения **2.4** (0.1 ммоль) в ацетонитриле (4 мл). Реакционную смесь перемешали при 55° в течение 6 часов, охладили до комнатной температуры, разбавили хлористым метиленом (20 мл), промыли насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой высушили над Mg₂SO₄ и упарили на роторном испарителе. Полученную смесь разделили методом препаративной ВЭЖХ в условиях изократического элюирования (40-60% ацетонитрил/вода), растворитель удалили на роторном испарителе.



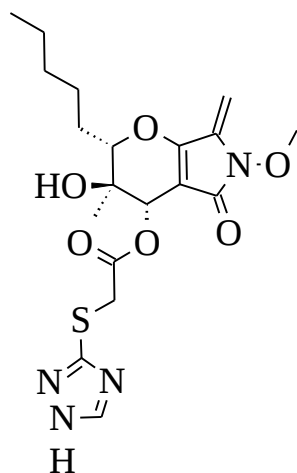
(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3с]пиррол-4-ил[(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)тио]ацетат (2.10). Желтое масло, 38.5 мг (12%), $[\alpha]_{20}^D = -58.31^\circ$ (с 2.03, CH₂Cl₂), R_f 0.61 (20:1 CH₂Cl₂-MeOH). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.): δ 8.13 (с, 1H), 5.76 (с, 1H), 5.11 (с, 1H), 5.07 (с, 1H), 4.14-4.11(м, 1H), 3.92 (с, 3H), 3.92-3.78 (м, 3H), 1.90 – 1.55 (м, 3H), 1.48-

1.29 (м, 5H), 1.22 (с, 3H), 0.91 (с, 3H). Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д): δ 169.52, 164.93, 158.29, 154.16, 148.25, 136.10, 101.10, 93.26, 86.36, 71.04, 64.84, 53.57, 35.52, 31.62, 27.44, 26.11, 22.66, 16.84, 14.16. ИК спектр (ν, см⁻¹): 3404, 2956, 2932, 2860, 1734, 1636, 1451, 1379, 1277, 1145, 977, 720. Масс-спектр: найдено 439.16420, вычислено m/z 439.16558 [M+H]⁺ для C₁₉H₂₆N₄O₆S.



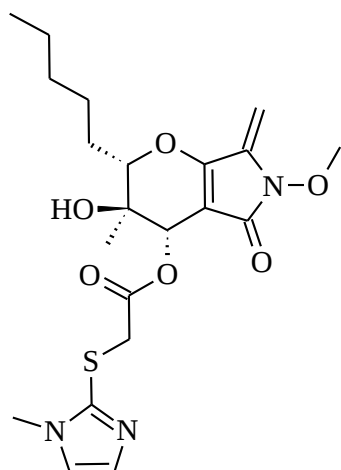
(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил (4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетат (2.11). Белый порошок, 23 мг (48%), $[\alpha]_{20}^D = -54.84^\circ$ (с 2.03, CH_2Cl_2), Rf 0.65 (20:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): δ 8.45 (с, 1H), δ 5.32 (с, 1H), 4.98 - 4.91 (д, 1.4 Hz, 1H), 4.91 (с, 1H), 4.06-4.01 (м, 2H), 4.05 (с, 1H), 3.97 (с, 3H), 3.63

(с, 3H), 1.65 (м, 2H), 1.42 (м, 2H), 1.31 (с, 2H), 1.30 (м, 3H), 0.89 (с, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): δ 169.48, 165.03, 152.43, 146.41, 141.82, 134.75, 106.53, 92.03, 79.21, 74.37, 70.54, 64.11, 35.37, 33.85, 31.35, 28.54, 25.97, 22.59, 18.39, 14.11. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3393, 2954, 2935, 2861, 1722, 1677, 1634, 1452, 1265, 1157, 991, 734. Масс-спектр: найдено 453.17493, вычислено m/z 453.17548 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$.



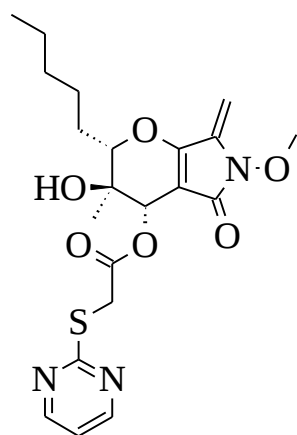
(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил (1Н-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетат (2.12). Бесцветное масло, 17 мг (15%), $[\alpha]_{20}^D = -57.29^\circ$ (с 2.03, CH_2Cl_2), Rf 0.62 (20:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): δ 8.16 (с, 1H), 6.6 (с, 1H), 5.75 (с, 1H), 5.10 (с, 1H), 5.04 (с, 1H), 4.14 (м, 1H), 3.88 (с, 3H), 3.84 (с, 2H), 1.86-1.68 (м, 2H), 1.65-1.51 (м, 1H), 1.45-1.26 (м, 5H), 1.20 (с, 3H),

0.90 (м, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): δ 169.57, 165.18, 158.26, 155.37, 147.25, 136.14, 101.02, 93.26, 86.46, 70.92, 64.76, 35.15, 31.60, 27.50, 26.16, 22.66, 14.14. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3296, 2925, 2854, 1721, 1665, 1637, 1453, 1262, 1143, 994, 799. Масс-спектр: найдено 439.16407, вычислено m/z 439.16458 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$.



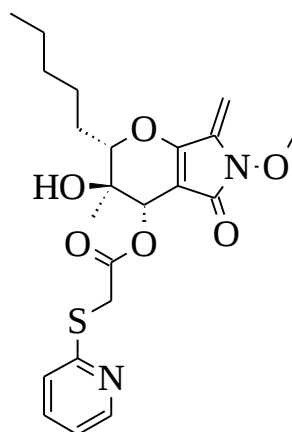
(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3с]пиррол-4-ил[(1-метил-1H-имидазол-2-ил) тио] ацетат (2.13). Оранжевое масло, 22.3 мг (8%), $[\alpha]_{20}^D = -63.09^\circ$ (с 2.03, CH_2Cl_2), R_f 0.62 (20:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): δ 7.03 (с, 1H), 6.97 (с, 1H), 6.76 (с, 1H), 5.84 (с, 1H), 5.03 (с, 1H), 4.99 (с, 1H), 4.11 (м, 1H), 3.88 (с, 3H), 3.73 (с, 3H), 3.61 (с,

2H), 2.06-2.00 (м, 1H), 1.75-1.59 (м, 2H), 1.46-1.35 (м, 5H), 1.30 (с, 3H), 0.91 (м, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 168.41, 164.66, 158.30, 138.35, 136.33, 129.70, 123.44, 101.84, 92.09, 86.36, 72.31, 70.36, 64.59, 37.11, 33.93, 31.73, 27.27, 26.03, 22.66, 15.61, 14.15. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3303, 2956, 2932, 2860, 1739, 1672, 1637, 1456, 1280, 1133, 994, 928. Масс-спектр: найдено 452.19440, вычислено m/z 452.19498 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$.



(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил (пиримидин-2-илтио)ацетат (2.14). Желтое масло, 32 мг (18%), $[\alpha]_{20}^D = -53.97^\circ$ (с 2.03, CH_2Cl_2), R_f 0.61 (20:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): δ 8.50 (д, J 4.8 Hz, 2H), 6.98 (т, J 4.8 Hz, 1H), 5.64 (с, 1H), 5.05 (с, 1H), 5.00 (с, 1H), 4.10-4.07 (м, 1H), 4.02 – 3.94 (м, 2H), 3.89 (с,

3H), 3.35 (с, 1H), 1.82-1.60 (м, 2H), 1.60-1.45 (м, 1H), 1.45-1.23 (м, 5H), 1.19 (с, 3H), 0.88 (м, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): δ 170.75, 170.05, 164.70, 158.08, 157.51, 136.37, 117.06, 100.88, 92.37, 86.36, 71.24, 64.65, 33.66, 31.53, 27.58, 26.21, 22.60, 17.92, 14.11. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3362, 2956, 2932, 2860, 1724, 1670, 1636, 1551, 1450, 1384, 1262, 1140, 981, 799. Масс-спектр: найдено 450.16881, вычислено m/z 450.16933 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$.

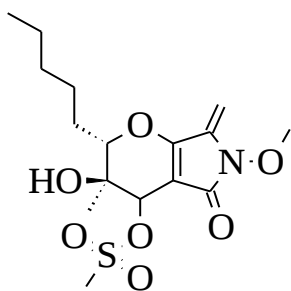


(2S,3R,4S)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил (пиридин-2-илтио)ацетат (2.15). Желтое масло, 19.1 мг (12%), $[\alpha]_{20}^D = -71.96^\circ$ (с 2.03, CH₂Cl₂), Rf 0.63 (20:1 CH₂Cl₂-MeOH). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.): δ 8.39-8.37 (м, 1H), 7.53-7.48 (м, 1H), 7.24 (м, 1H), 7.03-6.98 (м, 1H), 5.06 (д, *J* 1.6 Hz, 1H), 5.02 (д, *J* 1.6 Hz, 1H), 4.08-4.04

(м, 1H), 4.06 (д, *J* 16.3 Hz, 2H), 3.96 (с, 3H), 1.78-1.70 (м, 2H), 1.43-1.29 (м, 6H), 1.20 (с, 3H), 0.90 (т, *J* 6.3 Hz, 3H). Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д.): δ 170.63, 164.66, 158.13, 157.02, 149.58, 136.36 (*J* 11.2 Hz), 122.29, 120.12, 101.09, 92.25, 86.33, 71.28, 64.68 (*J* 4.3 Hz), 32.75, 31.57, 29.82, 27.51, 26.20, 22.62, 17.50, 14.14. ИК спектр (ν, см⁻¹): 3294, 2931, 2859, 1727, 1667, 1638, 1579, 1454, 1416, 1262, 1123, 1023, 893. Масс-спектр: найдено 449.17412, вычислено *m/z* 449.17408 [M + H]⁺ для C₂₂H₂₈N₂O₆S.

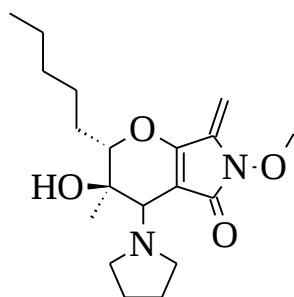
3.2.4 Синтез 4-аминопроизводных РРА через 4-мезилатное производное РРА

РРА (0.084 ммоль) растворили в хлористом метиле (2 мл), охладили до 0°C при перемешивании. К раствору добавили триэтиламин (0.294 ммоль) и метансульфонилхлорид (0.21 ммоль) по каплям. Реакционную массу перемешали в течение 1 часа, разбавили хлористым метилом (20 мл), промыли насыщенным раствором соды и насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой высушили над Mg₂SO₄ и упарили на роторном испарителе. Мезилпроизводное феосфериды А использовали для замещения мезилатной группы на первичные и вторичные амины.



3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-илметансульфонат (2.17). Желтое масло 31 мг (98%). Масс-спектр: найдено 375.96, вычислено *m/z* 375.95 для C₁₆H₂₅NO₇S₂.

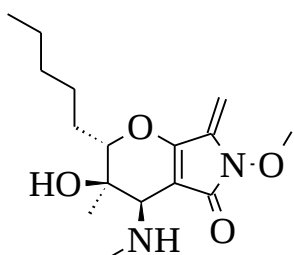
К раствору соединения **2.17** (0.01 ммоль) в тетрагидрофуране (3 мл), добавили пирролидин (0.025 ммоль). Реакционную массу перемешали в течение 24 часов при 60°C в закрытой ампуле. Реакционную смесь разбавили хлористым метиленом (20 мл), промыли насыщенным раствором соды и насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой высушили над Mg_2SO_4 и упарили на роторном испарителе. Полученную смесь разделили методом колоночной хроматографии (хлористый метилен - метанол 60:1), растворитель удалили на роторном испарителе. Недоочищенную смесь разделили методом препаративной ВЭЖХ в условиях изократического элюирования (ацетонитрил – муравьиная кислота 30:1), растворитель удалили на роторном испарителе.



3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-4-пирролидин-1-ил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он (2.16). Желтое масло, 56 мг (27%). Физические свойства и спектральные характеристики синтезированного соединения **2.16** соответствуют литературным данным [90].

3.2.5 Замещение мезилатной группы в производном РРА **2.17** на первичные амины

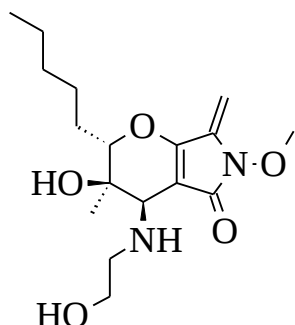
К раствору соединения **2.17** (0.18 ммоль) в ацетонитриле (2 мл), добавили триэтиламин (0.37 ммоль) и соответствующий первичный амин (0.37 ммоль). Реакционную массу перемешали в течение 24 часов при комнатной температуре, разбавили хлористым метиленом (20 мл), промыли насыщенным раствором соды и насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой высушили над Mg_2SO_4 и упарили на роторном испарителе. Полученную смесь разделили методом препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования (0-100% ацетонитрила), растворитель удалили на роторном испарителе.



(2S,3R,4R)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-4-метиламино-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3с]пиррол-5-(2H)-он (2.18). Желтое

масло, 9 мг (17%), $[\alpha]^{20D} = -120.36^\circ$ (с 0.28, CH_2Cl_2). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): 5.56 (м, 2H), 5.12 (с, 1H), 5.07 (с, 1H), 4.05

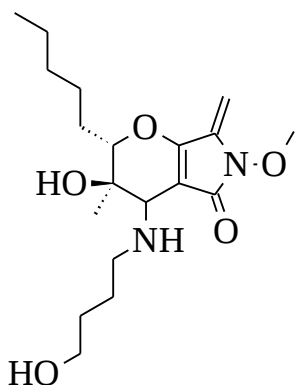
(м, 1H), 3.93 (с, 3H), 3.41 (м, 1H), 2.75 (с, 3H), 1.93 (м, 1H), 1.63 (м, 2H), 1.43–1.33 (м, 5H), 1.15 (с, 3H), 0.90 (м, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 165.87, 159.47, 136.05, 99.07, 93.27, 81.54, 68.97, 64.70, 57.32, 33.50, 31.58, 27.62, 25.99, 22.53, 19.45, 14.05. ИК спектр (ν , см^{-1}): 3319, 2955, 2930, 2859, 1721, 1667, 1633, 1438, 1379, 1266, 1196, 1166, 1085, 979, 915. Масс-спектр: найдено 311.1953, вычислено m/z 311.19653 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$.



(2S,3R,4R)-3-Гидрокси-4-[(2-гидроксиэтил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-

тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он (2.19). Желтое масло, 8 мг (25%), $[\alpha]^{20D} = -99.54^\circ$ (с 0.22, CH_2Cl_2), R_f 0.25 (20:1 CH_2Cl_2 - MeOH). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): 5.09 (с, 1H), 5.04 (с, 1H), 3.93 (м, 4H), 3.61 (м, 2H), 3.12 (с, 1H), 3.06–2.91

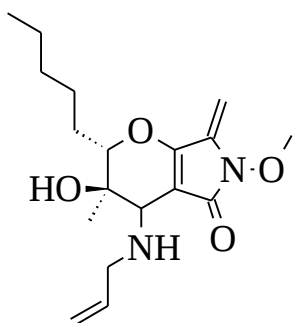
(м, 2H), 1.94 (м, 1H), 1.65–1.58 (м, 2H), 1.35 (м, 6H), 1.06 (с, 3H), 0.91 (с, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 167.38, 157.36, 136.27, 104.10, 92.86, 82.53, 69.28, 64.71, 61.07, 54.14, 52.07, 31.66, 27.47, 26.28, 22.57, 18.58, 14.08. ИК спектр (ν , см^{-1}): 3322, 2954, 2927, 2857, 1718, 1633, 1547, 1458, 1437, 1378, 1263, 1191, 1117, 1081, 978, 914. Масс-спектр: найдено 341.2060, вычислено m/z 341.20710 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5$.



3-Гидрокси-4-[(4-гидроксибутил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он 2.20. Желтое масло, 10 мг (20%), $[\alpha]^{20D} = -89.80^\circ$ (с 0.51, CH_2Cl_2), R_f 0.20 (20:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): 5.11 (д, J 1.2 Hz, 1H), 5.05 (д, J = 1.3 Hz, 1H), 4.94 (м, 3H), 4.05 (м, 1H), 3.93

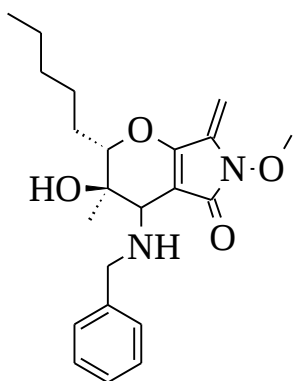
(с, 3H), 3.80–3.50 (м, 2H), 3.36 (с, 1H), 3.27–3.12 (м, 1H), 3.06–2.87 (м, 1H), 1.95 (м, 1H), 1.78 (м, 2H), 1.69–1.55 (м, 4H), 1.45–1.33 (м, 5H), 1.12 (с, 3H), 0.90 (м, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.) 166.37, 158.18, 136.38, 102.16, 92.59, 82.14, 68.78, 64.64, 62.26, 55.97, 48.77, 31.64, 30.14, 27.61, 26.12, 22.57, 19.15, 14.08.

ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3292, 2927, 2858, 1712, 1632, 1548, 1438, 1379, 1191, 1083, 989, 914. Масс-спектр: найдено 369.2373, вычислено m/z 369.23840 $[\text{M} + \text{H}]^+$ для $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$.



4-Диэтиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он 2.21. Желтое масло, 8 мг (14%), $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -157.50^\circ$ (с 0.31, CH_2Cl_2). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): 5.89 (д.д.т., $J = 12.2, 10.1, 6.1$ Hz, 1H), 5.25 (д.д., $J 17.2, 1.3$ Hz, 1H), 5.12 (м, 1H), 5.03 (д, $J 1.3$ Hz, 1H), 4.99 (д, $J 1.3$ Hz, 1H), 3.93 (с, 3H), 3.78–3.66 (м,

1H), 3.58–3.49 (м, 1H), 3.44 (д.д.д., $J 13.8, 4.6, 1.2$ Hz, 1H), 3.03 (с, 1H), 1.94 (м, 1H), 1.60 (м, 2H), 1.43–1.35 (м, 5H), 1.06 (с, 3H), 0.91 (м, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 166.68, 156.86, 136.78, 136.06, 117.05, 105.17, 91.79, 82.65, 68.23, 64.59, 54.92, 52.14, 31.69, 27.63, 26.29, 22.57, 18.72, 14.09. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3314, 2955, 2928, 2858, 1720, 1668, 1634, 1437, 1367, 1232, 1192, 1087, 992, 919. Масс-спектр: найдено 337.2111, вычислено m/z 337.21218 $[\text{M} + \text{H}]^+$ для $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4$.

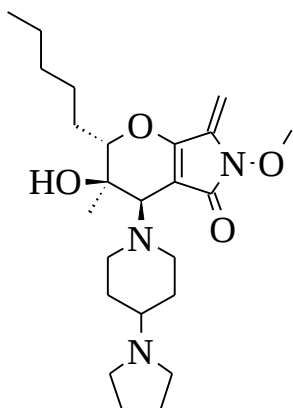


4-Бензиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он 2.22. Желтое масло, 11 мг (17%), $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -137.81^\circ$ (с 0.43, CH_2Cl_2). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): 7.39–7.26 (м, 5H), 5.04 (д, $J 1.4$ Hz, 1H), 5.00 (д, $J 1.4$ Hz, 1H), 4.30 (д, $J 12.3$ Hz, 1H), 3.94 (м, 4H), 3.53 (м, 1H), 3.12 (с, 1H), 1.93

(м, 1H), 1.61 (м, 2H), 1.34 (м, 5H), 1.06 (с, 3H), 0.90 (м, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 166.78, 156.89, 139.35, 136.81, 128.61, 127.47, 105.30, 91.89, 82.70, 68.26, 64.63, 55.37, 53.62, 31.68, 27.63, 26.27, 22.56, 18.82, 14.07. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3309, 2955, 2927, 2858, 1720, 1633, 1454, 1436, 1378, 1232, 1192, 1086, 978, 914. Масс-спектр: найдено 387.2262, вычислено m/z 387.22783 $[\text{M} + \text{H}]^+$ для $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4$.

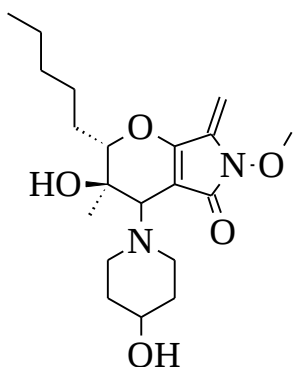
3.3.6 Замещение мезилатной группы в производном РРА 2.17 вторичными аминами

К раствору соединения **2.17** (0.2 ммоль) в ацетонитриле (4 мл), добавили соответствующий вторичный циклический амин (0.39 ммоль). Реакционную массу перемешали при температуре 50°C в течение 12 часов, охладили до комнатной температуры, разбавили хлористым метиленом (20 мл), промыли насыщенным раствором соды и насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой высушили над Mg₂SO₄ и упарили на роторном испарителе. Полученную смесь разделили методом препаративной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования (0-100% ацетонитрила), растворитель удалили на роторном испарителе.



(2S,3R,4R)-3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-4-(4-пирролидин-1-илпиперидин-1-ил)-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он 2.23. Желтое масло, 9 мг (11%), $[\alpha]_{20}^D = -115.82^\circ$ (с 2.03, CH₂Cl₂). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.): 5.05 (с, 1H), 5.00 (с, 1H), 3.91 (с, 3H), 3.56 (м, 1H), 3.29–2.91 (м, 8H), 2.81 (м, 1H), 2.65 (с, 1H), 2.27 (т, *J* 10.9 Hz, 1H), 2.11–1.83 (м, 9H), 1.69–1.48 (м, 2H), 1.35 (с, 5H), 1.02

(с, 3H), 0.91 (с, 3H). Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д.): 167.08, 158.19, 136.87, 101.35, 91.69, 83.39, 68.22, 64.49, 62.51, 61.35, 55.67, 51.39, 49.52, 32.19, 31.74, 28.29, 26.44, 23.20, 22.57, 19.96, 14.08. ИК спектр (ν, см⁻¹): 3213, 2928, 2857, 2782, 1724, 1669, 1635, 1437, 1377, 1354, 1321, 1193, 1150, 1126, 1085, 979. Масс-спектр: найдено 434.3009, вычислено *m/z* 434.30133 [M + H]⁺ для C₂₄H₄₀N₃O₄.

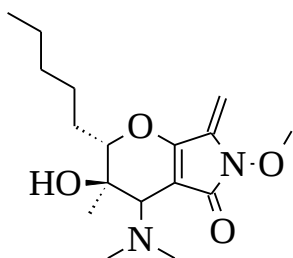


3-Гидрокси-4-(4-гидроксипиперидин-1-ил) -6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он 2.24. Желтое масло, 10 мг (16%), $[\alpha]_{20}^D = -111.11^\circ$ (с 0.36, CH₂Cl₂), *R_f* 0.20 (20:1 CH₂Cl₂-MeOH). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.): 5.17 (с, 1H), 5.03 (д, *J* 1.1 Hz, 1H), 5.00 (д, *J* 1.1 Hz, 1H), 3.93 (с, 3H), 3.68

(с, 1H), 3.59 (м, 1H), 3.02 (с, 1H), 2.87 (с, 2H), 2.35 (с, 1H), 2.03–1.85 (м, 3H), 1.68–1.50 (м, 6H), 1.35 (м, 5H), 1.05 (с, 3H), 0.91 (м, 3H). Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д.): 167.01,

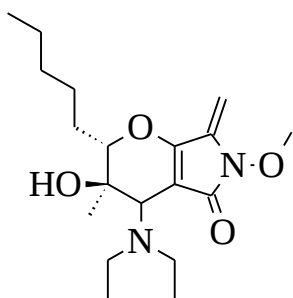
158.15, 136.85, 101.35, 91.75, 83.35, 68.20, 64.53, 62.45, 35.20, 31.79, 28.35, 26.48, 22.58, 20.00, 14.09. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3213, 2926, 2855, 1720, 1671, 1634, 1547, 1438, 1375, 1139, 1066, 1045. Масс-спектр: найдено 381.2377, вычислено m/z 381.23840 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$.

К раствору соединения **2.17** (0.2 ммоль) в ацетонитриле (4 мл) добавили триэтиламин (0.55 ммоль) и соответствующий вторичный ациклический амин (0.39 ммоль). Реакционную массу перемешали в течение 12 ч при комнатной температуре, разбавили хлористым метиленом (20 мл), промыли насыщенным раствором соды и насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой высушили над Mg_2SO_4 и упарили на ротаторном испарителе. Полученную смесь разделили методом колоночной хроматографии (хлористый метилен - метанол 100:1), растворитель удалили на ротаторном испарителе.



4-(Диметиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-c]пиррол-5(2H)-он (2.25). Желтое масло, 7.78 мг (45%), $[\alpha]_{20}^D = -158.11^\circ$ (с 2.03, CH_2Cl_2). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.26 (с, 1H), 5.03 (д, J 1.5 Hz, 1H), 4.99 (д, J 1.5 Hz, 1H),

3.93(с, 3H), 3.65-3.63 (м, 1H), 3.00 (с, 1H), 2.44 (с, 6H), 2.00 - 1.91 (м, 1H), 1.69 – 1.53 (м, 2H), 1.44 – 1.31 (м, 5H), 1.04 (с, 3H), 0.91 (т, J 6.7 Hz, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): δ 167.04, 158.23, 136.97, 101.59, 91.44, 83.10, 68.35, 64.44, 62.61, 31.72, 29.70, 28.27, 26.45, 22.55, 20.05, 14.04. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 3430, 2955, 2930, 2859, 1723, 1635, 1436, 1370, 1265, 1149, 986, 775. Масс-спектр: найдено 325.21218, вычислено m/z 325.21206 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$.

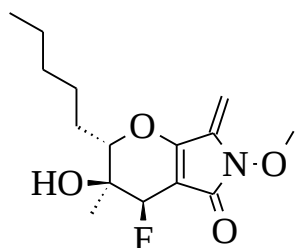


4-(Диэтиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-c]пиррол-5(2H)-он (2.26). Оранжевое масло, 9.39 мг (50%), $[\alpha]_{20}^D = -167.63^\circ$ (с 2.03, CH_2Cl_2). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): δ 5.23 (с, 1H), 5.03(д, J 1.5 Гц, 1H), 4.98 (д, J 1.5 Гц, 1H), 3.93

(с, 3H), 3.56 – 3.54 (м, 1H), 3.15 (с, 1H), 3.06 – 2.27 (м, 4H), 2.01 – 1.92 (м, 1H), 1.70 – 1.54 (м, 2H), 1.47 – 1.31 (м, 5H), 1.09 (с, 6H), 1.05 (с, 3H), 0.92 (т, J 6.8 Гц, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): δ 167.04, 158.23, 136.97, 101.59, 91.44, 83.10, 68.35, 64.44, 62.61, 31.72, 29.70, 28.27, 26.45, 22.55, 20.05, 14.04. ИК спектр (ν , см^{-1}): 3207, 2961, 2932, 2860, 1723, 1635, 1468, 1379, 1268, 1149, 978, 764. Масс-спектр: найдено 353.24348, вычислено m/z 353.24324 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$.

3.3.7 Взаимодействие ПРА с диэтиламиносератрифторидом (DAST)

ПРА (0.289 ммоль) растворили в хлористом метиле (8 мл), охладили до 0°C при перемешивании, добавили по каплям диэтиламиносератрифторид (0.434 ммоль). Реакционную массу перемешали в течение 1 часа, разбавили хлористым метилом (20 мл), промыли насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой высушили над Mg_2SO_4 и упарили на роторном испарителе. Полученную смесь разделили методом колоночной хроматографии (хлористый метил – метанол 20:1), растворитель удалили на роторном испарителе.



(2S,3R,4R)-4-Фтор-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метиле-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3с]пиррол-5(2H)-он (2.39). Желтое масло, 55.5 мг (64%), $[\alpha]_{20}^D = -189.88^\circ$ (с 2.03, CH_2Cl_2), R_f 0.45 (10:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Спектр

ЯМР ^1H (δ , м.д.): δ 5.12 (д, J 20.2 Гц, 2H), 4.90 (д, J 54.6 Гц, 1H), 4.09 – 4.00 (м, 1H), 3.93 (с, 3H), 2.53 (д, J 6.6 Гц, 1H), 2.05 – 1.91 (м, 1H), 1.75 – 1.59 (м, 2H), 1.49 – 1.36 (м, 5H), 1.07 (с, 3H), 0.92 (т, J 6.0 Гц, 3H). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): δ 164.31, 160.54, 135.77, 99.98, 93.48, 83.37, 81.78, 70.07, 64.61, 31.57, 27.18, 25.95, 22.52, 16.66, 14.06. Спектр ЯМР ^{19}F (δ_F , м.д.): -166.42 (F, CHF). ИК спектр (ν , см^{-1}): 3468, 2956, 2933, 2861, 1722, 1668, 1634, 1459, 1279, 1199, 993, 913. Масс-спектр: найдено 300.16051, вычислено m/z 300.16056 $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{FNO}_4$.

3.4 Оценка цитотоксической активности

3.4.1 Клеточная культура

Для оценки влияния исследуемых соединений на жизнеспособность раковых клеток использовали десять клеточных линий: MCF-7 (рак молочной железы), PC-3 (аденокарцинома простаты), HCT-116 (колоректальная раковая клетка), A549

(рак легких), K562 (хронический миелоидный лейкоз), THP-1 (острый моноцитарный лейкоз), NCI-H9292 и RPMI8226 (множественная миелома), Jurkat (острая Т-клеточная лейкемия), ФЭЧ (эмбриональные фибробласты человека). MCF-7, A549 и ФЭЧ (эмбриональные фибробласты человека) культивировали в среде DMEM, другие клеточные линии культивировали в среде RPMI 1640 (PanEco, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (GE Healthcare LifeSciences, США) и гентамицина при концентрации 40 мг / мл. Клетки высевали в 96-луночные планшеты 5×10^3 для адгезивных культур и 20×10^3 для суспензионных культур на лунку в 90 мкл культуральной среды. Испытуемые вещества растворяли в ДМСО до концентрации 1×10^{-2} М для последующего разбавления веществ, использовали культуральную среду без сыворотки. На следующий день вещества добавляли к клеткам в 3-4 повторения. В контрольные лунки добавляли 10-15 мкл бессывороточной среды. Клетки культивировали в течение 72 часов.

3.4.2 Оценка цитотоксичности методом МТТ (3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) - 2,5-дифенилтетразолийбромид))

Тест МТТ является колориметрическим методом, используемым для определения количества живых клеток после различного воздействия. Реагент МТТ (3- (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид) метаболизируется митохондриальными дегидрогеназами живых клеток в формазан. Кроме того, кристаллы формазана растворяют в ДМСО, и процент выживания клеток рассчитывают на уровне оптической плотности раствора.

После воздействия реагент МТТ добавляли в лунки в концентрации 5 мг / мл в объеме 20 мкл на лунку. Через 2-3 часа среду с реагентом удаляли и осадок кристаллов формазана растворяли в 60 мкл ДМСО. Оптическая плотность определяется с использованием спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Scientific, США) на длине волны 540 нм.

3.5 Исследование множественной лекарственной устойчивости

3.5.1 Клеточная культура

Для исследования множественной лекарственной устойчивости использовали клеточную линию HBL-100 (рак молочной железы) и сублинию

HBL-100/Dox, полученную путем длительной культивации с повышающимися концентрациями доксорубина и приобретая фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), т.е. устойчивость не только к доксорубину (устойчивость в 200 раз), но и к винбластину (устойчивость в 600 раз) и паклитакселу (устойчивость в 80 раз).

Клетки HBL-100/Dox гиперэкспрессируют белок ABC-транспортер Р-гликопротеин (Pgp), ответственный за выброс ксенобиотиков из клеток. В клетках HBL-100 Pgp не экспрессируется – $0,13 \pm 0,05\%$, а в сублинии HBL-100/Dox он обнаруживается на $91,8 \pm 4,9\%$.

Культуры RPMI8226/BTZ и K562/i-S9vlc - это культуры, устойчивые к бортезомибу, полученные путем длительной селекции с этим препаратом.

Гиперэкспрессией Pgp объясняется устойчивость к доксорубину, винбластину и паклитакселу, которые являются субстратами этого белка.

3.5.2 Исследования действия производных РРА на опухолевые клетки с фенотипом множественной лекарственной устойчивости

Исследование производили методом МТТ-теста. Клетки рассевали в 96-луночные планшеты по $20-25 \times 10^3$ клеток в лунку. Препараты (бортезомиб, доксорубин (Sigma-Aldrich, США) в объеме 15 мкл добавляли в различных концентрациях в тот же день. В контрольные лунки добавляли 15 мкл бессывороточной среды. Клетки культивировали в присутствии химиопрепаратов в течение 48 ч. Затем в лунки добавляли реагент МТТ в концентрации 5 мг/мл в объеме 20 мкл на лунку. Через 3 ч среду с реагентом удаляли и осадок растворяли в 60 мкл ДМСО. Уровень оптической плотности определяли с помощью спектрофотометра MultiScan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 492 нм. Вычисляли IC_{50} – полумаксимальную эффективную концентрацию препарата, которая вызывает гибель 50 % клеток. Уровень оптической плотности определяли с помощью спектрофотометра MultiScan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 492 нм.

3.6 Оценка острой токсичности при внутрибрюшинном введении

Исследование острой токсичности при внутрибрюшинном введении выполнено на белых беспородных мышах массой 16-20 г. В каждую группу исследования включали по 10 животных. Для приготовления стокового образца использовали раствор ДМСО, затем разбавляли забуференным фосфатом физиологическим раствором до концентрации, обеспечивающей введение требуемой дозы препарата в объеме, не превышающем 0.1 мл. Конечная концентрация ДМСО в растворе для введения - 5%. Диапазон доз, использованный в исследовании, составил от 8.25 до 200 мг/кг. Выживаемость и проявления токсических эффектов регистрировали в течение 14 суток после однократного внутрибрюшинного введения препарата. Животные в контрольной группе получали 5%-ный водный раствор ДМСО.

3.7 Масс-спектрометрия

Масс-спектры снимали на масс-спектрометре Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max. Условия: колонка Zorbax SB-C18 (Agilent Tech., США), зернение 1.8 мкм, размеры колонки 4.6×150 мм, градиент 1-95% ацетонитрила в 0.1%-ной муравьиной кислоте, поток 1 мл/мин. Данные по PDA детекции: диапазон сканирования 200-800 нм. Данные по MS детекции: тип ионизации HESI, диапазон сканирования 50-1000 m/z. Для растворения образцов веществ использовался метанол. Масс-спектры высокого разрешения получены с помощью масс-спектрометра ион-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ESI-FT-ICR MS) SolariX XR 7T (Bruker Daltonics). Образцы вводили в режиме прямого ввода (2 мкл/мин), при использовании источника ионов электроспрей (ESI). Спектры HRMS получали в режиме регистрации положительных ионов, диапазон сканирования 150 – 3000 Да, напряжение на капилляре 4500 В. Калибровку проводили с использованием раствора трифторацетата натрия, образующего кластерные ионы в интересующей нас области масс. Масс-спектры высокого разрешения обрабатывали с помощью программного обеспечения Data Analysis 5.0 (Bruker Daltonics, Германия).

3.8 Спектральные исследования

Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{19}F регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 на частотах 400.13, 100.61 и 375.50 МГц соответственно, растворитель – CDCl_3 . Этот же растворитель использовали в качестве внутреннего стандарта. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C уточнено с помощью спектров, снятых в режиме DEPT, а также по данным двумерных корреляционных ^1H - ^{13}C HMQC и HMBC, COSY и ROXY экспериментов. ИК спектры получали на приборе Bruker Alpha (растворы в CH_2Cl_2).

3.9 Определение других физико-химических характеристик

Измерение оптической активности проводили на поляриметре Optical Activity Polaar 3005 с использованием кюветы на 2.5 см и фильтра 589 нм. Для растворения образцов веществ использовали хлористый метилен.

3.10 Получение индивидуальных веществ методом препаративной ВЭЖ

Получение индивидуальных веществ осуществляли методом препаративной ВЭЖХ на приборах АСТА Pure и Puri Flash. Условия: колонка Agilent 5 Prep-C18 (Agilent Tech., США), зернение 5 мкм, размеры колонки 21.2×150 мм, градиентное элюирование 1-95% ацетонитрила в 0,1% уксусной кислоте и изократическое элюирование 1-30% / 40-60% ацетонитрила в воде, поток 20 мл/мин. Данные по PDA детекции: диапазон сканирования 200-800 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны методики введения разнообразных фармакофорных группировок к атому C(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 C(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 C(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 C(4) с изменением конфигурации этого хирального атома.
6. Экспериментально определена цитотоксическая активность полученных C(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 **2.16** и **2.25**, имеющие у атома C(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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agarwal, N. Natural herbs as anticancer drugs / N. Agarwal, C. Majee, G.S. Chakraborty // *Int. J. PharmTech Res.* – 2012. V.4. – P. 1142-1153.
2. Chanda, S. In vitro and in vivo methods for anticancer activity evaluation and some Indian medicinal plants possessing anticancer properties: an overview / S. Chanda, K. Nagani // *J. Pharmacogn and Phytochem.* – 2013. V. 2, № 2. – P. 140-152.
3. Patel, S.G. A Review on medicinal plants for cancer therapy / S.G. Patel // *Int. J. MediPharm Res.* – 2016. V. 2. – P. 105-112.
4. Singh, S. Lead phytochemicals for anticancer drug development-A Review / S. Singh, B. Sharma, S.S. Kanwar, A. Kumar // *Front. Plant. Sci.* – 2016. V. 7. – P. 1-13.
5. Thomson, A.K. Beliefs and perceptions about the causes of breast cancer: a case-control study / A.K. Thomson, J.S. Heyworth, J. Girschik, et al // *BMC Res. Notes.* – 2014. V. 7. – P. 558.
6. Петровский, Б. В. Большая медицинская энциклопедия. / Б. В. Петровский. - Москва: Изд-во Сов. энциклопедия, 1988. – Т. 21. – 928 с.
7. Tesfaye, T. A. Review on Anticancer Activity of Some Plant-Derived Compounds and Their Mode of Action / T. Tesfaye, Y. D. Ravichadran // *Nat. Prod. Chem. Res.* – 2018. V.6, № 4. – P. 1 - 9.
8. Hande, K. R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor / K. R. Hande // *Eur. J. Cancer.* – 1998. – V. 34, № 10. – P. 1514 - 1520.
9. DeCorte B. L. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. / B. L. DeCorte // *J. Med. Chem.* – 2016. V. 5. – P. 9295–9304.
10. Myer, N. Plants, People and Culture: The Science of Ethnobotany / N. Myer // *Environment. Conservat.* – 1997. – V. 24, № 1. – P. 90–96.
11. Samuelsson, G. Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy. / G. Samuelsson. – Stockholm: 5th Swedish Pharmaceutical Press, 2004. – 551 p.
12. Isaacs, J. Aboriginal Food and Herbal Medicine. / J. Isaacs. – Sydney: New Holland Press, 2002. – 256 p.

13. Buss, T. In Biodiversity: New Leads for Pharmaceutical and Agrochemical Industries / T. Buss, S. K. Wrigley, M. A. Hayes. - Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2000. – P. 75-85.
14. Grabley, S. In Drug Discovery from Nature; S. Grabley, R. Thiericke. Berlin: Springer-Verlag, 1999. – P. 3-33.
15. Солдатенков, А.Т. Основы органической химии лекарственных веществ / А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина, И.В. Шендрик. - М.: Химия, 2001. - 192 с.
16. Cragg, G.M. Anticancer Agents from Natural Products / G.M. Cragg, D.G.I. Kingston, D.J. Newman. - Florida, Brunner-Routledge Psychology Press, 2005 P. 89–122.
17. Newman, D.J. The influence of natural products upon drug discovery / D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader // Nat. Prod. Rep. - 2000. - V.17, № 3. – P. 215 – 234.
18. Butler, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery / M.S. Butler // J. Nat. Prod. - 2004. – V. 67, № 12. – P. 2141– 2153.
19. Беликов, В. Г. Фармацевтическая химия / В. Г. Беликов. — М.: МЕДпресс-информ, 2007. — 624 с.
20. Newman, D. J. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002 / D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader // J. Nat. Prod. – 2003. – V. 66. – P. 1022-1037.
21. Concepcion, G. P. In Bio-exploitation of Filamentous Fungi / G. P. Concepcion, S. B. Pointing, K. D. Hyde. - Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2001. – P. 93-130.
22. Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach / P. M. Dewick. - West Sussex, England: John Wiley & Sons, 2009. – 514 p.
23. Shakya, A.K. Medicinal plants: future source of new drugs / A.K. Shakya // Int. J. Herb. Med. – 2016. - V. 4. – P. 59-64.
24. Ramakrishnan, R. Potential clinical applications of natural products of medicinal plants as anticancer drugs—A Review / R. Ramakrishnan // Int. J. MediPharm. Sci. -2013. –V. 3. – P. 127-138.

25. Rayan, A. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity / A. Rayan, J. Raiyn, M. Falah // PLoS One. – 2017. - V. 12, № 11. – P. 1– 12.
26. Johnson, T. CRC Ethnobotany Desk Reference / T. Johnson. – Florida: CRC Press, 1999. – 1211 p.
27. Farnsworth, N. R. Medicinal plants in therapy / N. R. Farnsworth, R. O. Akerele, A. S. Bingel, et al // Bull. World Health Organ. – 1985. – V. 63. – P. 965–981.
28. Cragg, G. M. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents / G. M. Cragg, P. G. Grothaus, D. J. Newman // Chem. Rev. – 2009. – V. 109. – P. 3012–3043.
29. Sneader, W. Drug Discovery: A History / W. Sneader. - Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. – 472 p.
30. Hare, R. The Birth of Penicillin and the Disarming of Microbes / R. Hare. – London: Allen and Unwin, 1970. – 425 p.
31. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. Influenzae / A. Fleming // Br. J. Exp. Pathol. – 1929. – V. 10. – P. 226–236.
32. Hlavka, J. J. The tetracyclines. In Handbook of Experimental Pharmacology / J. J. Hlavka, J. H. Boothe. - Berlin: Springer-Verlag, 1985. – P. 1 – 3.
33. Endo, A. A new hypocholesterolemic agent produced by a Monascus species / A. Endo, K. Monacolin // J. Antibiot. – 1979. – V. 32. – P. 852–854.
34. Alberts, A. W. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent / A. W. Alberts, J. Chen, G. Kuron // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1980. – V. 77. – P. 3957–3961.
35. Srivastava, V. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads / V. Srivastava, A. S. Negi, J. K. Kumar, et al // Bioorg. Med. Chem. – 2005. – V. 13. – P. 5892–5908.
36. Sisodiya, P.S. Plant derived anticancer agents: A Review / P.S. Sisodiya // Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci. – 2013. – V. 2. – P. 293-308.
37. Cassady, J.M. Anticancer Agents Based on Natural Product Models / J.M. Cassady, J.D. Douros. - New York: Academic Press, 1980. – 500 p.

38. Cragg, G. M. Nature: a vital source of leads for anti-cancer drug development / G. M. Cragg, D. J. Newman // *Phytochem. Rev.* – 2009. – V. 8. – P. 313–331.
39. Rinehart, K. L. Antitumor compounds from tunicates / K. L. Rinehart // *Med. Res. Rev.* – 2000. – V. 20. – P. 1–27.
40. Di Marco, A. Daunomycin, a new antibiotic of the rhodomycin group / A. Di Marco, M. Gaetani, P. Orezzi // *Nature*. – 1964. – V. 201. – P. 706–707.
41. Arcamone, F. The structure of daunomycinone / F. Arcamone, G. Franceschi, P. Orezzi // *J. Am. Chem. Soc.* – 1964. – V. 86. – P. 5334–5335.
42. Lee K. H. Current Developments in the Discovery and Design of New Drug Candidates from Plant Natural Product Leads. / K. H. Lee // *J. Nat. Prod.* – 2004. – V. 67, № 2. – P. 273–283.
43. Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs / M. Gordaliza // *Clin. Transl. Oncol.* – 2007. – V. 9. – P. 767–776.
44. Podwyssotzki V. *Pharmakologische Studien uber Podophyllum peltatum* / V. Podwyssotzki // *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* – 1880. – V. 13. – P. 29–52.
45. Wani, M.C. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* / M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, // *J. Am. Chem. Soc.* – 1971. – V. 93. – P. 2325–2327.
46. Baloglu, E. The taxane diterpenoids / E. Baloglu, D. G. I. Kingston // *Nat. Prod.* – 1999. – V. 62. – P. 1448–1472.
47. Eisenhauer, E. A. The Taxoids Comparative Clinical Pharmacology and Therapeutic Potential / E. A. Eisenhauer, J. B. Vermorken // *Drugs*. – 1998. – V. 55, № 5. – P. 1–26.
48. Crombag, M.R. Pharmacokinetics of selected anticancer drugs in elderly cancer patients: focus on breast cancer / M.R. Crombag, M. Joerger, B. Thürlimann et al. // *Cancers*. – 2016. – V. 8. – P. 6.
49. Li W.W. Natural Products in Ovarian Cancer Therapy / W.W. Li, O.R. Johnson-Ajinwo, F.I. Uche // *Int. J. Cancer Res. Prev.* – 2016. – V. 9. – P. 81.
50. Alam S. Plants and its parts as a source of anticancer compound: A review / S. Alam, P. Satpathy, A. Thosar // *Int. Res. J. Pharm.* – 2014. – V. 5. – P. 244–250.

51. Wall, M. E. Camptothecin and taxol: discovery to clinic / M. E. Wall // *Med. Res. Rev.* – 1998. – V. 18. – P. 299-314.
52. Balunas M. J. Drug discovery from medicinal plants: Minireview / M. J. Balunas, A. D. Kinghorn // *Life Sciences.* – 2005. – V.78. - P. 431 – 441.
53. Schacter, L. Etoposide phosphate: what, why, where, and how? / L. Schacter // *Semin. Oncol.* – 1996. – V. 6, № 13. – P. 1-7.
54. Bissery, M. A. Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue / M. A. Bissery, D. Guenard, F. Gueritte-Voegelein, et al // *Cancer Res.* – 1991. – V. 51. – P. 4845-4852.
55. Ringel, I. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol / I. Ringel, S. B. Horwitz // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1991. – V. 83. – P. 288-291.
56. Pazdur, R. The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere) / R. Pazdur, A. P. Kudelka, J. J. Kavenagh // *Cancer Treat. Rev.* – 1993. – V. 19. – P. 351-386.
57. Sausville, E.A. Cyclin-dependent kinases: initial approaches to exploit a novel therapeutic target / E.A. Sausville, D. Zaharevitz, R. Gussio // *Pharm. Therap.* - 1999. – V. 82. – P. 285-292.
58. Meijer, L. Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials / L. Meijer, E. Raymond // *Acc. Chem. Res.* – 2003. –V. 36. – P. 417–425.
59. Chang, Y.T. Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-purine libraries as CDK inhibitors / Y.T. Chang, N.S. Gray, G.R. Rosania // *Chem. Biol.* – 1999. – V. 6. – P. 361–375.
60. Thibeault, D. Synthesis and structure–activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -O-monodesmosidic saponins starting from botulin / D. Thibeault, C. Gauthier, J. Legault // *Bioorg. Med. Chem.* – 2007. – V. 15, № 18. – P. 6144–6157.
61. Biswas, J. Anticancer drug development based on phytochemicals / J. Biswas, M. Roy, A. Mukherjee // *J. Drug. Disc. Develop. Delivery.* – 2015. – V. 2. – P. 1012-1017.

62. Li, J. Modulating betulinic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by managing the intracellular supplies of the co-factor NADPH and oxygen / J. Li, Y. Zhang // *J. Biosci. Bioeng.* – 2015. – V. 119, № 1. – P. 77–81.
63. Громова, Н.Ю. Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ: учебное пособие. / Н.Ю. Громова, Ю.Ю. Косивцов, Э.М. Сульман. – Тверь: ТГТУ, 2006. - 84 с.
64. Харкевич, Д. А. Фармакология: учебник. - 10-е изд., испр., перераб. и доп. / Д. А. Харкевич. - м.: гэотар-Медиа, 2010. - 752 с.
65. Зефилов, Н. С. Рациональный дизайн лекарств. / Н. С. Зефилов, О. Н. Зефирова // «Химия и жизнь — XXI век». – 2004. - № 11. – С. 6-9.
66. Ramachandran, K. I. Computational Chemistry and Molecular Modeling / K. I. Ramachandran, G. Deepa, P. K. Krishnan Namboori. – India: Springer, 2008. – 19 p.
67. Strobel, G. Natural Products from Endophytic Microorganisms. / G. Strobel, B. Daisy, U. Castillo // *J. Nat. Prod* – 2004. V. 67, № 2. - P. 257-268.
68. Поддубный, О. Ю. Химия гетероциклических лекарственных веществ: учебно-методическое пособие. / О. Ю. Поддубный. - Армавир: ИП Калегин Ю.В., 2020. – 76 с.
69. Галкина, И.В. Основы химии биологически активных веществ: учебное пособие / И.В. Галкина. – Казань: КГУ, 2009. - 152 с.
70. Gomes, C.A. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure–activity study / C.A. Gomes, T. Girão da Cruz, J.L. Andrade, et al // *J. Med. Chem.* – 2003. - V. 46. – P. 5395-5401.
71. Пак, В.Д. Органическая химия / В.Д. Пак, Н.Н. Яганова, Г.А. Гартман. – Пермь: ПГСХА, 2006. – 267 с.
72. Воробьёв, С. И. Газотранспортные препараты на основе перфторуглеродных эмульсий (обзор) / С. И. Воробьёв, Г. Р. Иваницкий, В. В. Мороз и др. // *Вестник интенсивной терапии.* — 1996. — № 2—3. — С. 15—21.
73. Zhou, Y. Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II-III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New

Structural Trends and Therapeutic Areas. / Y. Zhou, J. Wang, Z. Gu, et al // Chem. Rev. – 2015. – V. 166, №2. – P. 422 – 518.

74. Носова, Э. В. Биологически активные вещества гетероциклической природы: учеб. пособие / Э.В. Носова. — Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019. — 144 с.

75. Maloney, K. N. Phaeosphaeride A, an Inhibitor of STAT3-Dependent Signaling Isolated from an Endophytic Fungus. / K. N. Maloney, W. Hao, J. Xu, J. Gibbons, J. Hucul, D. Roll, S. F. Brady, F. C. Schroeder, J. Clardy // Org. Lett. – 2006. – V. 8, № 18. – P. 4067 - 4070.

76. Kobayashi, K. Synthesis of the proposed structure of phaeosphaeride A. / K. Kobayashi, I. Okamoto, N. Morita, T. Kiyotani, O. Tamura // Org. Biomol. Chem. – 2011. – V. 9. – P. 5825 - 5832.

77. Chatzimpaloglou, A. Total synthesis and biological activity of the proposed structure of phaeosphaeride A. / A. Chatzimpaloglou, M.P. Yavropoulou, K. E. Rooij, R. Biedermann, U. Mueller, S. Kaskel, V. Sarli // J. Org. Chem. – 2012. – V. 77, № 21. - P. 9659 – 9667.

78. Chatzimpaloglou, A. Synthetic and biological studies of phaeosphaerides. / A. Chatzimpaloglou, M. Kolosov, T. K. Eckols, D. J. Tweardy, V. J. Sarli // Org Chem. – 2014. – V. 79, № 9. – P. 4043 - 4054.

79. Патент РФ № 2596928 (2015). Штамм *Paraphoma* sp. - продуцент феосфериды А / А.О. Берестецкий, Е.В. Полуэктова, С.В. Сокорнова, Ю.С. Токарев / <https://patents.google.com>. – 6 p.

80. Abzianidze, V. V. Crystal structure of natural phaeosphaeride A. / V. V. Abzianidze, E. V. Poluektova, K. P. Bolshakova, T. L. Panikorovskii, A. S. Bogachenkov, A. O. Berestetskiy // Acta Cryst. – 2015. – V. 71. – P. 625–626.

81. Sarli, V. Total synthesis and biological activity of the proposed structure of phaeosphaeride A / V. Sarli, A. Chatzimpaloglou, M.P. Yavropoulou, K.E. Rooij, R. Biedermann, U. Mueller, S. Kaskel // J. Org. Chem. - 2012. - V. 77. - P. 9659-9667.

82. Kobayashi, K. Total synthesis of (–)-phaeosphaeride B by a biomimetic conversion from (–)-phaeosphaeride A. / K. Kobayashi, R. Kunimura, K. Tanaka, O. Tamura, H. Kogen // Tetrahedron. – 2017. – V. 73. – P. 2382–2388.

83. Li, C.-S. A new metabolite with a unique 4-pyranone- γ -lactam-1,4-thiazine moiety from a Hawaiian-plant associated fungus. / C.-S. Li, Y. Ding, B.-J. Yang, G. Miklossy, H.-Q. Yin, L.A. Walker, J. Turksom, S. Cao // *Org. Lett.* – 2015. – V. 17. – P. 3556–3559.
84. Pommier, Y. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. / Y. Pommier, E. Leo, H. Zhang, C. Marchand // *Chem. Biol.* -2010. – V. 17, № 5. – P. 421 - 433.
85. Abzianidze, V.V. Synthesis of natural phaeosphaeride A derivatives and an in vitro evaluation of their anti-cancer potential / V.V. Abzianidze, D.S. Prokofieva, L.A. Chisty, K.P. Bolshakova, A.O. Berestetskiy, T.L. Panikorovskii, A.S. Bogachenkov, A.A. Holder // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2015. – V. 25. – P. 5566-5569.
86. Abzianidze, V.V. Synthesis of 7-(4-methylphenyl)thiomethyl and 7-morpholylmethyl derivatives of natural phaeosphaeride A and their cytotoxic activity / V.V. Abzianidze, K.P. Bolshakova, D.S. Prokofieva, A.O. Berestetskiy, V.A. Kuznetsov, Yu. G. Trishin // *Mend. Comm.* – 2017. – V. 27, № 5. – P. 82-84.
87. Коптева, Н.И. Методы органического синтеза: алкилирование, ацилирование: Учебно-методическое пособие для вузов / Н.И. Коптева, С.М. Медведева. - Воронеж. – 2008. – 34 с.
88. Berry, D.J. Catalysis by 4-dialkylaminopyridines. / D.J. Berry, C.V. Digiovanna, S.S. Metrick, R. Murugan // *Arkivoc.* - 2001. - P. 201-226.
89. Кнунянц, И.Л. Химическая энциклопедия / И.Л. Кнунянц и др. — М.: Советская энциклопедия, 1988. — Т. 1 (Абл-Дар). — 623 с.
90. Abzianidze, V. V. Synthesis of natural phaeosphaeride A and semi-natural phaeosphaeride B derivatives. / V. V. Abzianidze, K. P. Efimova, E. V. Poluektova, Y. G. Trishin, V. A. Kuznetsov // *Mendeleev Communications.* – 2017. - V. 27, № 5. - P. 490-492.
91. Рамазанова, П.А. Синтез алкилпроизводных на основе 2 – меркаптобензоимидозола, -оксазола и –тиазола / П.А. Рамазанова, Д.Ш. Магомедова. - Известия ДГПУ, 2009. - Т. 3. – С. 1 - 9.

92. Maske, P. Synthesis and antiprotozoal activity of nitro and halogeno substituted some novel mercaptobenzimidazole derivatives. / P. P. Maske, S. G. Lokapure, D. Nimbalkar, J. I. Disouza // *Der Pharma Chemica*. - 2012. – V. 4, № 3. – P. 1283 -1287.
93. Gupta, S. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Mercaptobenzimidazole Derivatives as Anti-inflammatory Agents. / S. Gupta, S. P. Gupta, N. Upmanyu, G. Garg // *Russ. Chem. Bull., International Edition*. – 2016. - V. 65, №. 12, P. 2868—2872.
94. Osipova, E. Yu. Ferrocenylalkylation of 2mercaptobenzoxazoles. / E. Yu. Osipova, A. S. Ivanova, A. N. Rodionov, A. A. Korlyukov, D. E. Arkhipov, A. A. Simenela // *Russian in Izvestiya Akademii Nauk. Seriya Khimicheskaya*. - 2016. – V. 12. - P. 2868—2872.
95. Faulds, D. Mitoxantrone: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in the Chemotherapy of Cancer / D. Faulds, J.A. Balfour, P. Chrisp and H.D. Langtry // *Drugs*. – 1991 – V. 41. – P. 400 – 449.
96. Lee, I.C. Withaferin-A—A Natural Anticancer Agent with Pleiotropic Mechanisms of Action / I.C. Lee, B.Y. Choi // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – V. 17. – P. 290 – 312.
97. Nelson, R. L. The comparative clinical pharmacology and pharmacokinetics of vinesine, vincristine, and vinblastine in human patients with cancer / R.L. Nelson // *Medical and Pediatric Oncology*. – 1982. – V.10. – P. 115 – 127.
98. AlHokbany, N. Spectroscopic investigation and density functional theory calculations of mercaptobenzothiazole and mercaptobenzimidazole ligands and their rhenium complexes. / N. AlHokbany, I. AlJammaz // *Open J. Inorg. Chem.* – 2011. – V. 1. – P. 23 – 32.
99. Seenaiiah D. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of pyrimidinyl benzoxazole, benzothiazole and benzimidazole. / D. Seenaiiah, P. R. Reddy, G. M. Reddy, A. Padmaja, V. Padmavathi, N. Siva krishna // *Eur. J. Med. Chem.* – 2014. – V. 77. – P. 1 – 7.
100. Maruthamuthu D. The chemistry and biological significance of imidazole, benzimidazole, benzoxazole, tetrazole and quinazolinone nucleus. / D. Maruthamuthu, S. Rajam, P. C. R. Stella, A. G. B. Dileepan, R. Ranjith // *J. Chem. Pharm. Res.* - 2016. – V. 8, № 5. – P. 505 - 526.

101. Al-Harthy, T. Design, Synthesis, and Cytotoxicity of 5-Fluoro-2-methyl-6-(4-aryl-piperazin-1-yl) Benzoxazoles. / T. Al-Harthy, W. M. Zoghaib, M. Pfluger, M. Schopel, K. Onder, M. Reitsammer, H. Hundsberger, R. Stoll, R. Abdel-Jalil // *Molecules*. – 2016. - V 21, № 10. – P. 1290.
102. Abdelgawad, M. A. Design, synthesis and biological evaluation of some novel benzothiazole/benzoxazole and/or benzimidazole derivatives incorporating a pyrazole scaffold as antiproliferative agents. / M. A. Abdelgawad, R. B. Bakr, H. A. Omar // *Bioorg. Chem.* – 2017. - V. 74. – P. 82 - 90.
103. Du, Z. Alkyl 2-(2-benzothiazolylsulfinyl)acetates as useful synthetic reagents for alkyl 4- hydroxyalk-2-enoates by sulfinyl-Knoevenagel reaction. / Z. Du, T. Kawatani, K. Kataok // *Tetrahedron*. – 2012. – V. 68, № 11. – P. 2471 – 2480.
104. 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 // *BMCL*. – 2019. - V. 29, № 1. - P. 59–61.
105. Sokolova, S. A. Synthesis and biological activity of heterocyclic borneol derivatives / S. A. Sokolova, O. I. Yarovaya, A. A. Shtro // *Chem. Heterocyclic Comp.* 2017. – V. 53, № 3. – P. 371–377.
106. Abdel-Aziz, H.A. 2-((Benzimidazol-2-yl)thio)-1-arylethan-1-ones: Synthesis, crystal study and cancer stem cells CD133 targeting potential / H.A. Abdel-Aziz, H.A. Ghabbour, W. M. Eldehna, S. T.A. AlRashood, K. A. Al-Rashood, H.-K. Fun, M. Al-Tahhan, A. AlDhfyhan // *Eu. J. of Med. Chem.*, 2015. – V. 104. – P. 1-10.
107. 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 // *Mend. Comm.* – 2021. – V. 31, № 5. – P. 662 - 663.
108. 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.

109. Андриенко, О.С. Практические методы введения фтора в органические соединения / О.С. Андриенко, В.И. Сачков, В.А. Яновский. – Томск. - 2010. - 176 с.
110. Olah, G.A. Synthetic methods and reactions. 63.1 Pyridinium poly(hydrogen fluoride) (30% pyridine–70% hydrogen fluoride): a convenient reagent for organic fluorination reactions / G.A. Olah, J.T. Welch, D.V. Yashwant, et al. // J. Org. Chem. - 1979. - Vol. 44. - P. 3872-3881.
111. Olah, G.A. Domino Diels-Alder reactions. I. Applications to the rapid construction of polyfused cyclopentanoid systems / G.A. Olah, M.L. Nojima, I. H. Kerekes // J. Am. Chem. Soc. - 1974. - Vol. 96. - P. 925-927.
112. Middleton, W.J. New fluorinating reagents. Dialkylaminosulfur fluorides / W.J. Middleton // J. Org. Chem. - 1975. - Vol. 40, № 5. - P. 574-578.
113. Cossy, J. Ring enlargement and ring contraction induced by diethylaminosulfur trifluoride (DAST). / J. Cossy, H. Ferret, I. Déchamps, D. G. Pardo, L. Van Hijfte // Arkivoc. – 2010. – V.8. – P. 126-159.
114. Данченко, Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур / Е.О. Данченко. - Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2012. – Т. 22, № 2. – С. 22 – 31.
115. Missailidis S. Anticancer Therapeutics / S. Missailidis. - John Wiley & Sons Ltd., Publication. – UK. – 2008. – 424 p.
116. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов. — М.: Гриф и К. - 2012. — 944 с.
117. Волкова, Т. О. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. Экологические аспекты / Т. О. Волкова, У. С. Багина. - Принципы экологии. - 2012. № 2. - С. 4–21.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

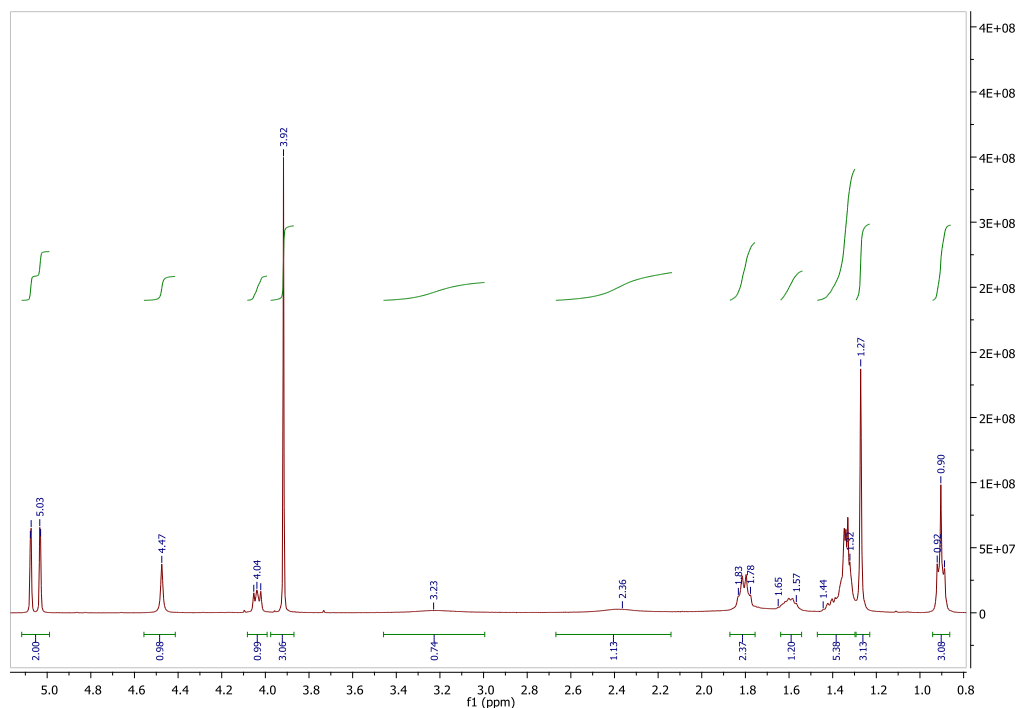
ИК, ЯМР ^1H , ^{19}F , ^{13}C , и масс-спектры продуктов реакций

Рисунок 1 - Спектр ЯМР ^1H (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)-она **2.1**

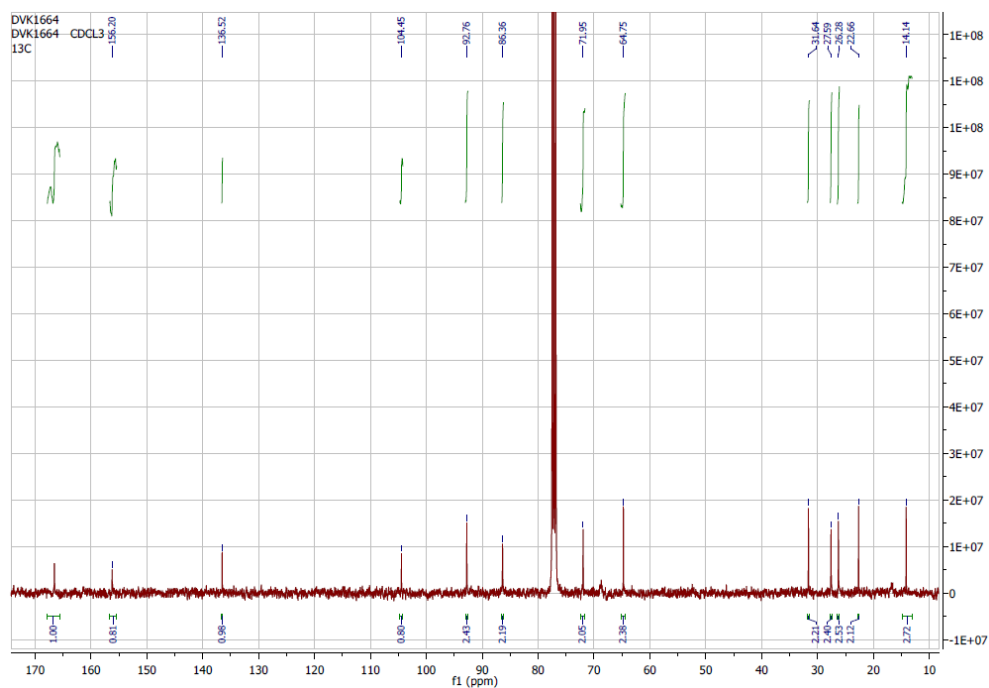


Рисунок 2 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S)-3,4-дигидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-она **2.1**

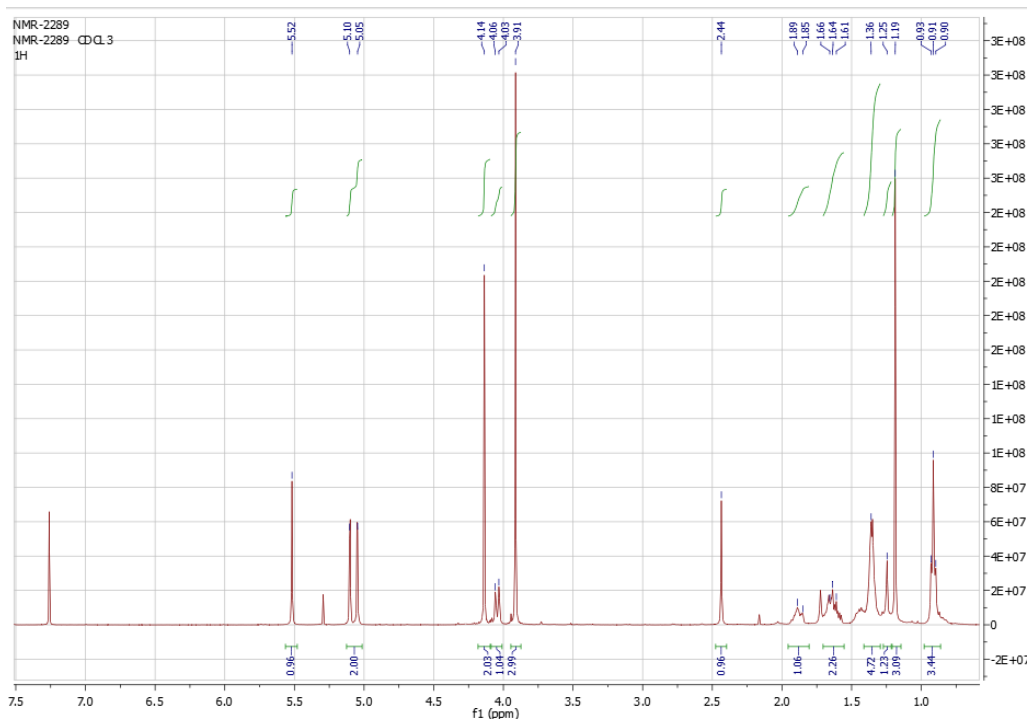


Рисунок 3 - Спектр ЯМР ^1H (2S,3R,4S) -3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-илхлорацетата **2.4**

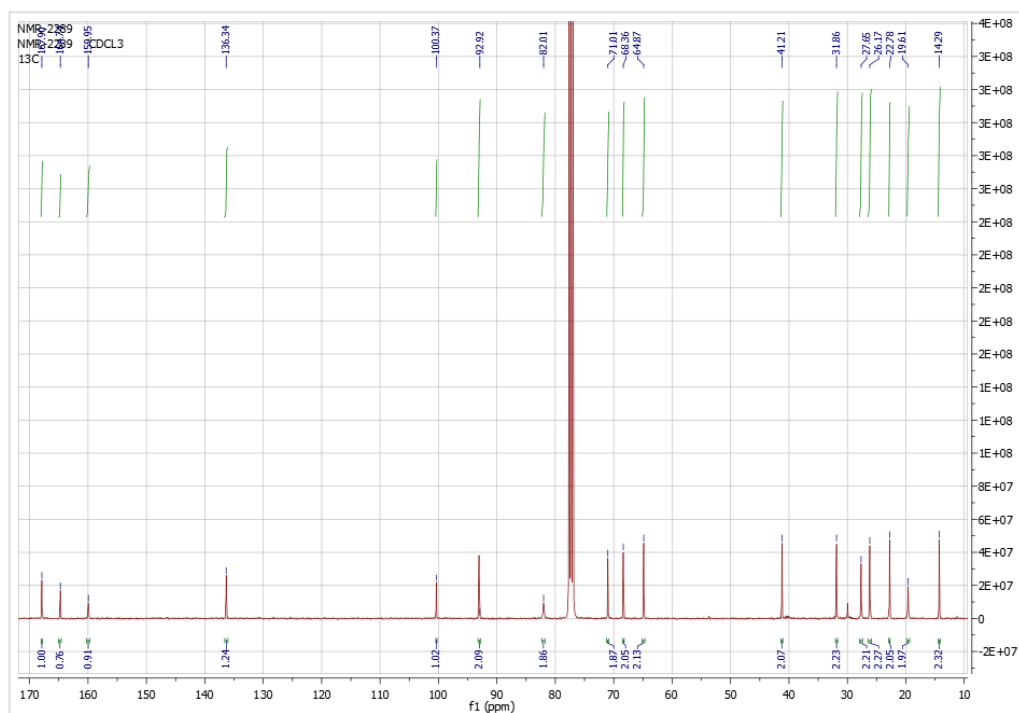


Рисунок 4 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S) -3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-илхлорацетата **2.4**

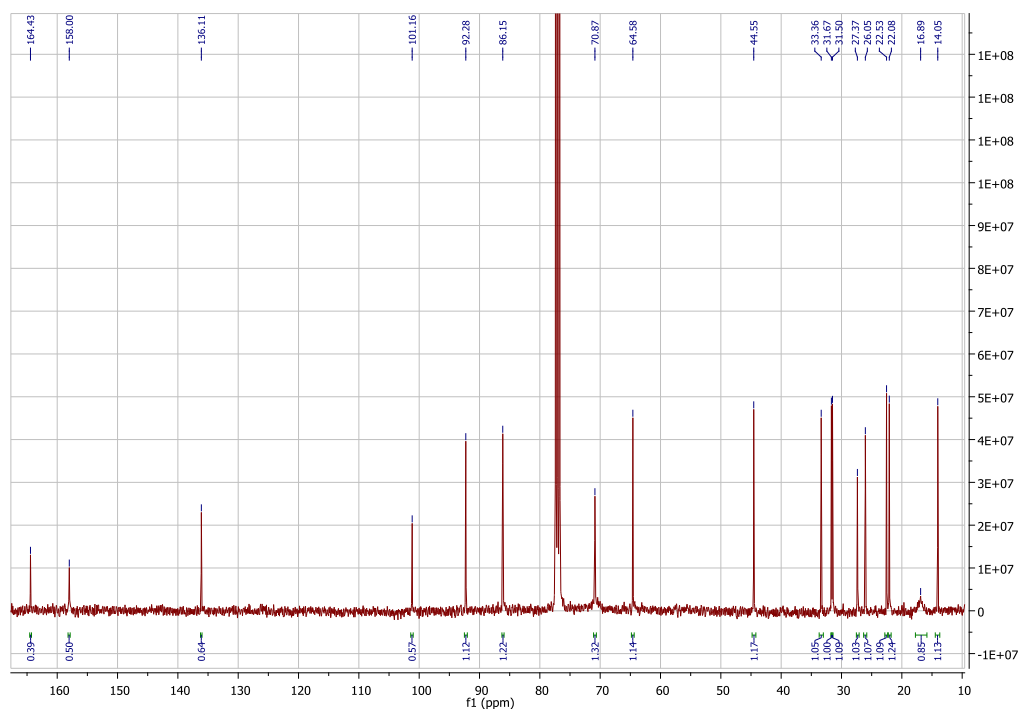


Рисунок 5 - Спектр ЯМР ^{13}C 3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-5-хлорпентаноата 2.5

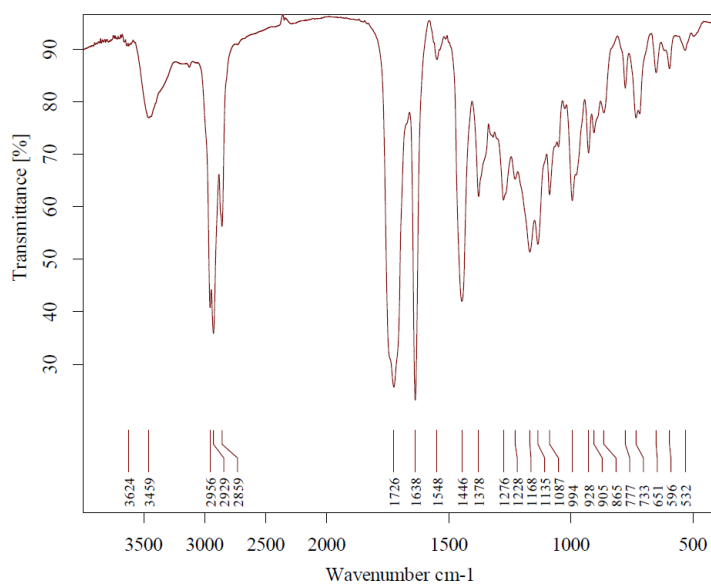


Рисунок 6 - ИК спектр 3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-5-хлорпентаноата 2.5

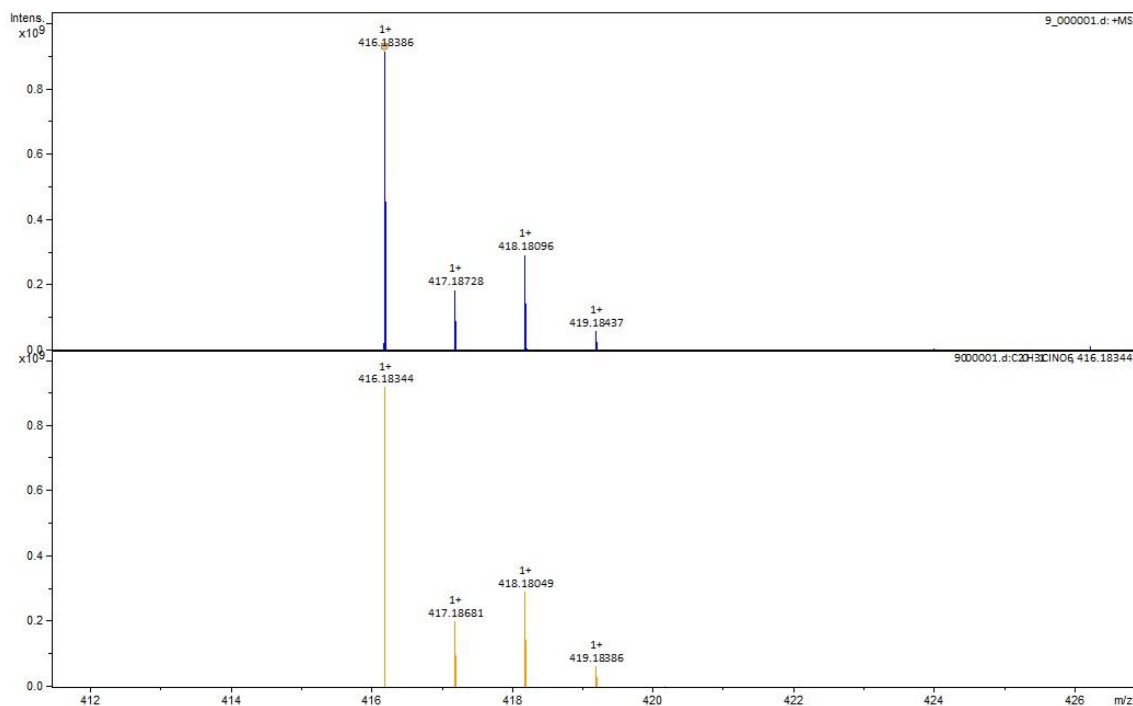


Рисунок 7 - Масс-спектр 3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-5-хлорпентаноата **2.5**

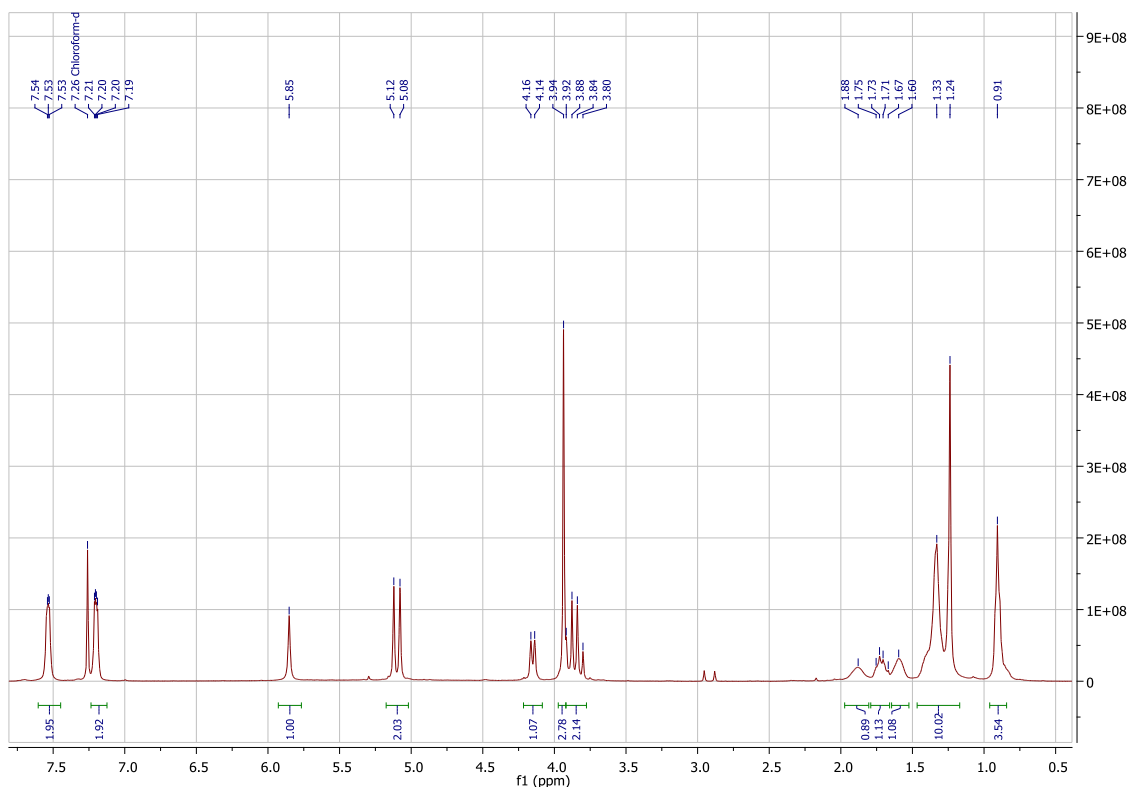


Рисунок 8 - Спектр ЯМР ^1H (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1H-бензимидазол-2-илтио)ацетата **2.7**

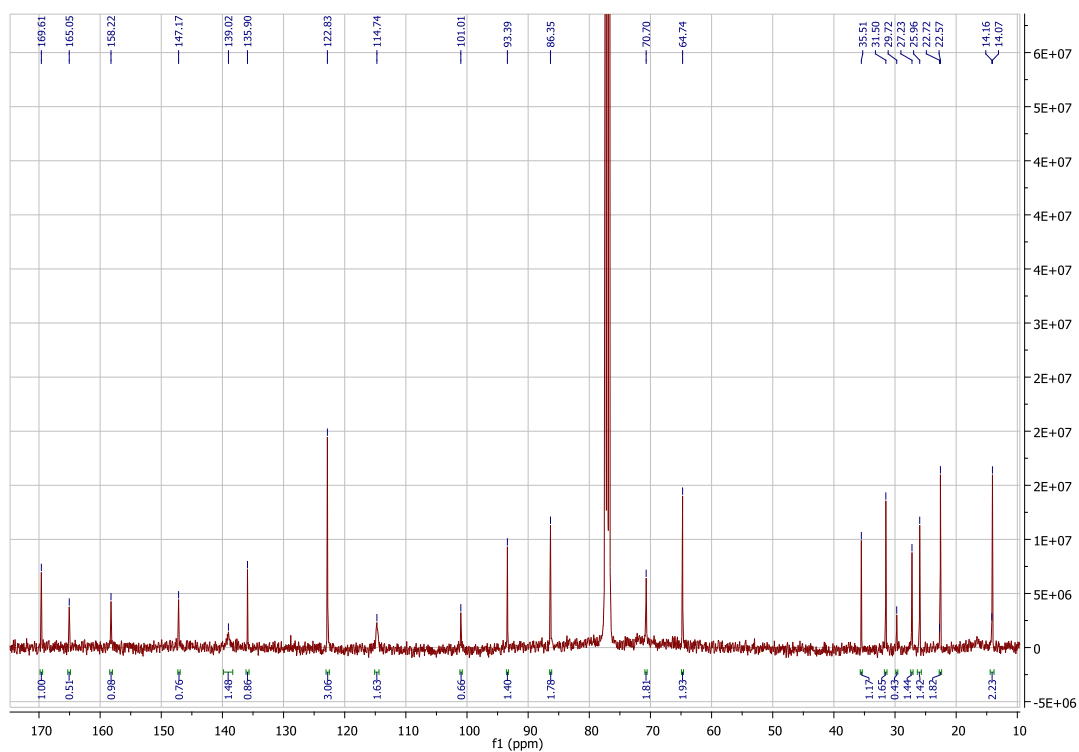


Рисунок 9 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метил-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1H-бензимидазол-2-илтио)ацетата **2.7**

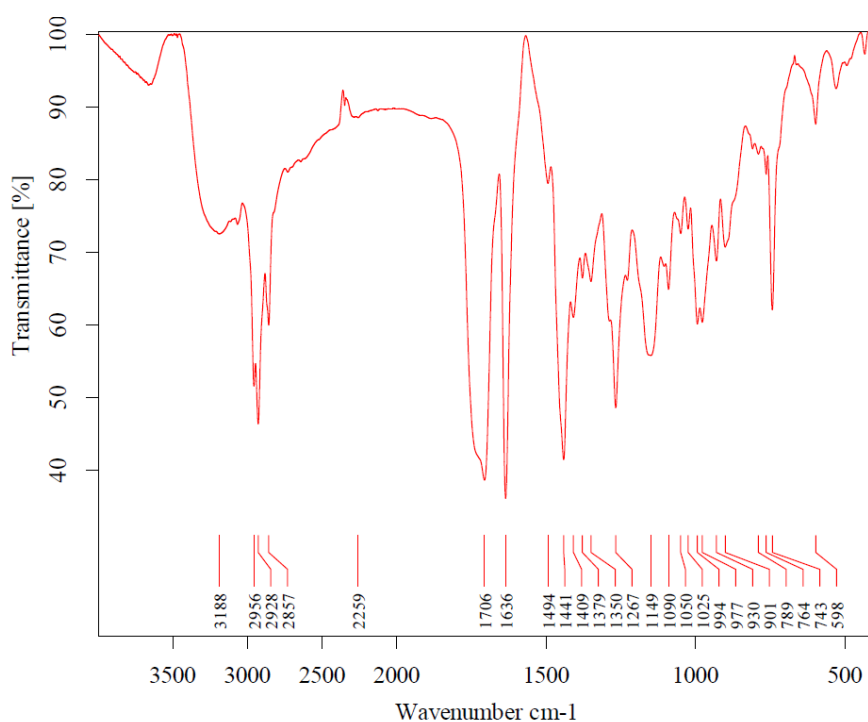


Рисунок 10 - ИК спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метил-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1H-бензимидазол-2-илтио)ацетата **2.7**

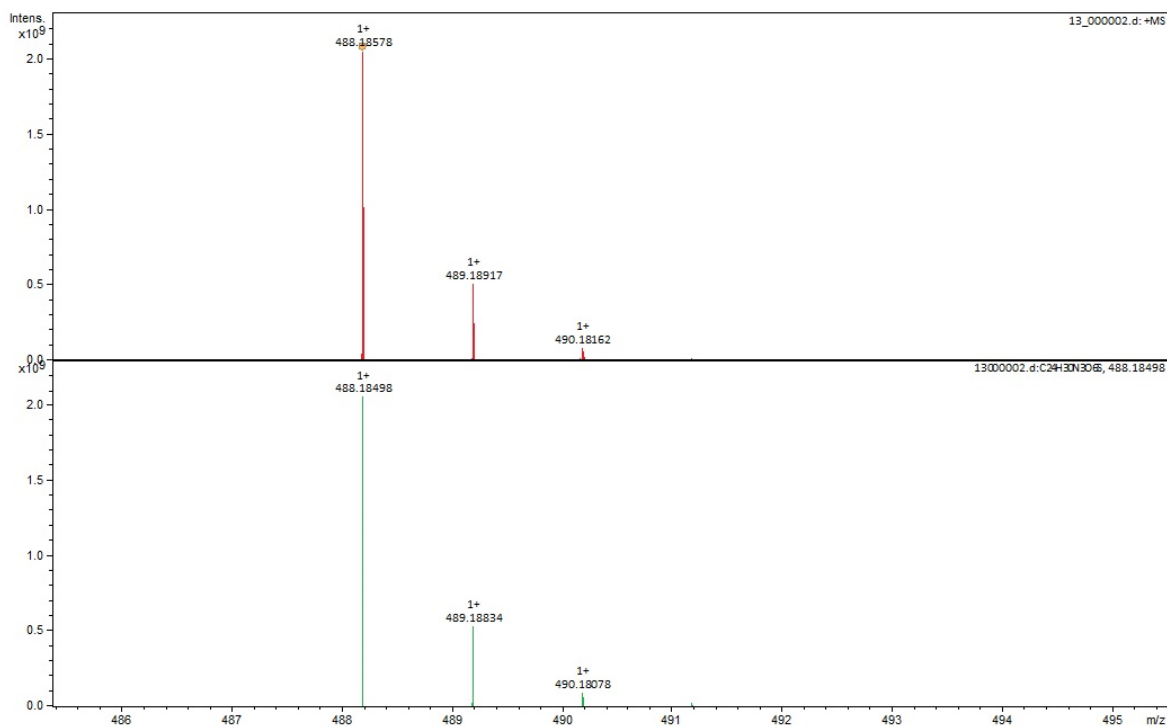


Рисунок 11 - Масс-спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1H-бензимидазол-2-илтио)ацетата **2.7**

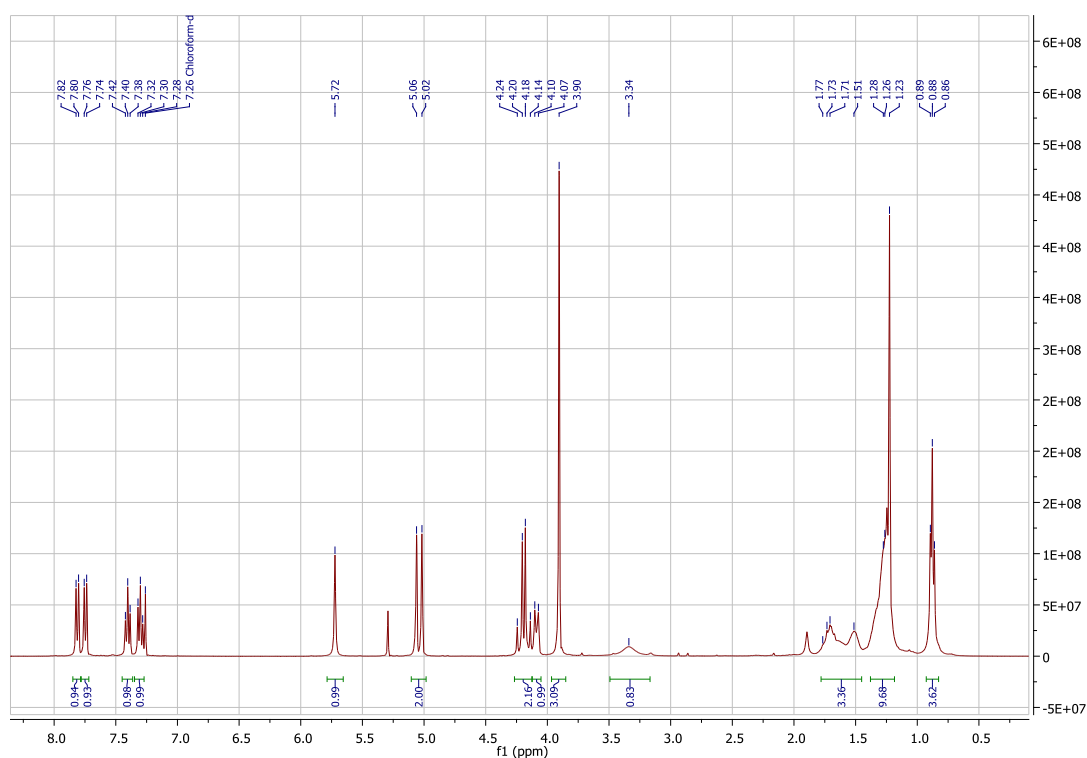


Рисунок 12 - Спектр ЯМР ^1H (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензотиазол-2-илтио)ацетата **2.8**

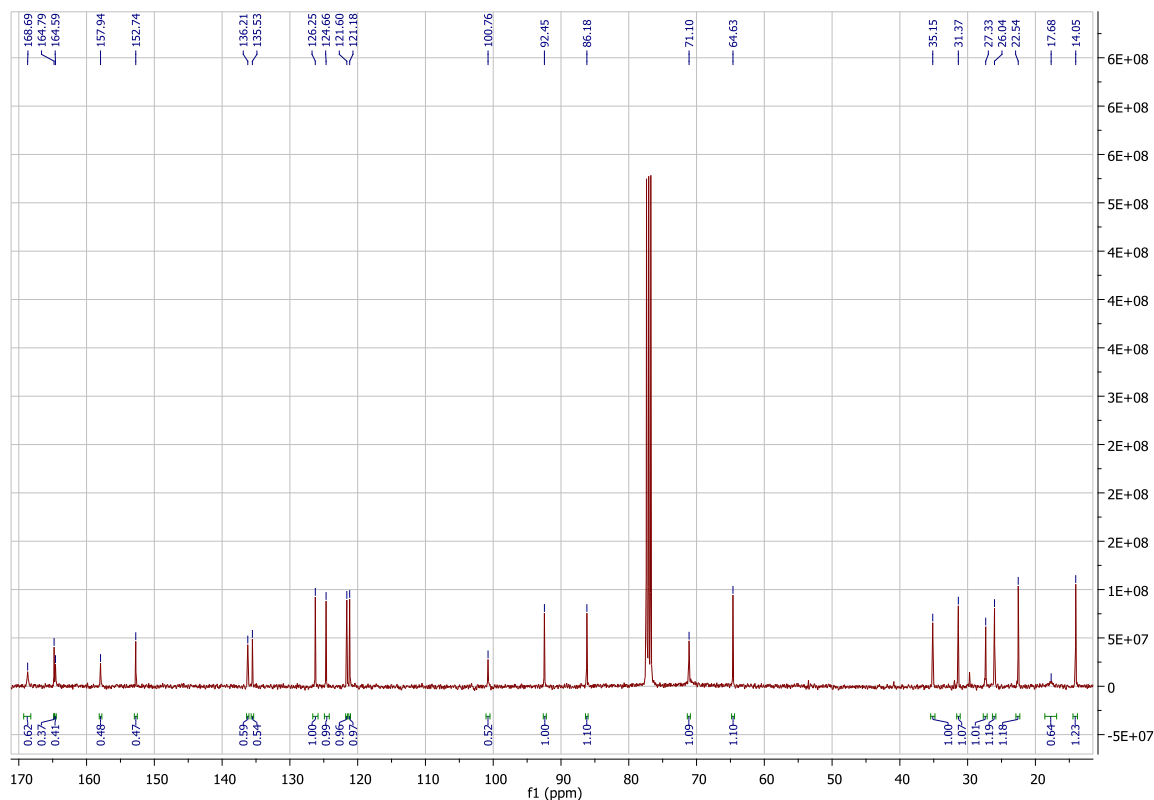


Рисунок 13 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензотиазол-2-илтио)ацетата **2.8**

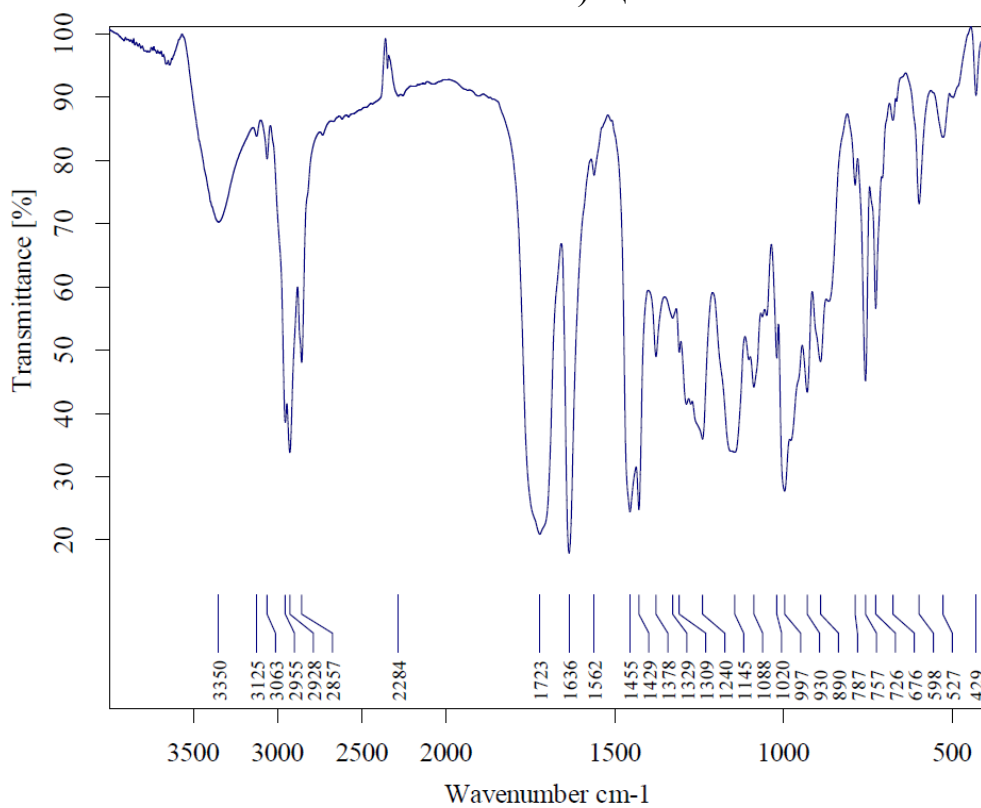


Рисунок 14 - ИК спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензотиазол-2-илтио)ацетата **2.8**

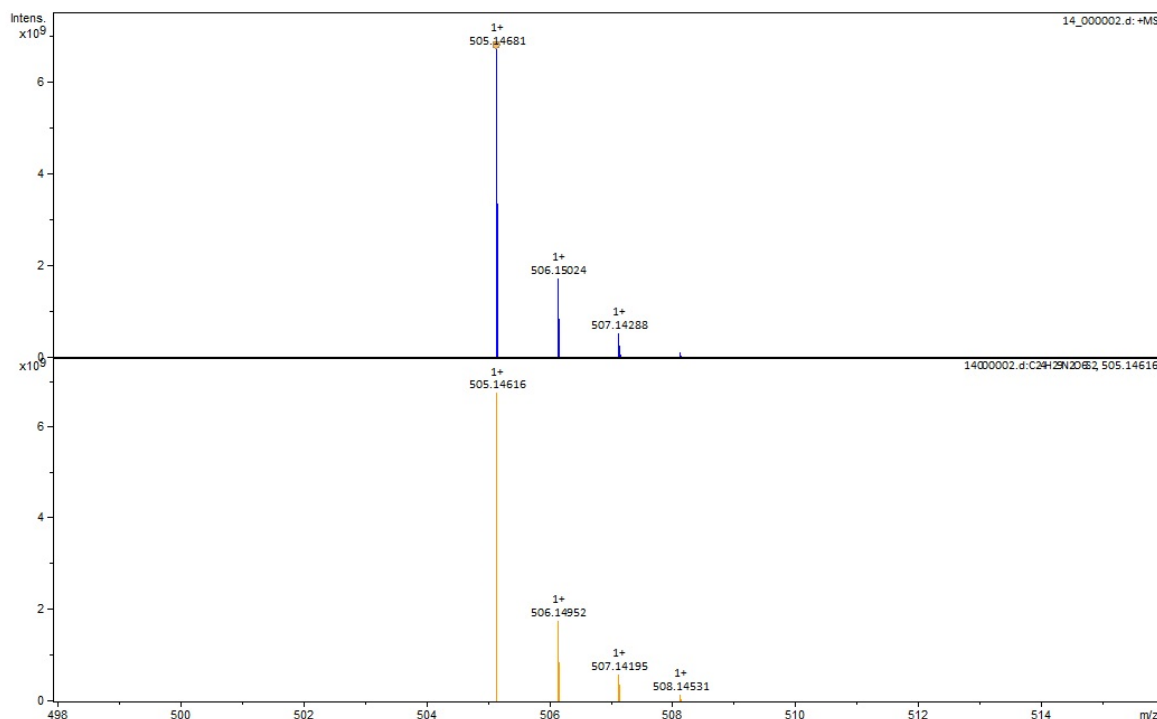


Рисунок 15 - Масс-спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензотиазол-2-илтио)ацетата **2.8**

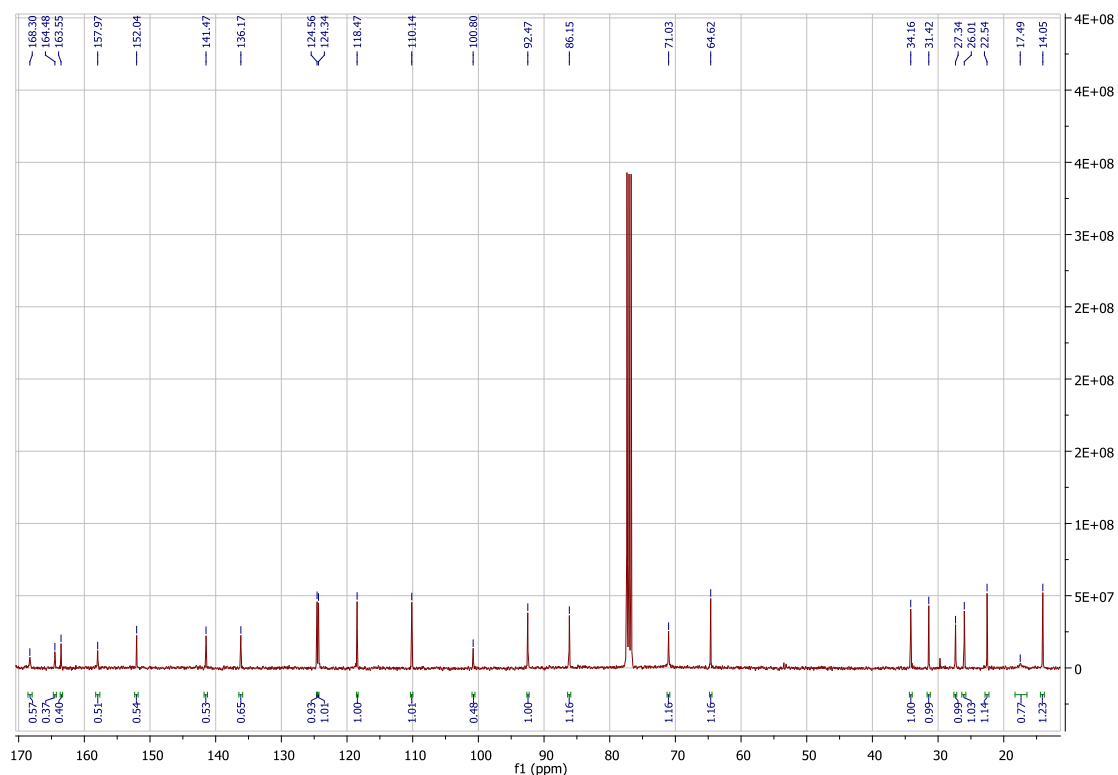


Рисунок 16 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензоксазол-2-илтио)ацетата **2.9**

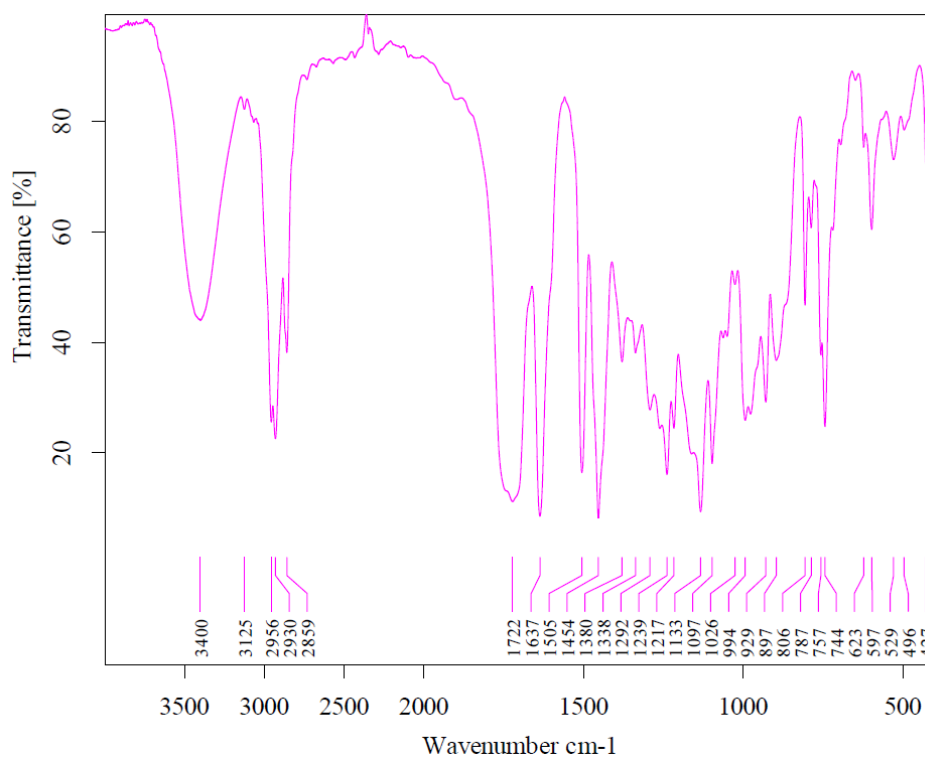


Рисунок 17 - ИК спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензоксазол-2-илтио)ацетата **2.9**

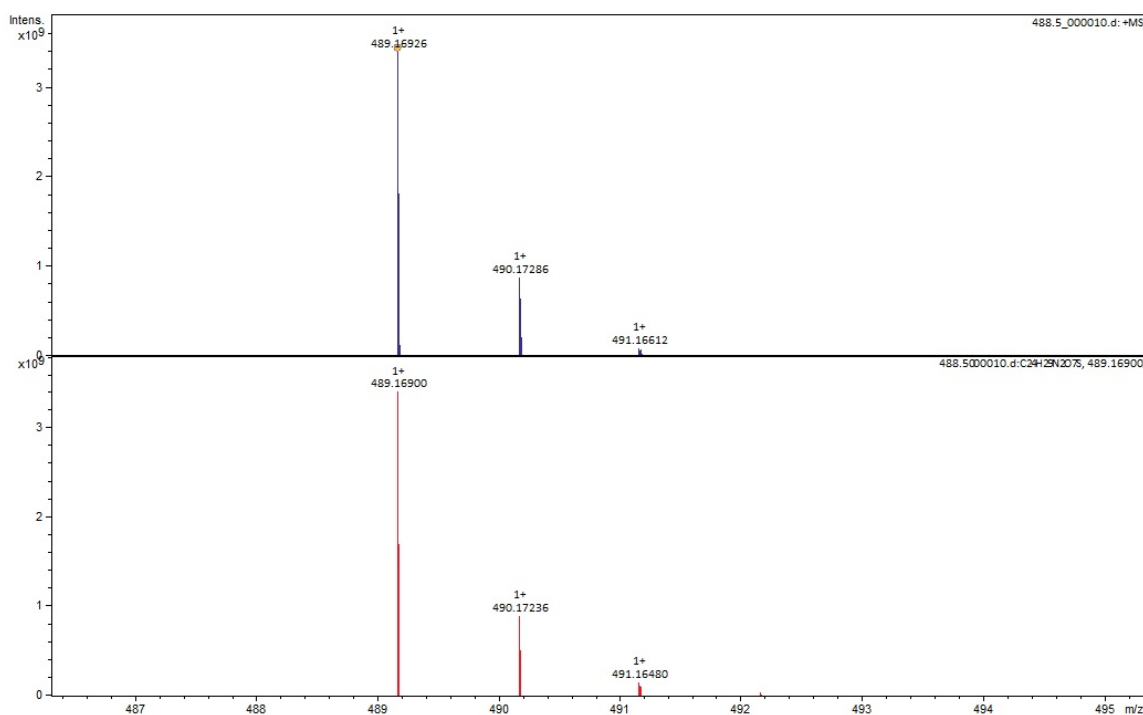


Рисунок 18 - Масс-спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексогидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил-(1,3-бензоксазол-2-илтио)ацетата **2.9**

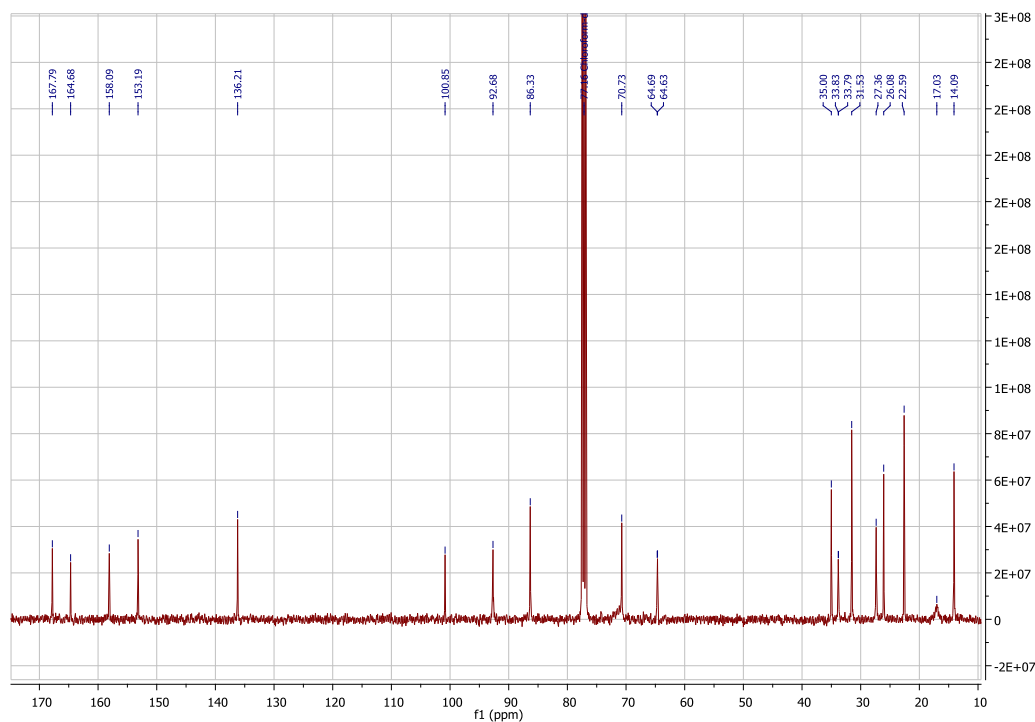


Рисунок 19 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1Н-тетразол-5-ил) тию]ацетата **2.10**

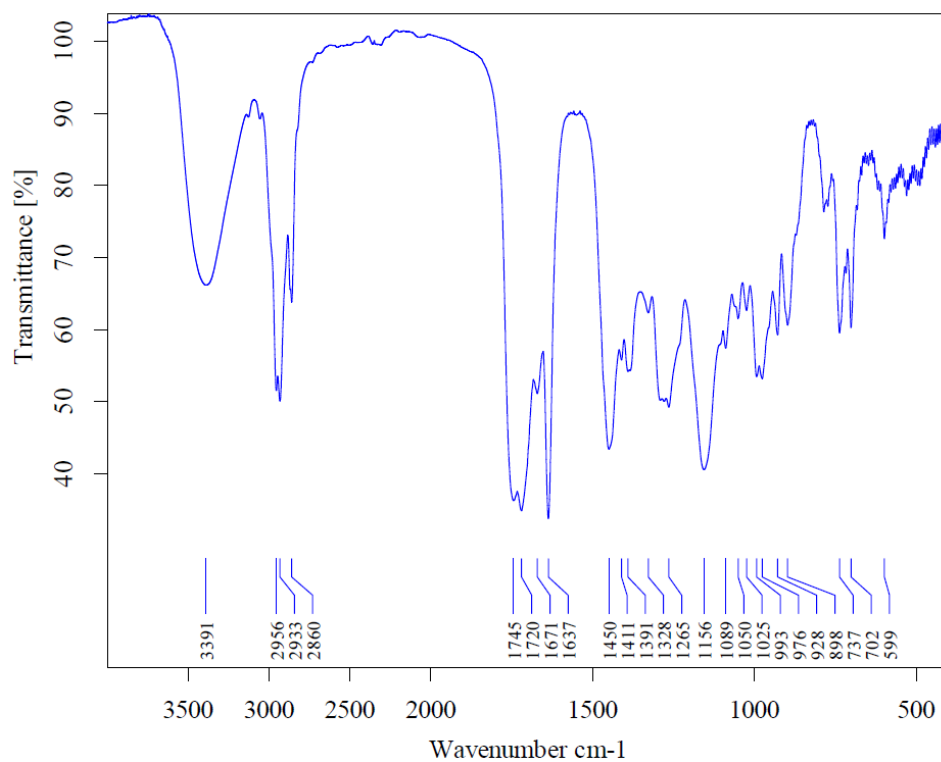


Рисунок 20 - ИК спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)тио]ацетата **2.10**

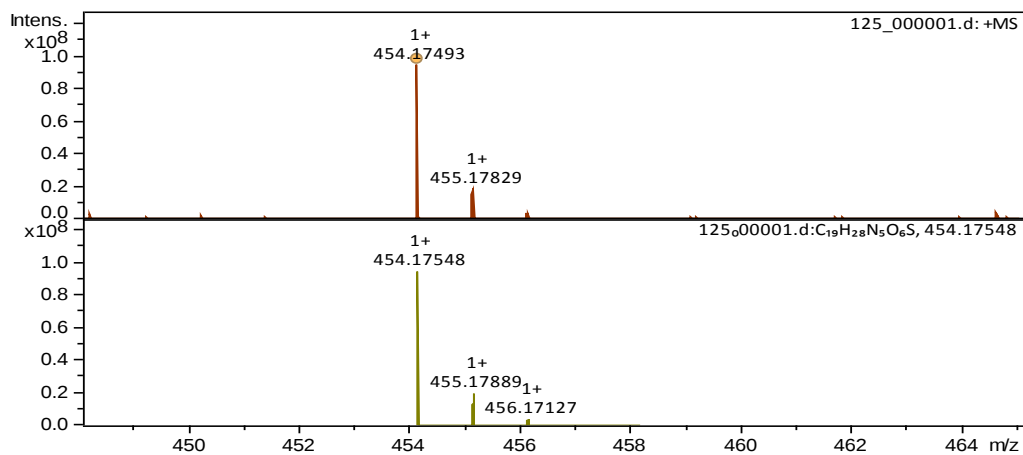


Рисунок 21 - Масс-спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метил-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1H-тетразол-5-ил)тио]ацетата **2.10**

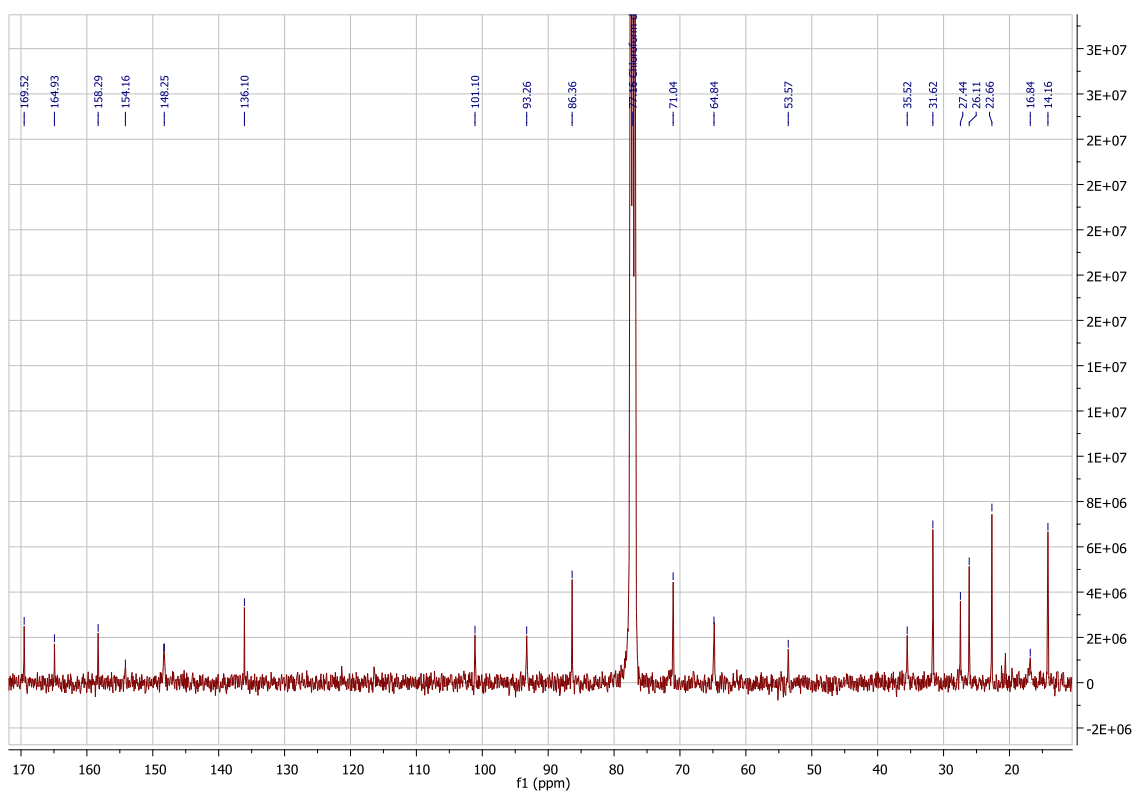


Рисунок 22 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метил-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(4H-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата **2.12**

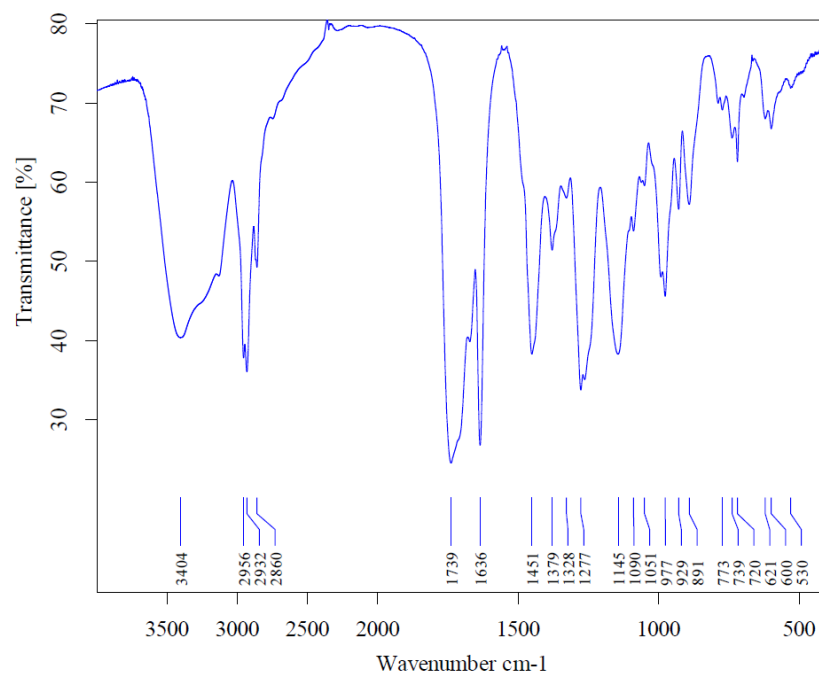


Рисунок 23 - ИК спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(4Н-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата **2.12**

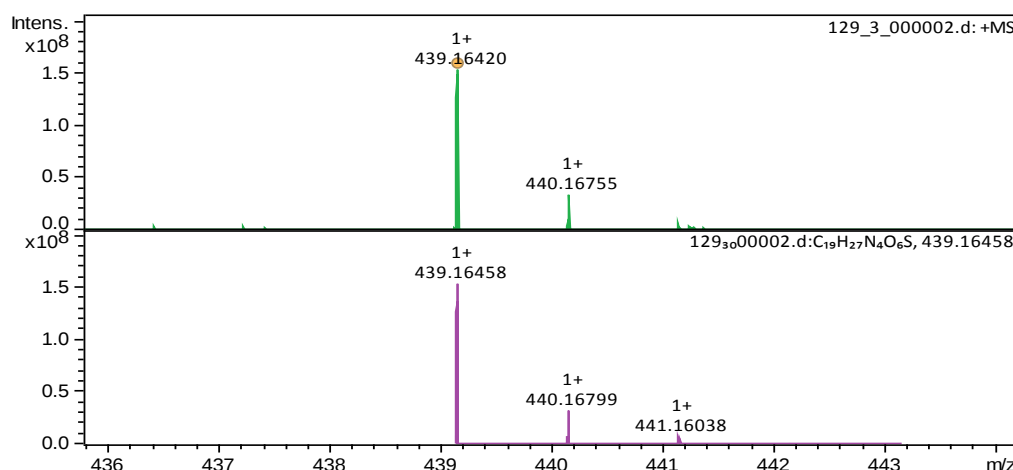


Рисунок 24 - Масс-спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(4Н-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата **2.12**

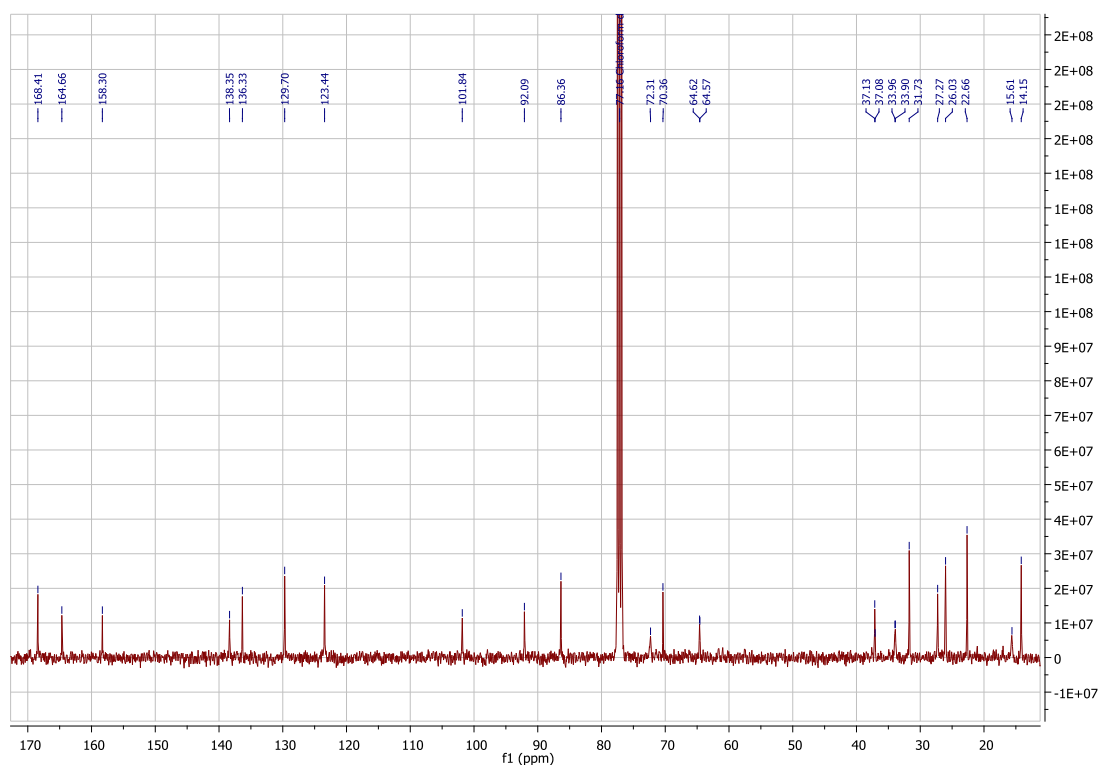


Рисунок 25 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метил-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1H-имидазол-2-ил)тио]ацетата **2.13**

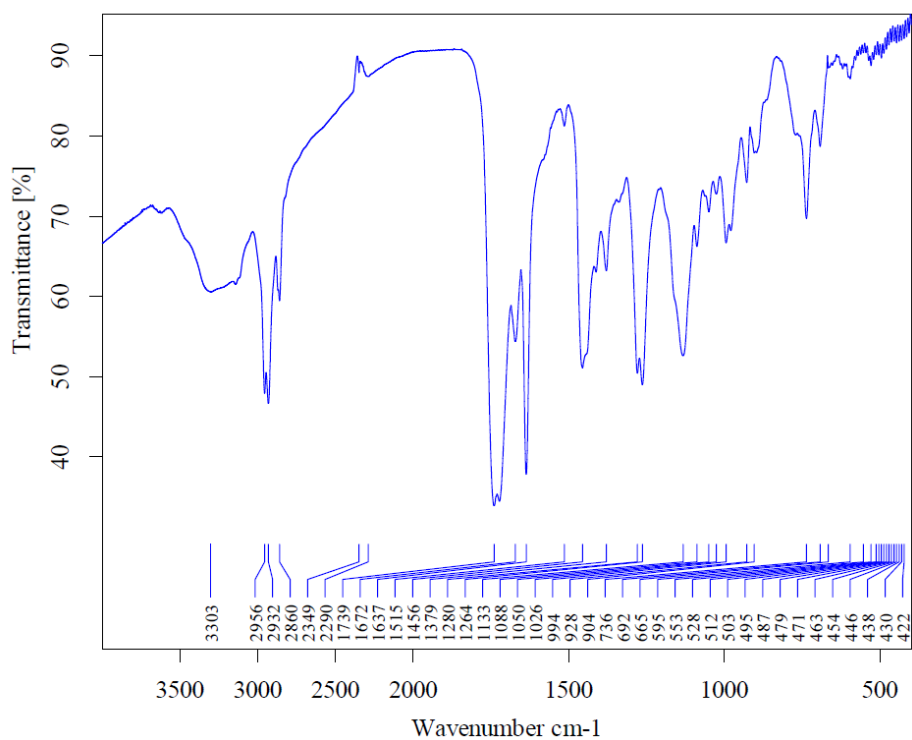


Рисунок 26 - ИК спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метил-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1H-имидазол-2-ил) тио]ацетата **2.13**

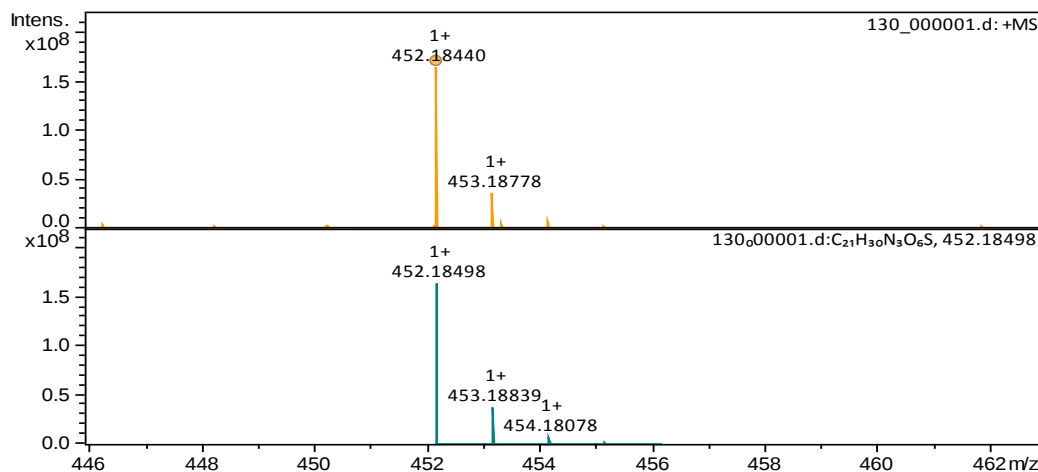


Рисунок 27 - Масс-спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил[(1-метил-1H-имидазол-2-ил)тио]ацетата **2.13**

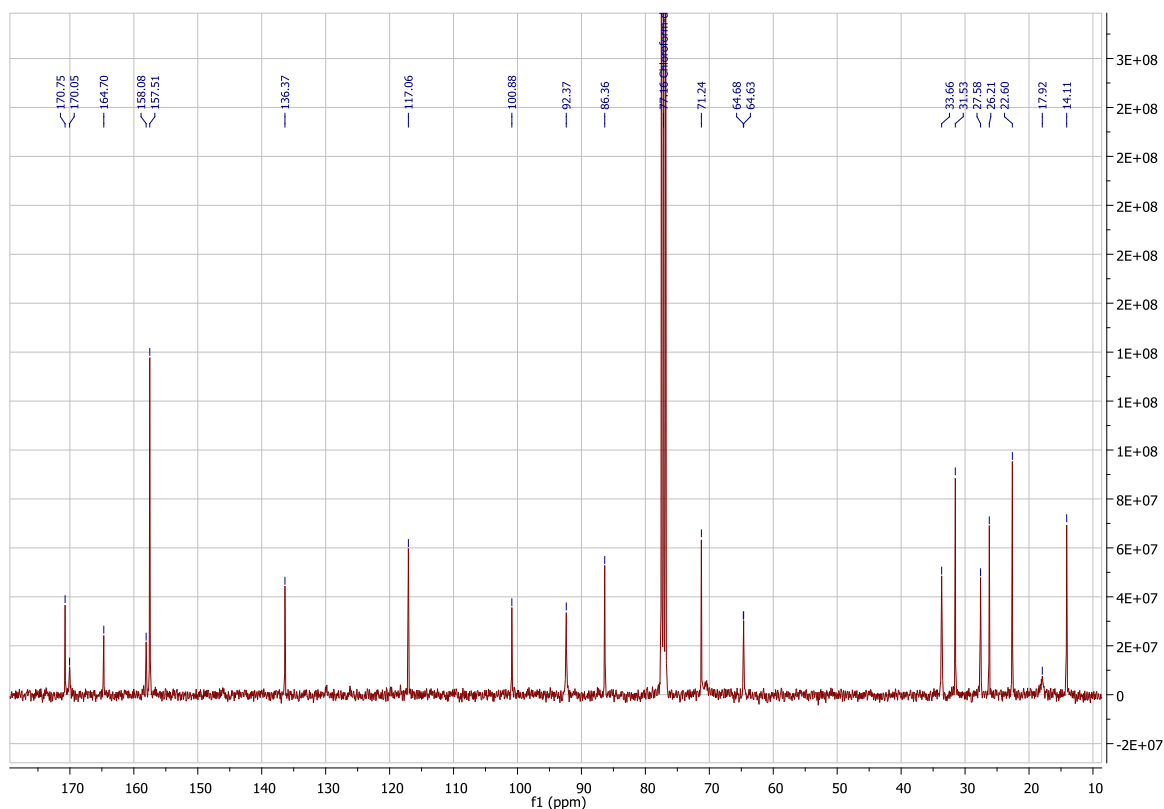


Рисунок 28 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил (пиримидин-2-илтио)ацетата **2.14**

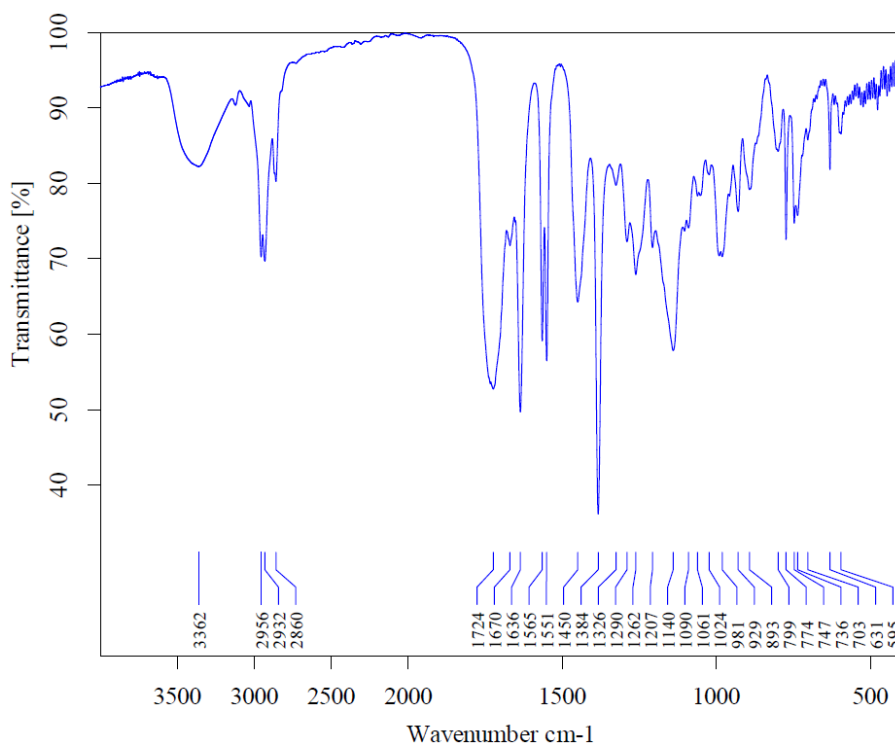


Рисунок 29 - ИК спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(пиримидин-2-илтио)ацетата **2.14**

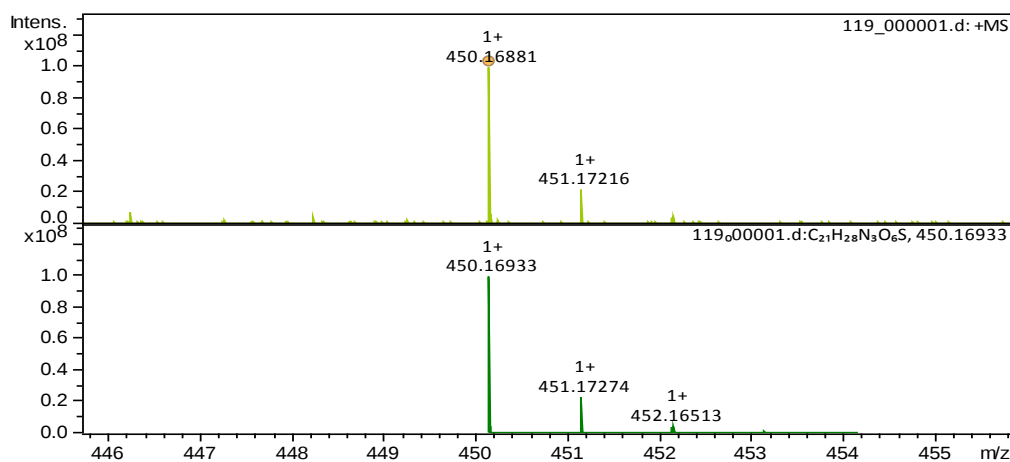


Рисунок 30 - Масс-спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(пиримидин-2-илтио)ацетата **2.14**

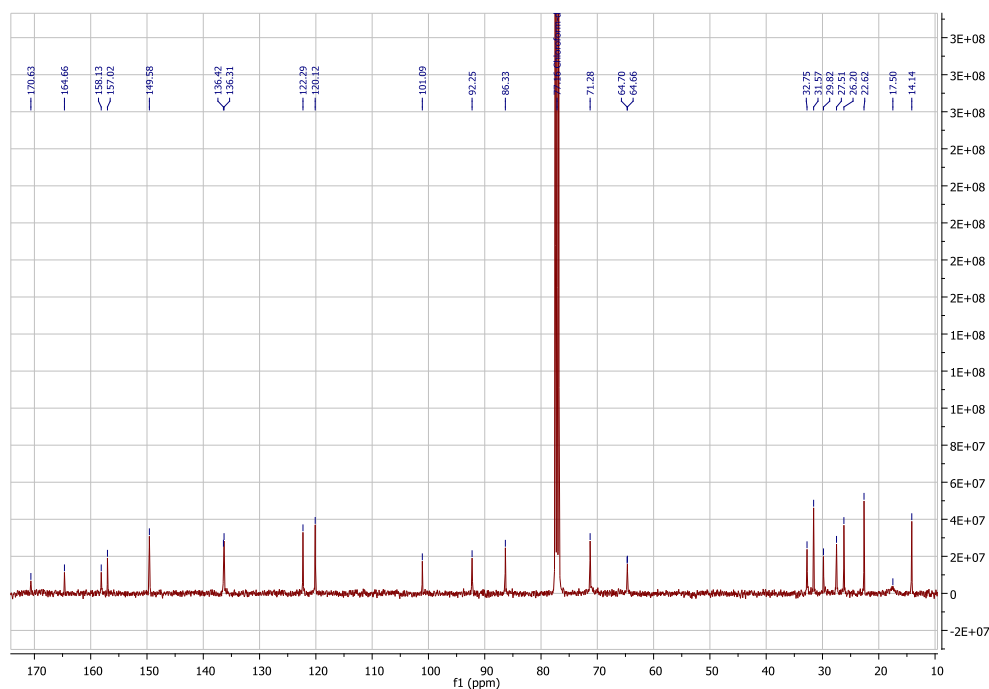


Рисунок 31 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метил-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(пиридин-2-илтио)ацетата **2.15**

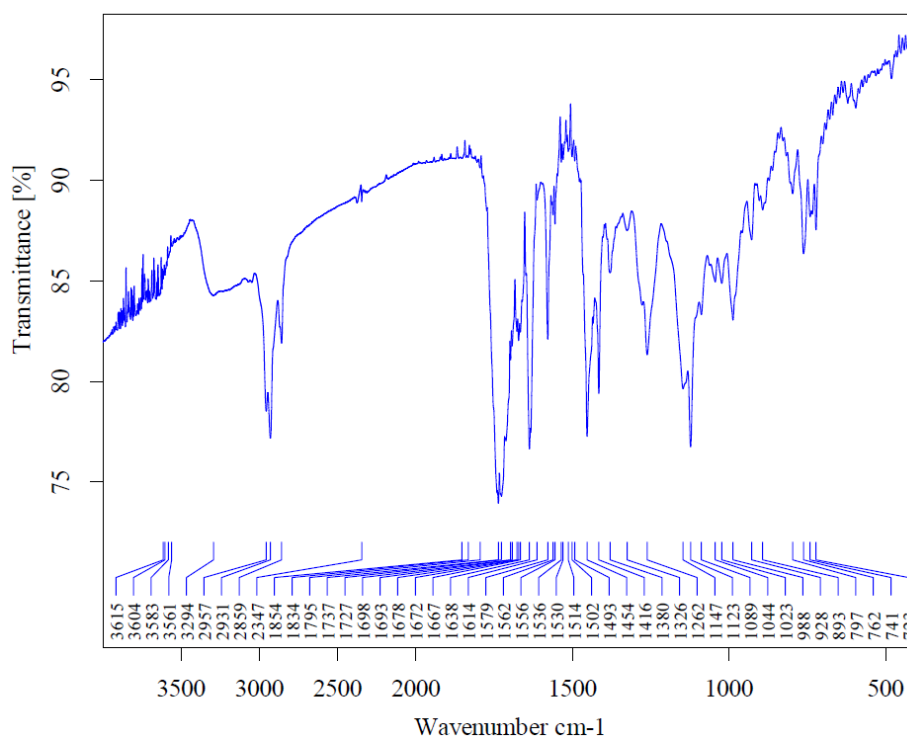


Рисунок 32 - ИК спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метил-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил(пиридин-2-илтио)ацетата **2.15**

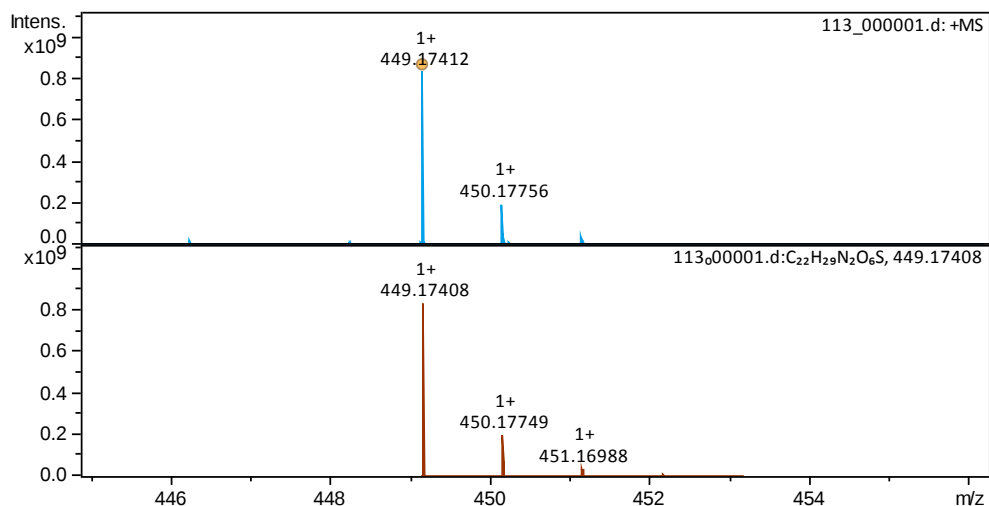


Рисунок 33 - Масс-спектр (2S,3R,4S)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-5-оксо-2-пентил-2,3,4,5,6,7-гексагидропирано[2,3-с]пиррол-4-ил (пиридин-2-илтио)ацетата **2.15**

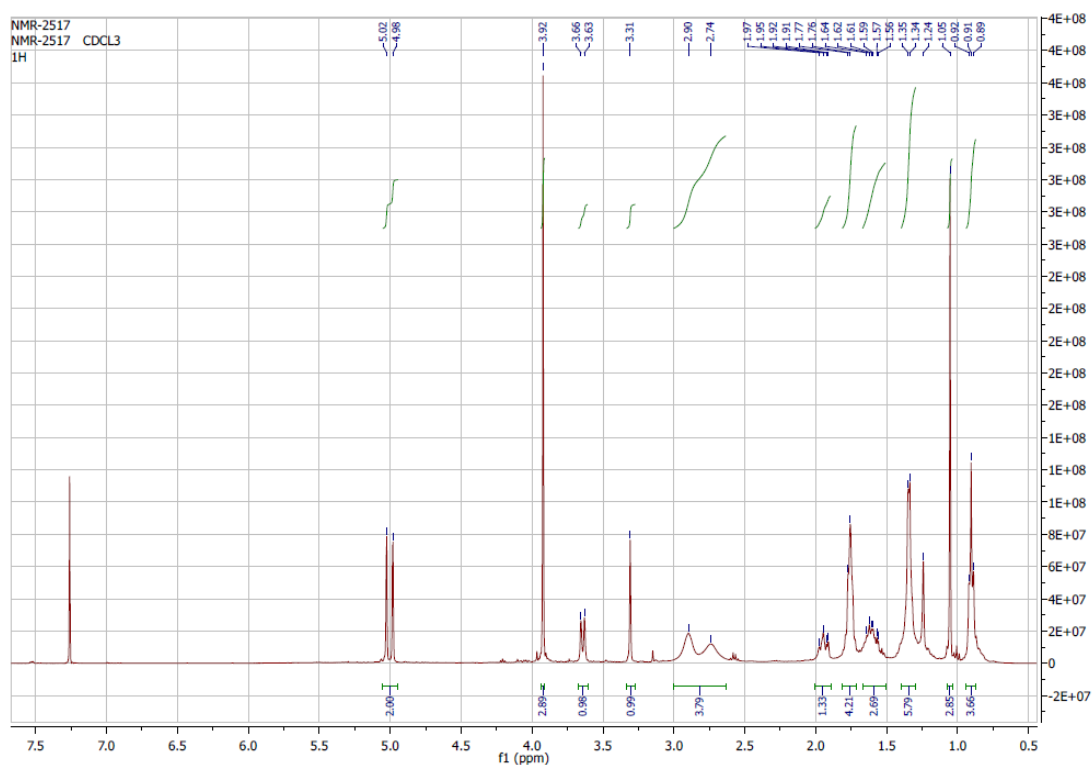


Рисунок 34 - Спектр ЯМР ^1H 3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-4-пирролидин-1-ил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2Н)-он **2.16**

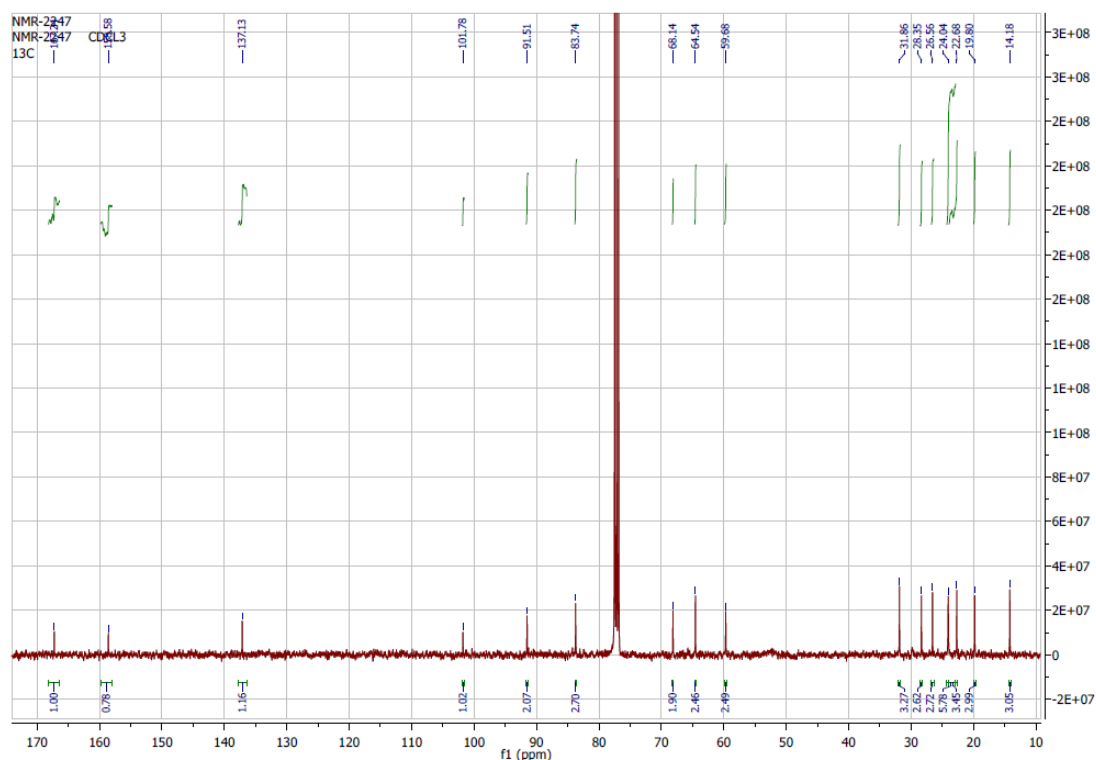


Рисунок 35 - Спектр ЯМР ^{13}C 3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-4-пирролидин-1-ил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.16**

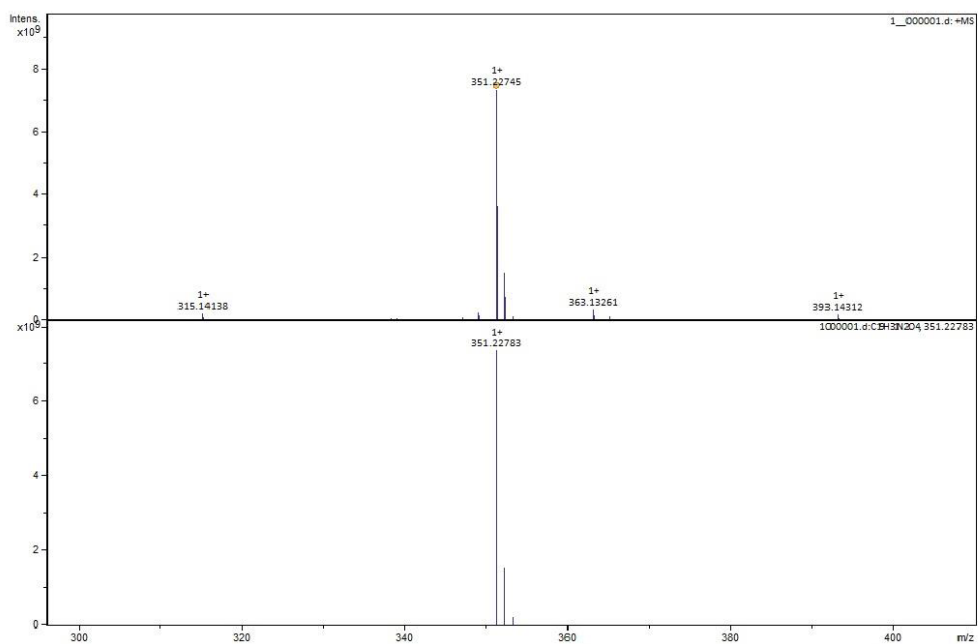


Рисунок 36 - Масс-спектр 3-Гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-4-пирролидин-1-ил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.16**

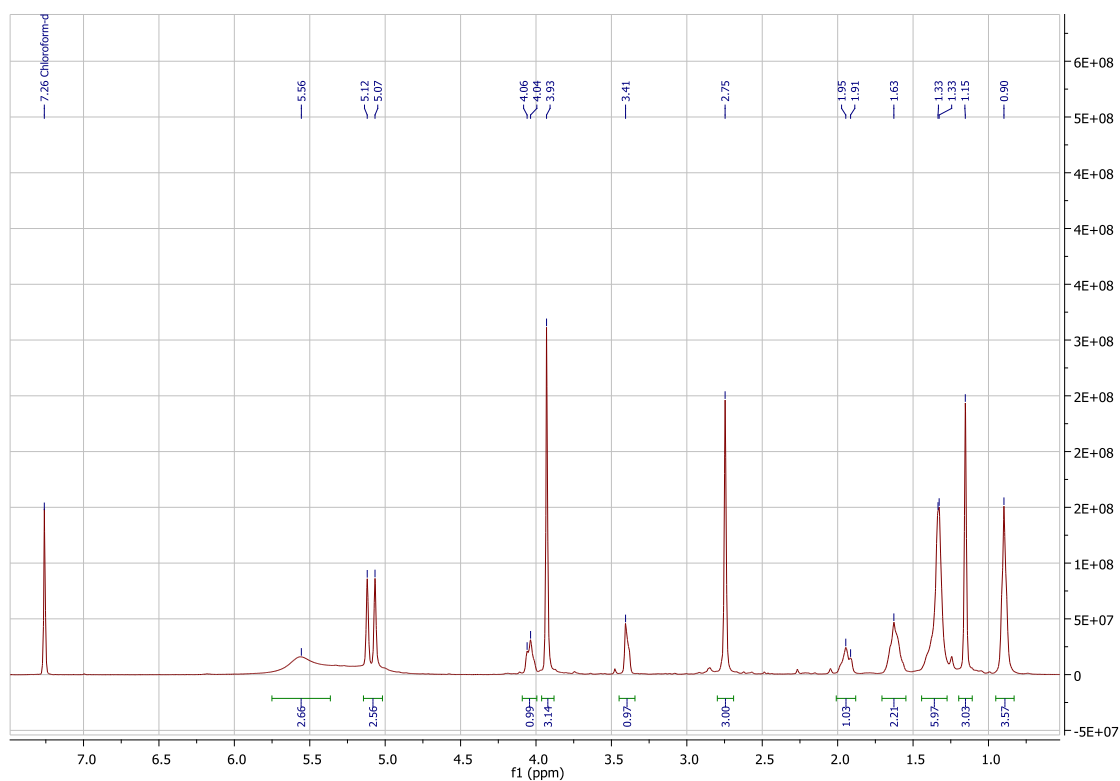


Рисунок 37 - Спектр ЯМР ¹H (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-4-метиламино-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-он **2.18**

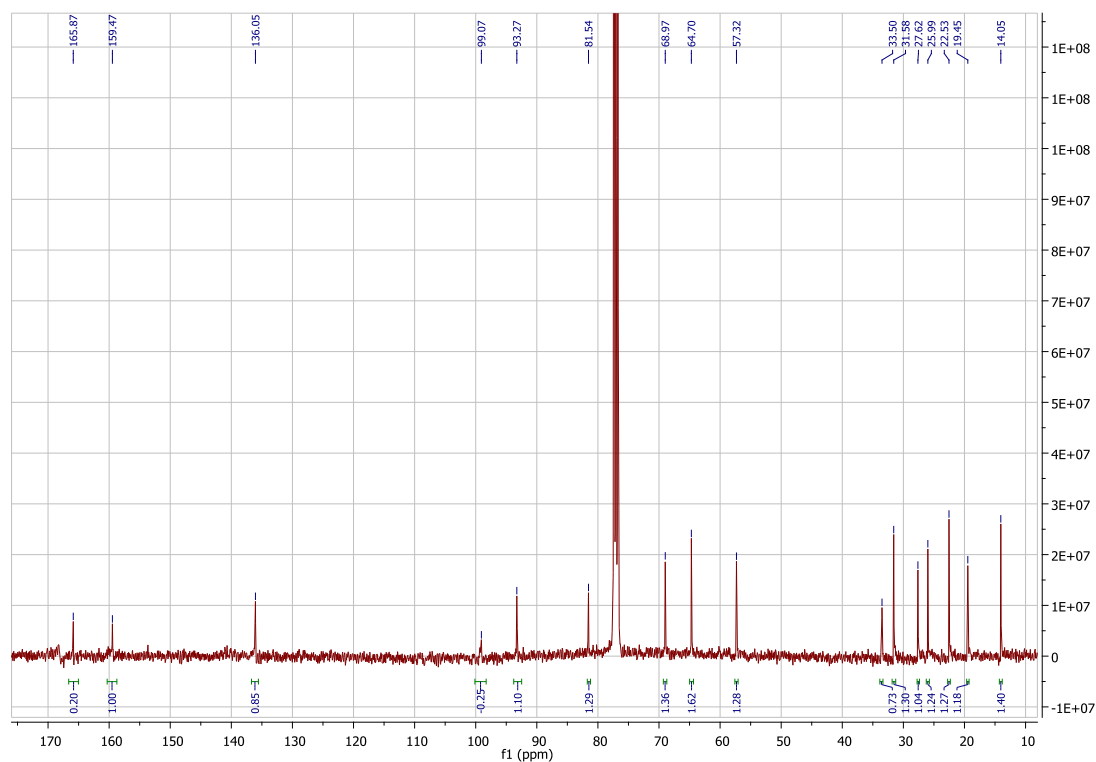


Рисунок 38 - Спектр ЯМР ¹³C (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-4-метиламино-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.18**

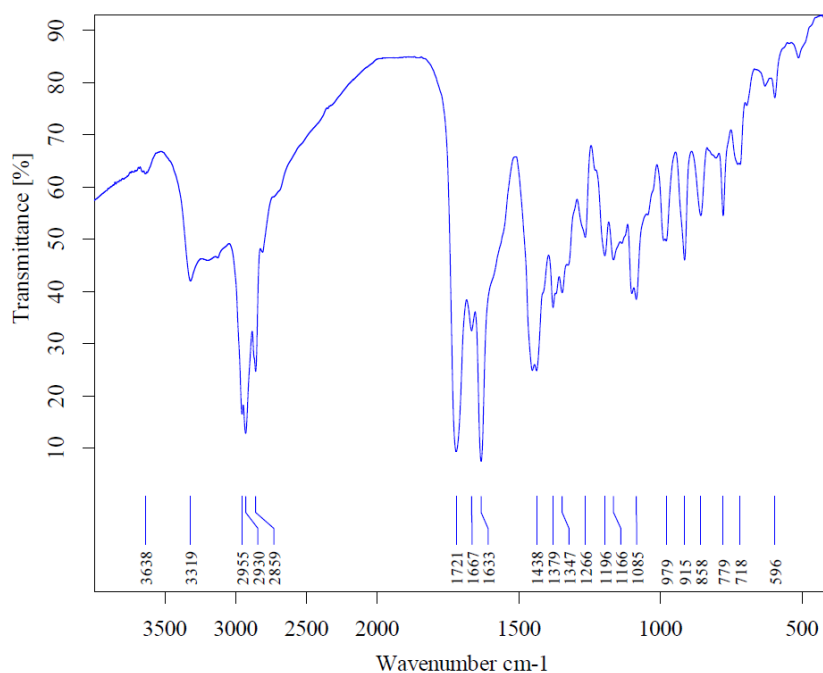


Рисунок 39 - ИК спектр (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-4-метиламино-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.18**

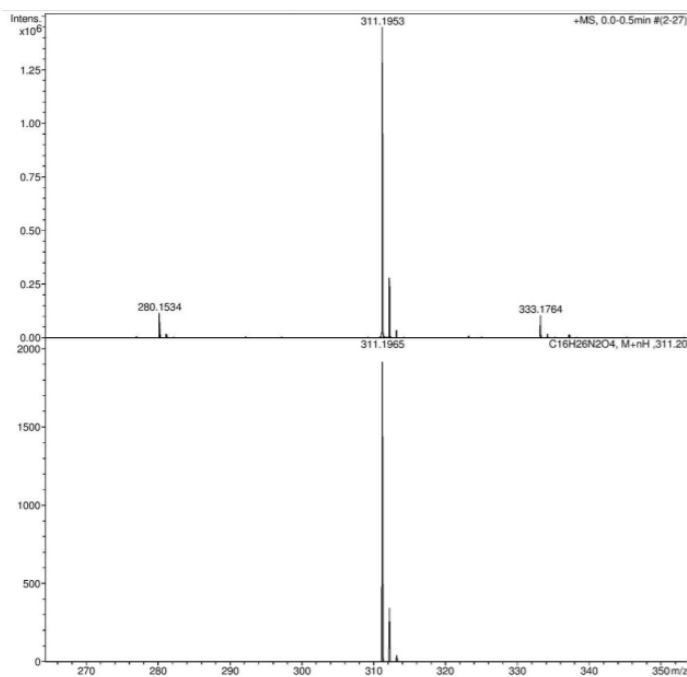


Рисунок 40 - Масс-спектр (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-4-метиламино-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.18**

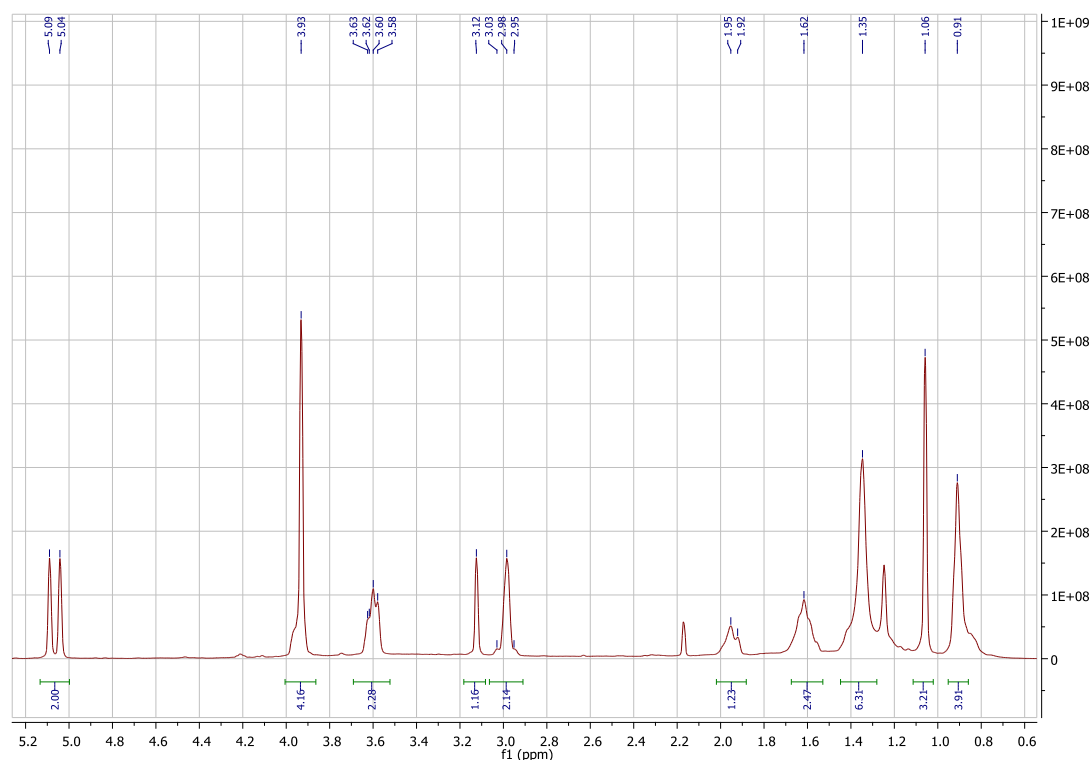


Рисунок 41 - Спектр ЯМР ¹H (2S,3R,4R)-3-гидрокси-4-[(2-гидроксиэтил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.19**

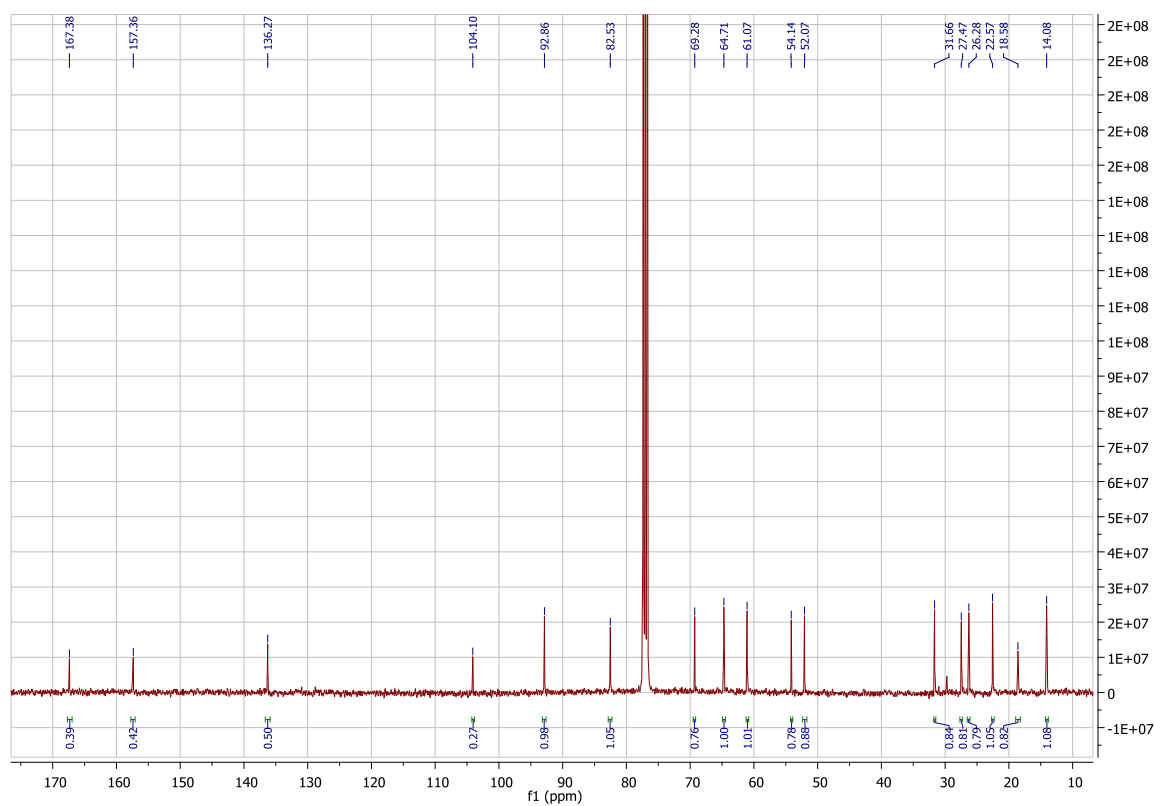


Рисунок 42 - Спектр ЯМР ¹³C (2S,3R,4R)-3-гидрокси-4-[(2-гидроксиэтил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.19**

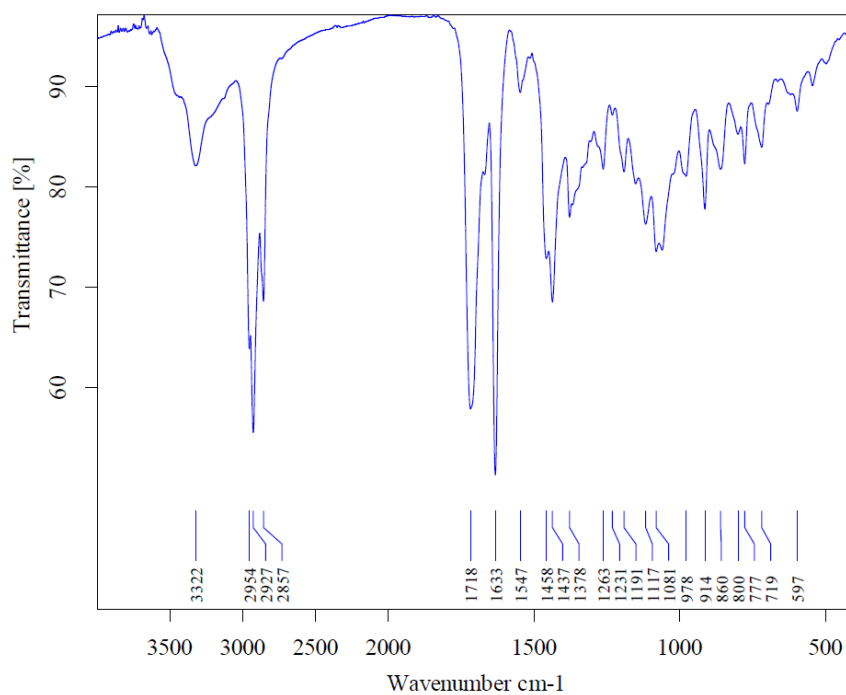


Рисунок 43 - ИК спектр (2S,3R,4R)-3-гидрокси-4-[(2-гидроксиэтил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.19**

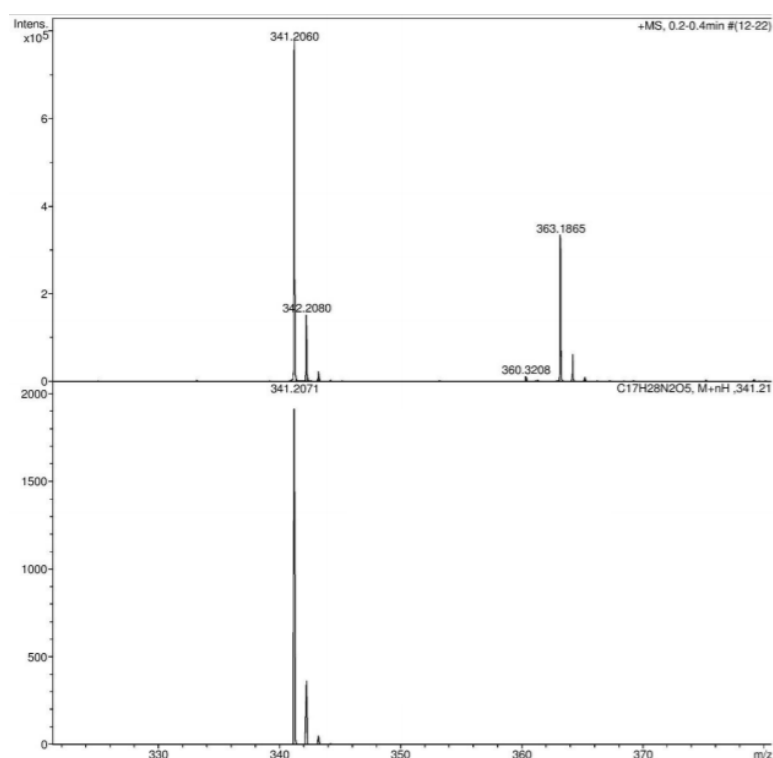


Рисунок 44 - Масс-спектр (2S,3R,4R)-3-гидрокси-4-[(2-гидроксиэтил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.19**

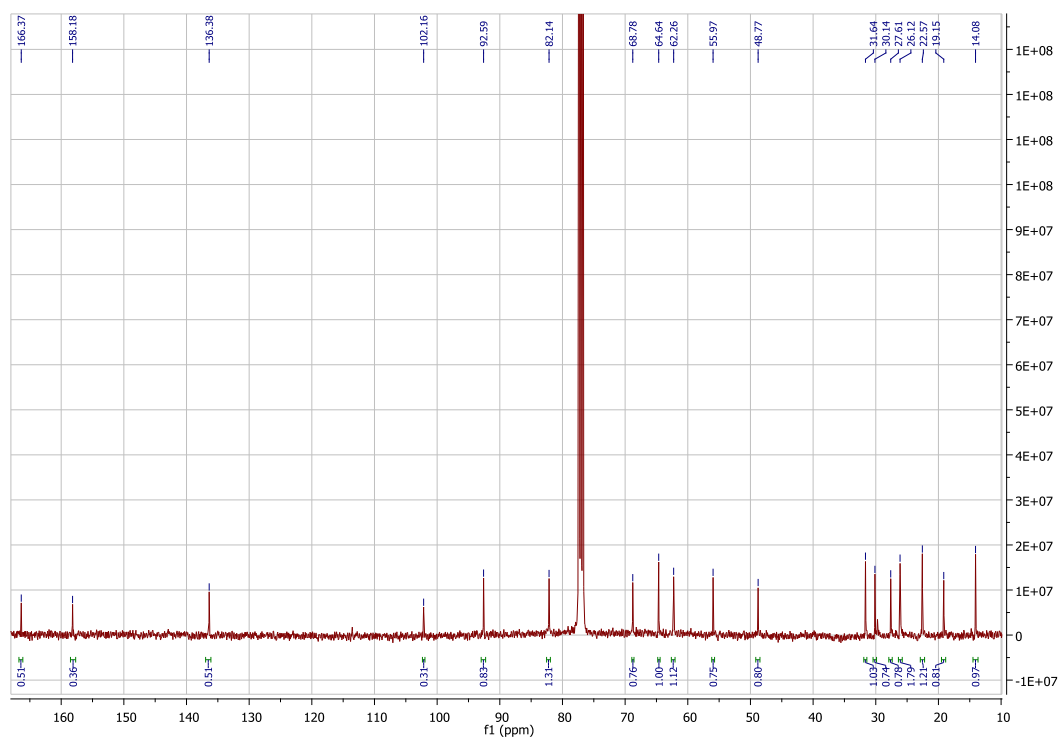


Рисунок 45 - Спектр ЯМР ^{13}C 3-гидрокси-4-[(4-гидроксибутил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.20**

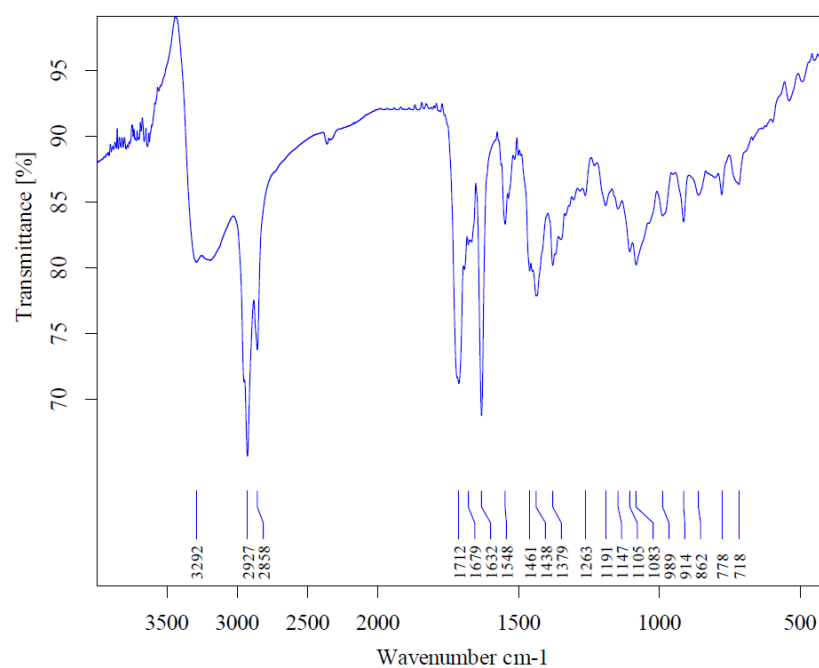


Рисунок 46 - ИК спектр 3-гидрокси-4-[(4-гидроксибутил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.20**

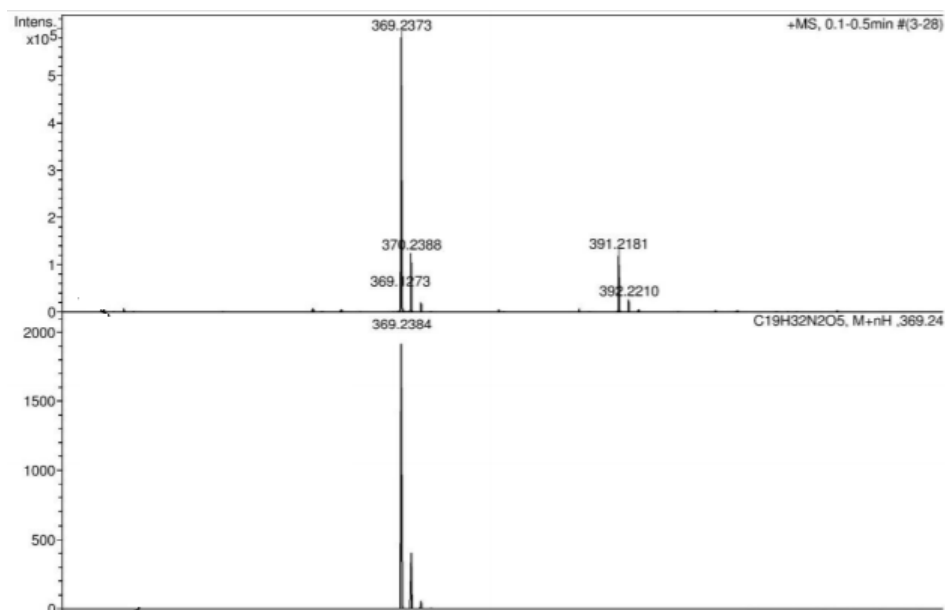


Рисунок 47 - Масс-спектр 3-гидрокси-4-[(4-гидроксибутил)амино]-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она 2.20

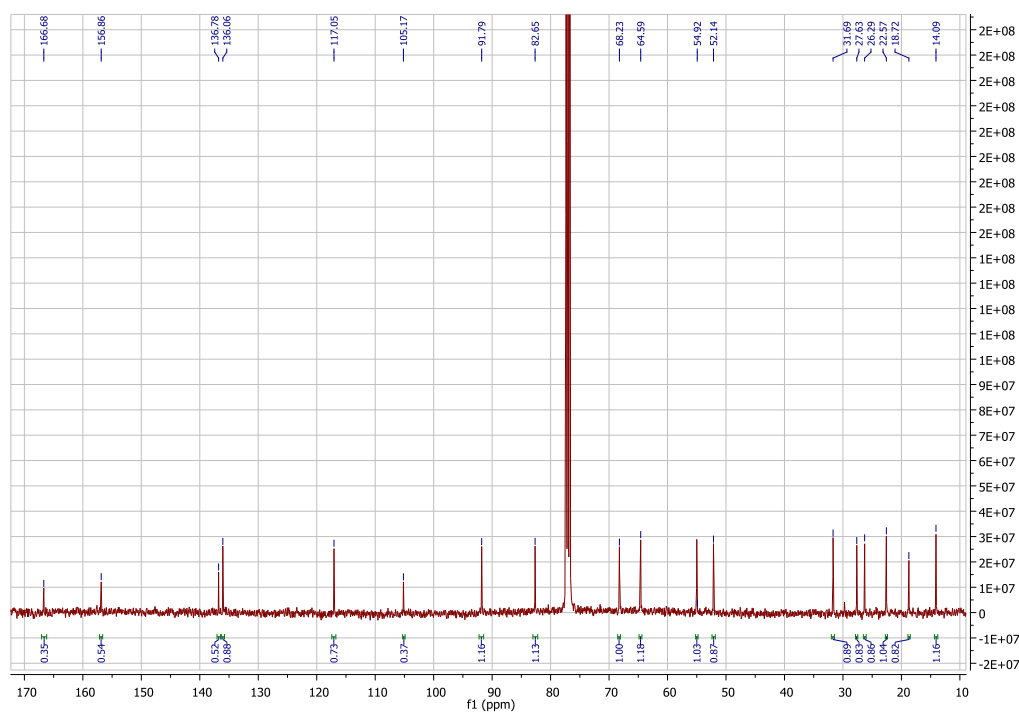


Рисунок 48 - Спектр ЯМР ¹³C 4-диэтиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она 2.21

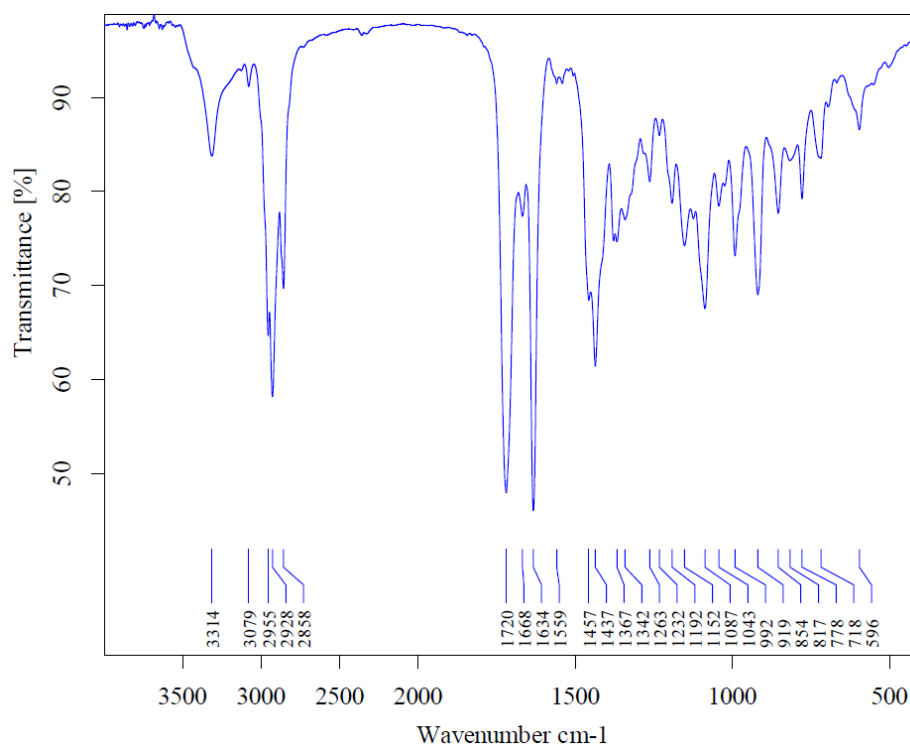


Рисунок 49 - ИК спектр 4-диэтиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.21**

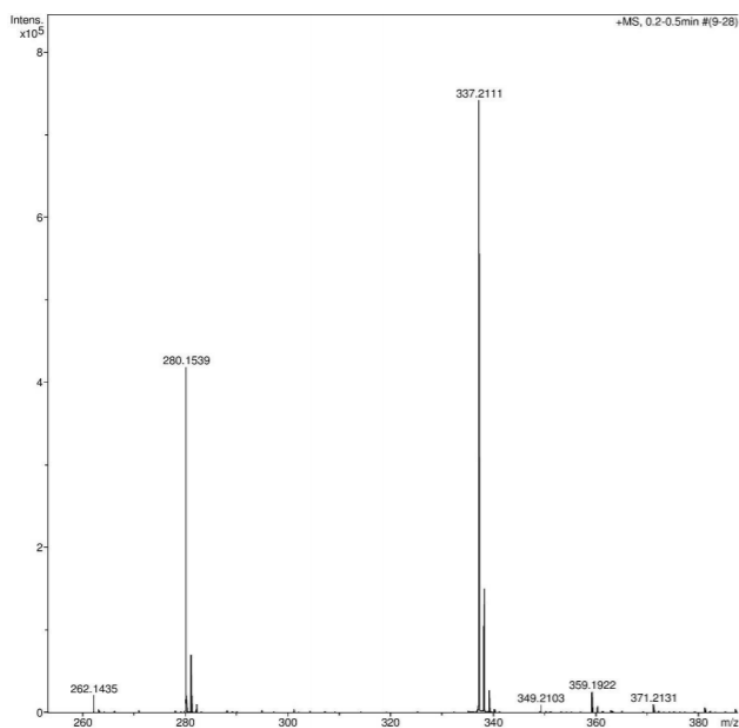


Рисунок 50 - Масс-спектр 4-диэтиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.21**

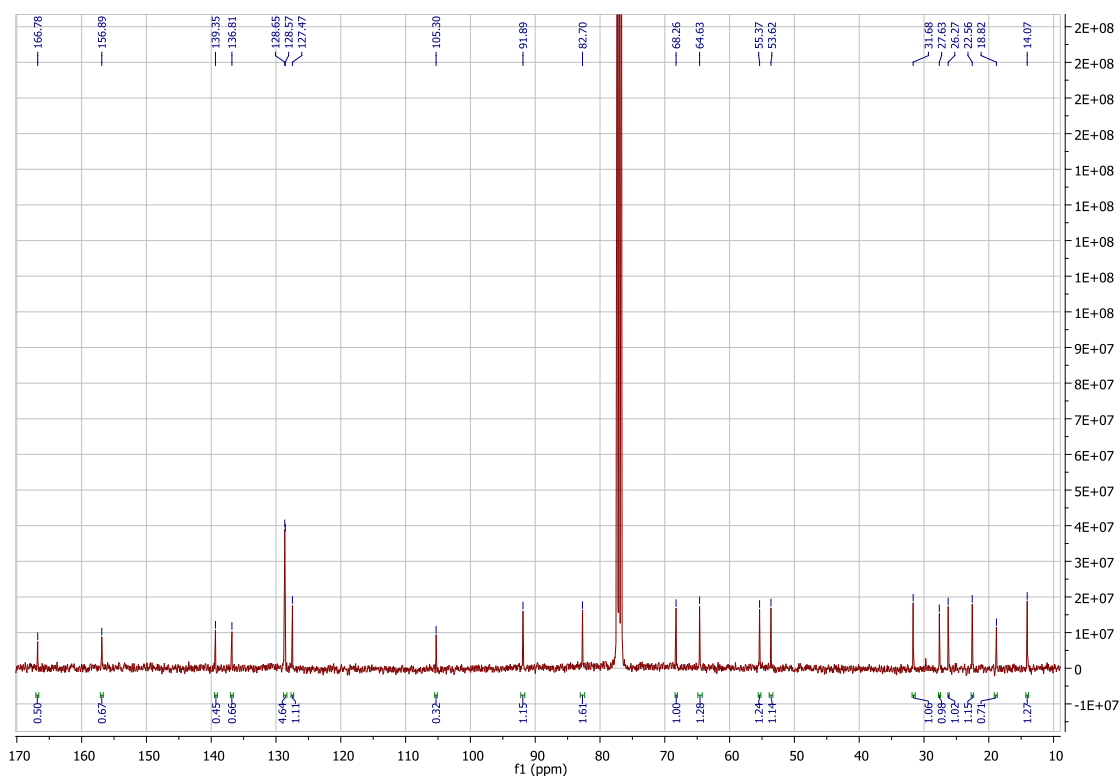


Рисунок 51 - Спектр ЯМР ^{13}C 4-бензиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.22**

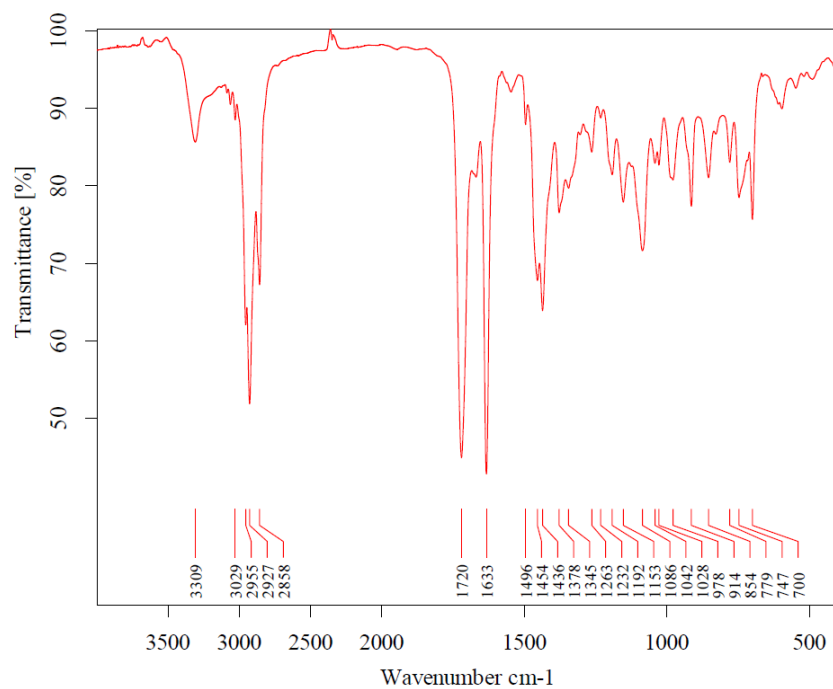


Рисунок 52 - ИК спектр 4-бензиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.22**

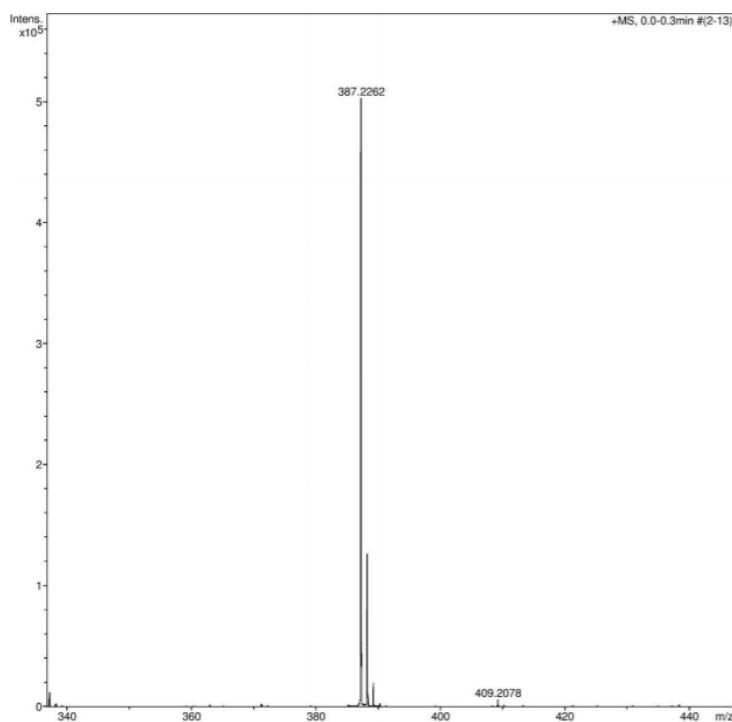


Рисунок 53 - Масс-спектр 4-бензиламино-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.22**

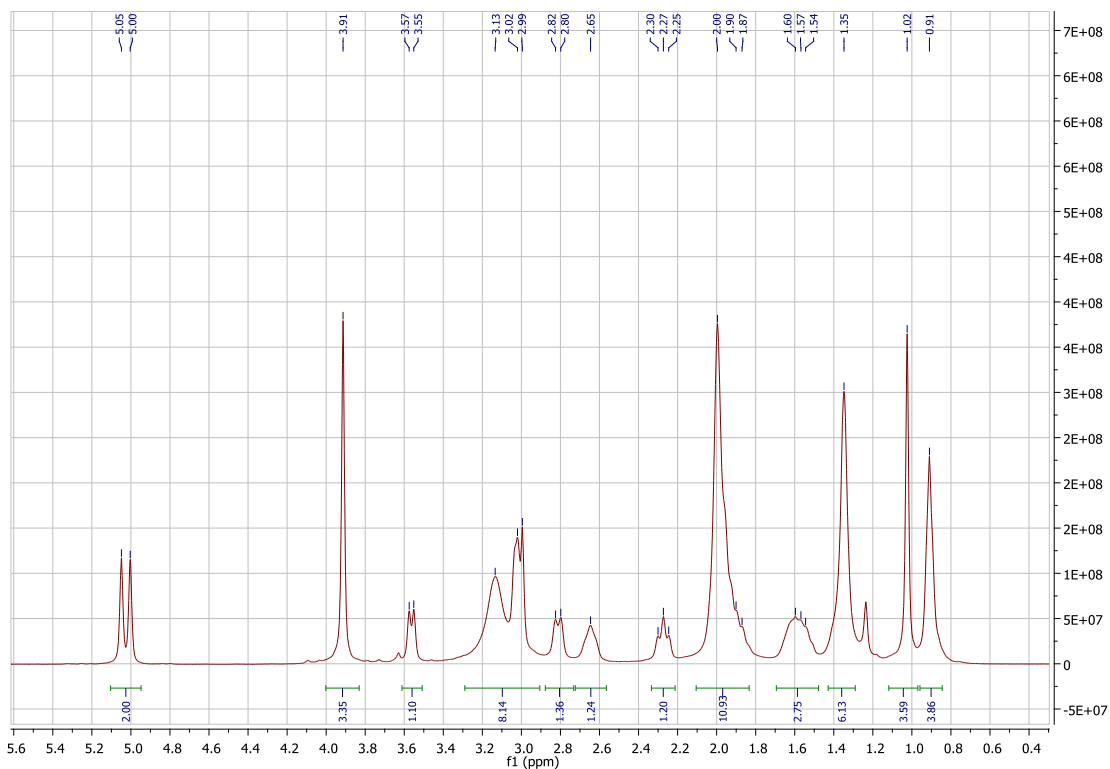


Рисунок 54 - Спектр ЯМР ¹H (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-4-(4-пирролидин-1-илпиперидин-1-ил)-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.23**

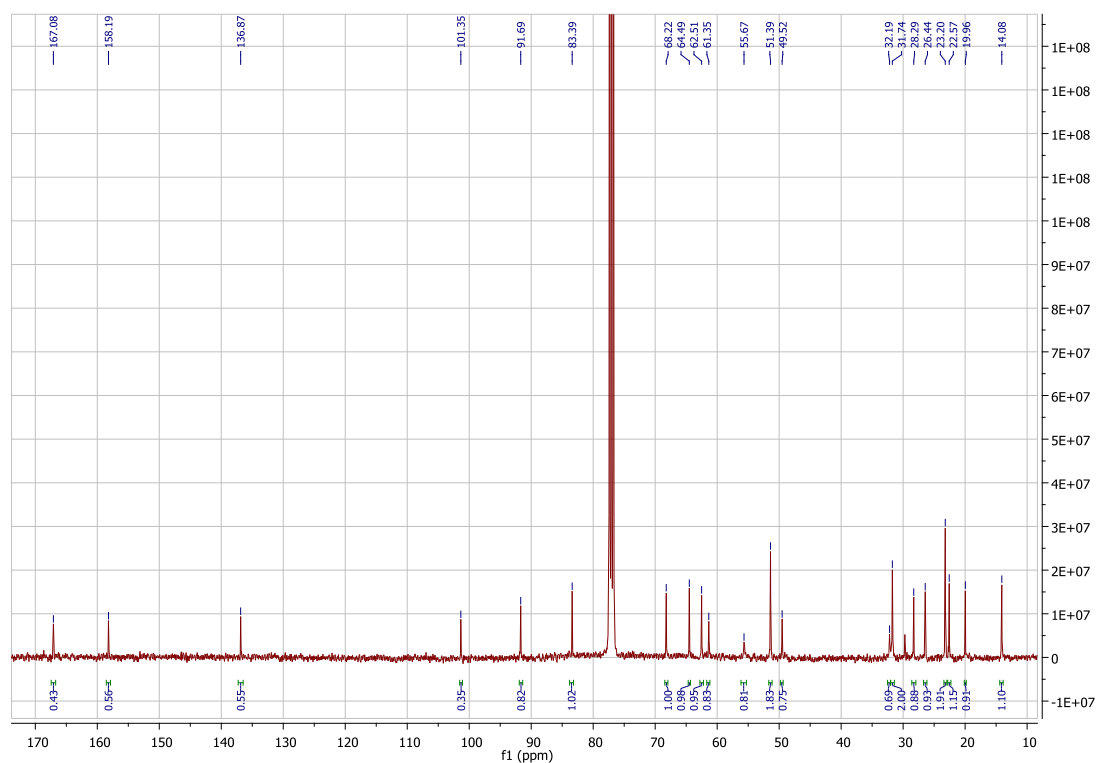


Рисунок 55 - Спектр ЯМР ^{13}C (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-4-(4-пирролидин-1-илпиперидин-1-ил)-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.23**

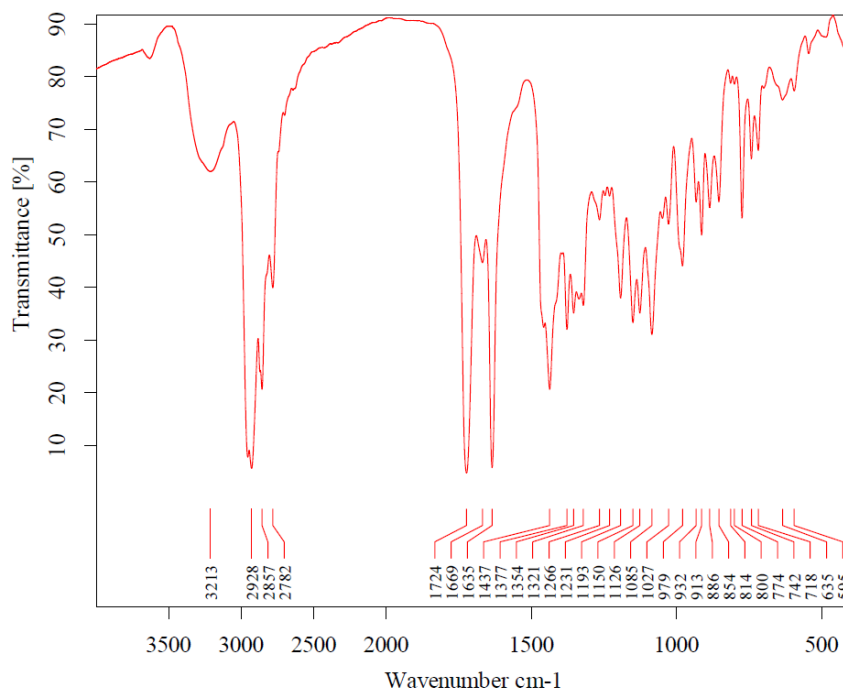


Рисунок 56 - ИК спектр (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилден-2-пентил-4-(4-пирролидин-1-илпиперидин-1-ил)-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.23**

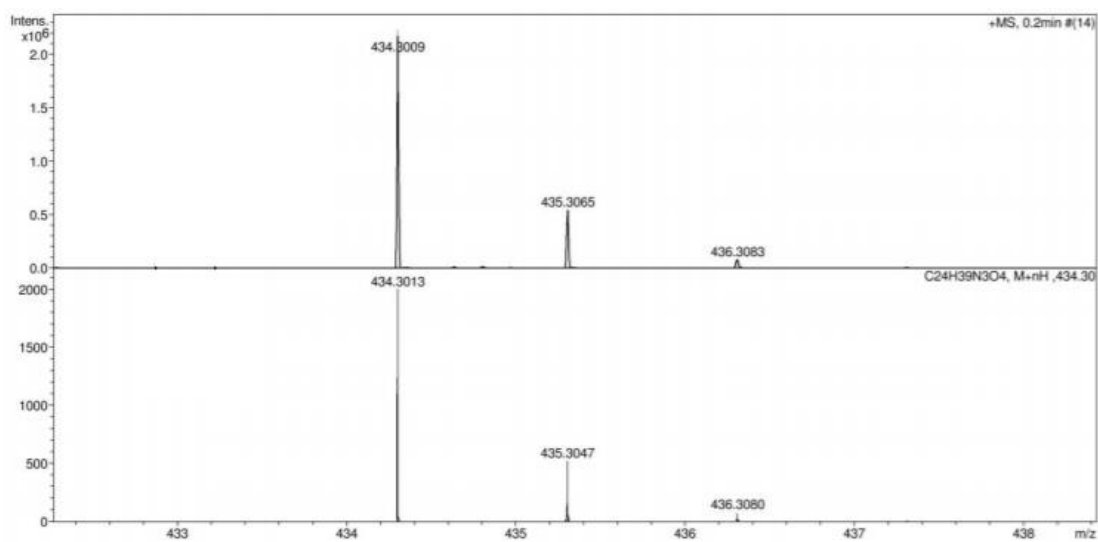


Рисунок 57 - Масс-спектр (2S,3R,4R)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-4-(4-пирролидин-1-илпиперидин-1-ил)-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.23**

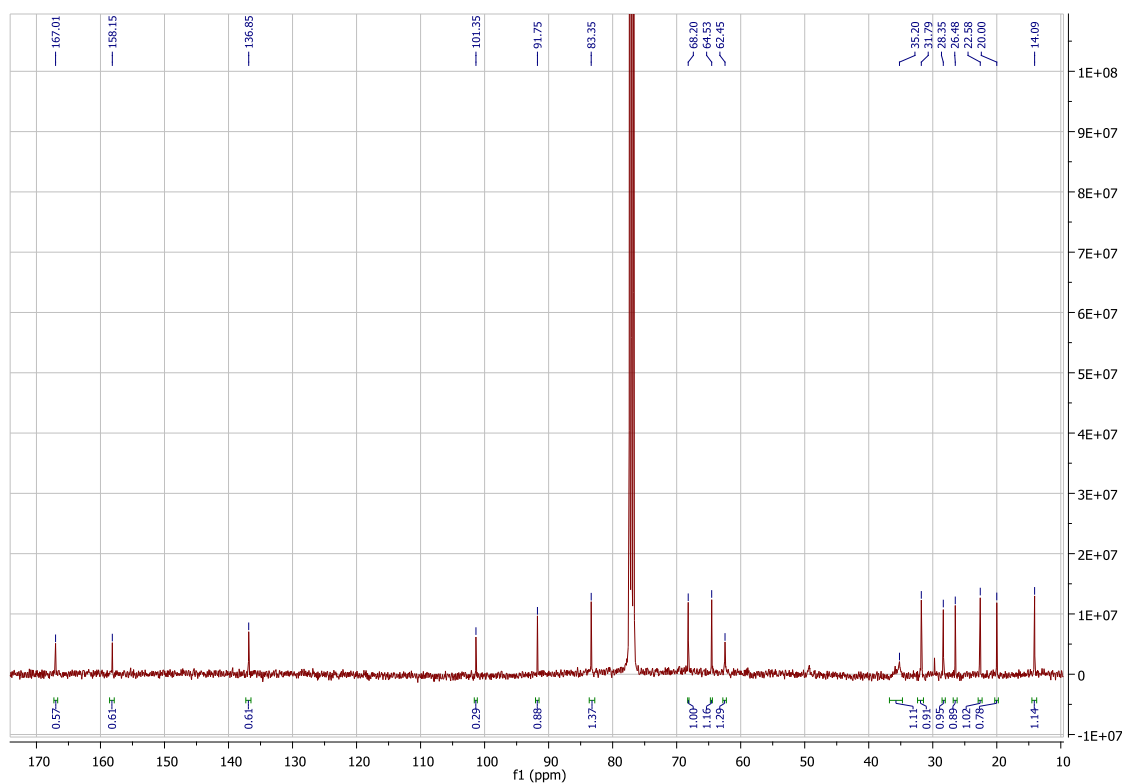


Рисунок 58 - Спектр ЯМР ^{13}C 3-гидрокси-4-(4-гидроксипиперидин-1-ил)-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.24**

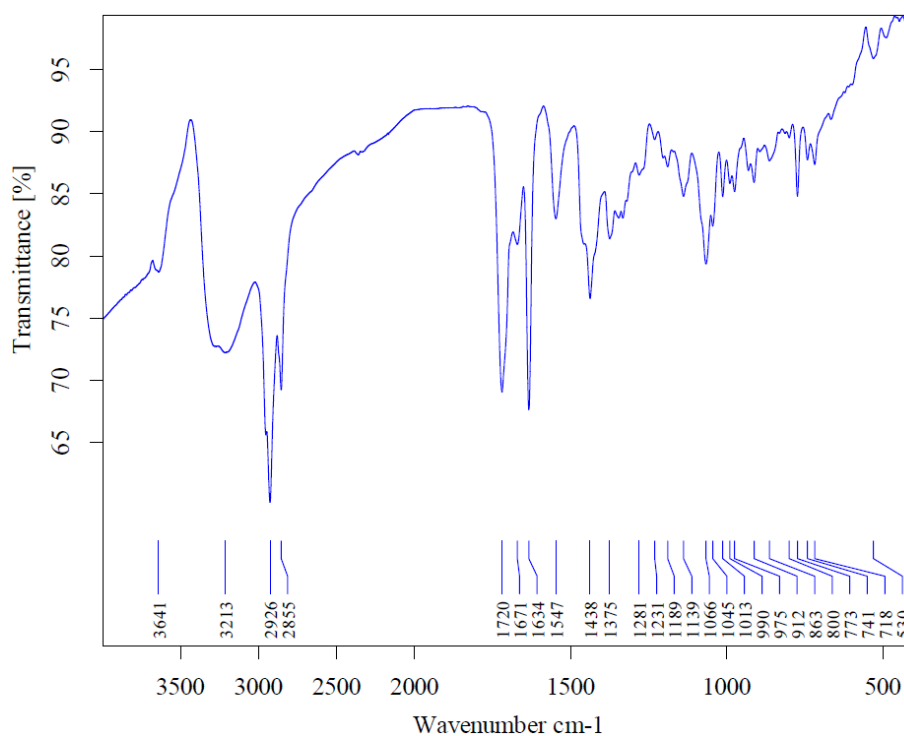


Рисунок 59 - ИК спектр 3-гидрокси-4-(4-гидроксипиперидин-1-ил)-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.24**

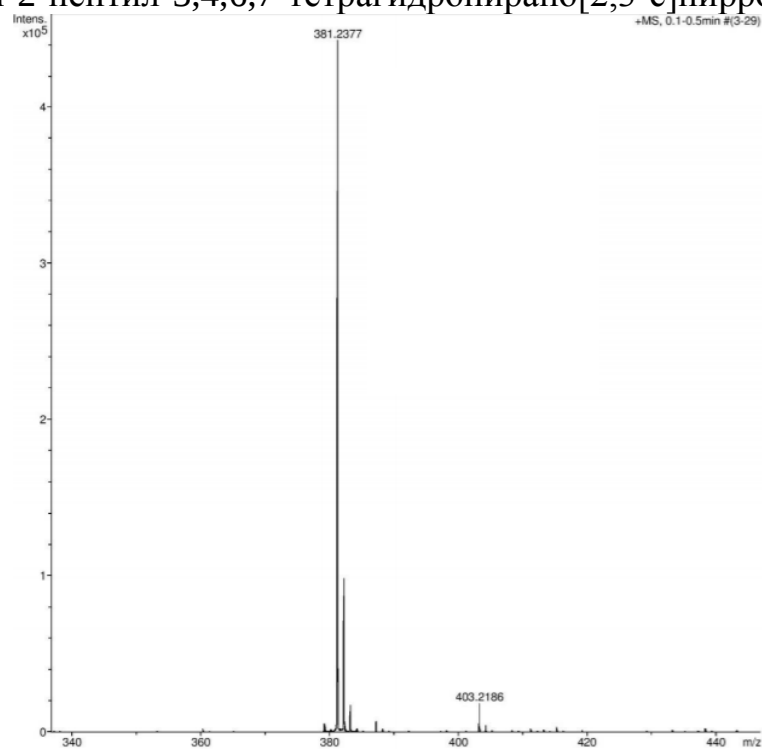


Рисунок 60 - Масс-спектр 3-гидрокси-4-(4-гидроксипиперидин-1-ил)-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.24**

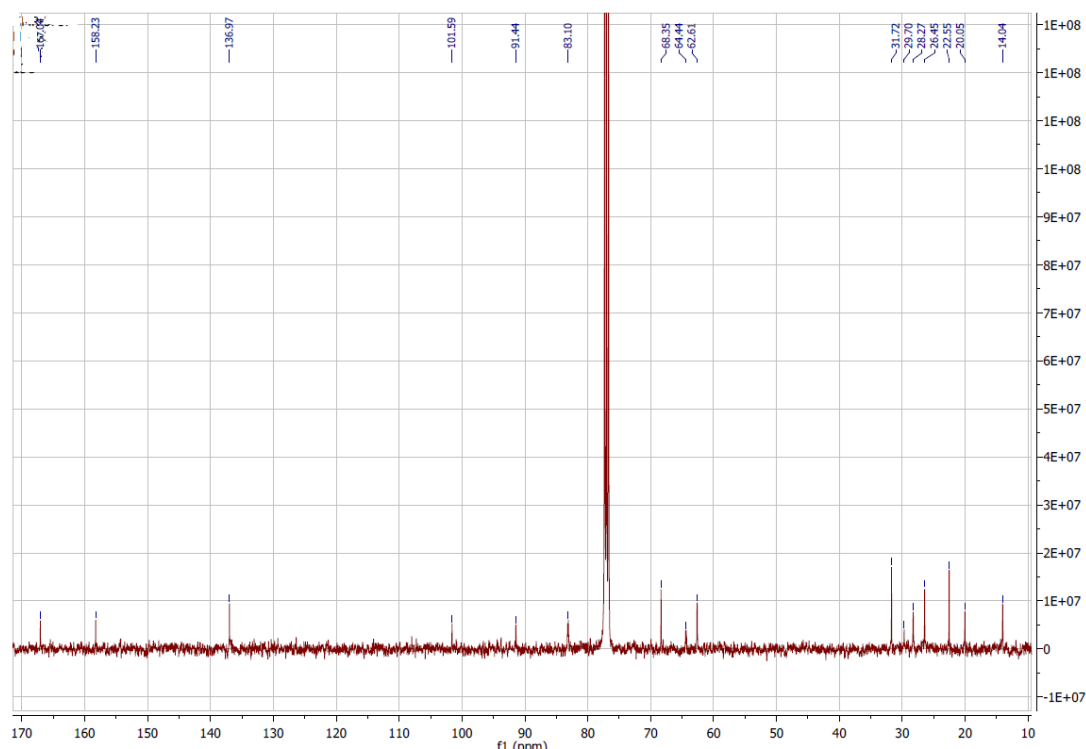


Рисунок 61 - Спектр ЯМР ^{13}C 4-(диметиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.25**

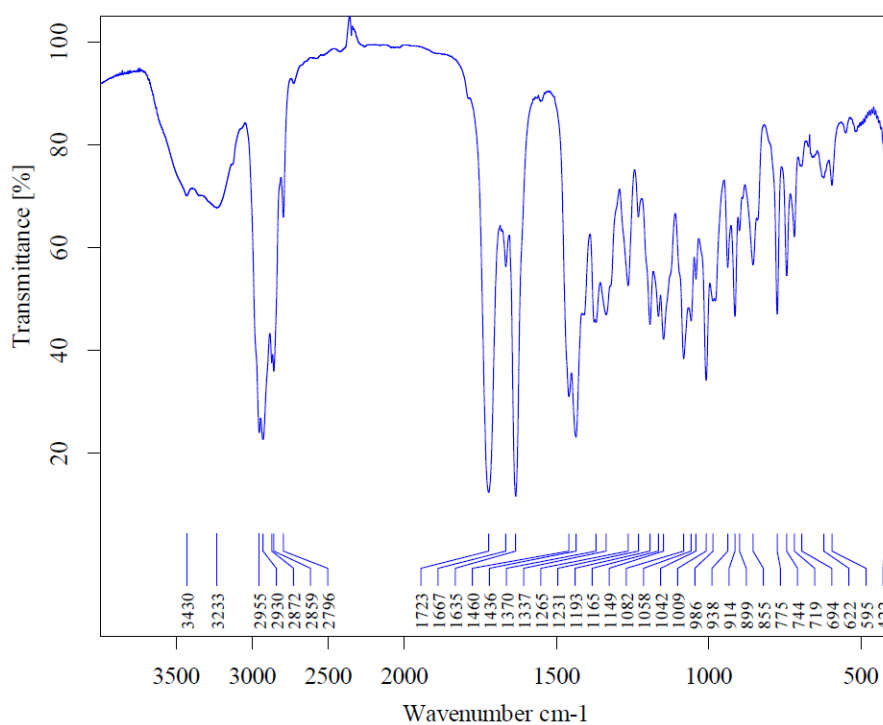


Рисунок 62 - ИК спектр 4-(диметиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.25**

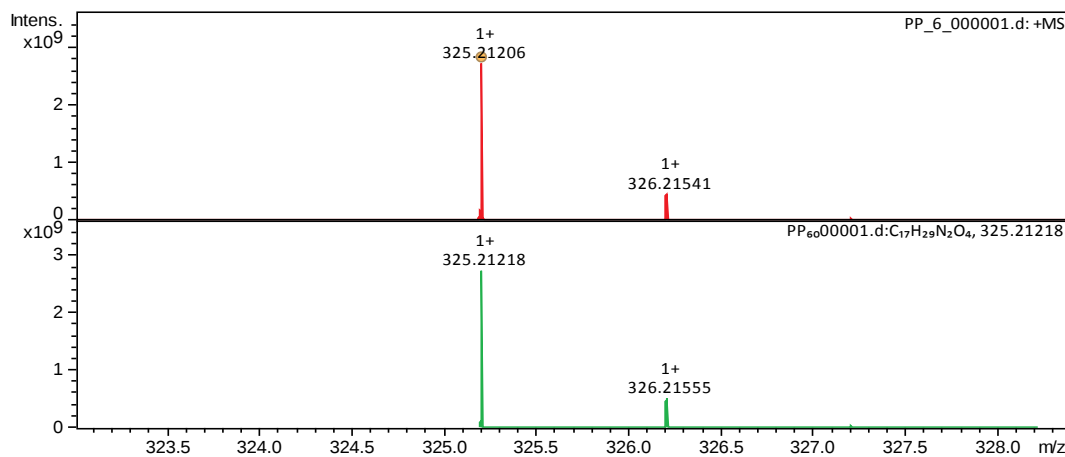


Рисунок 63 - Масс-спектр 4-(диметиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.25**

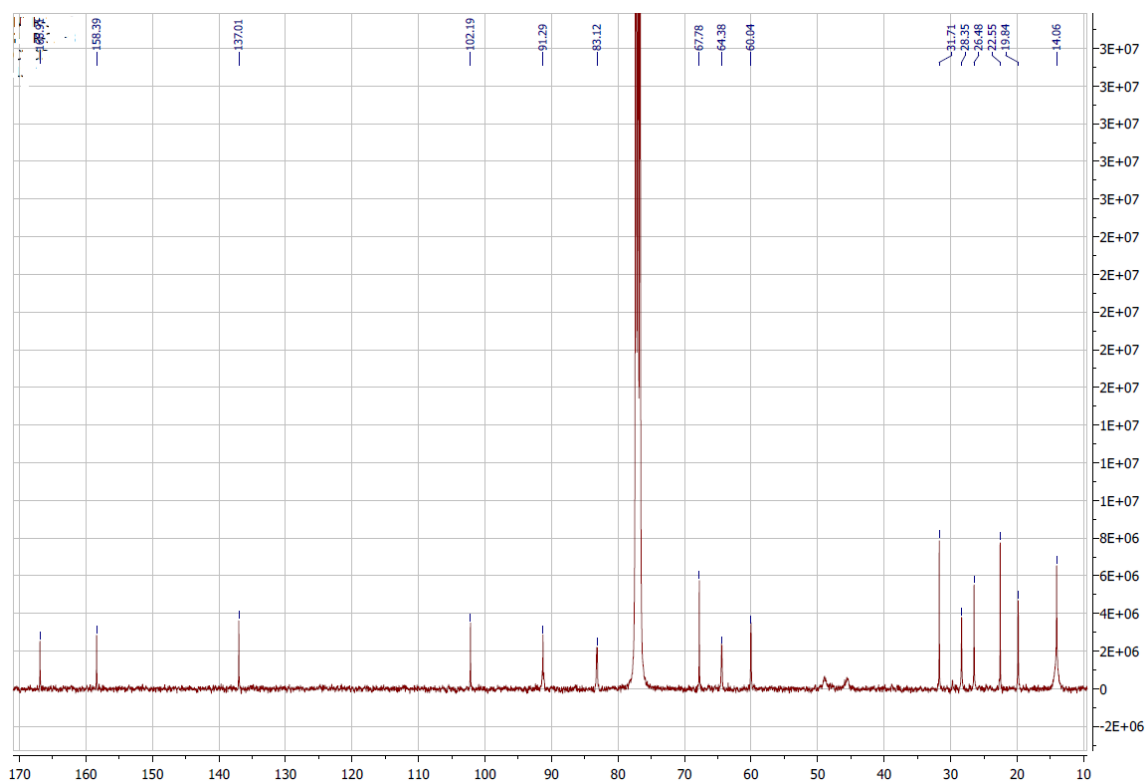


Рисунок 64 - Спектр ЯМР ^{13}C 4-(диэтиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5- (2H)-она **2.26**

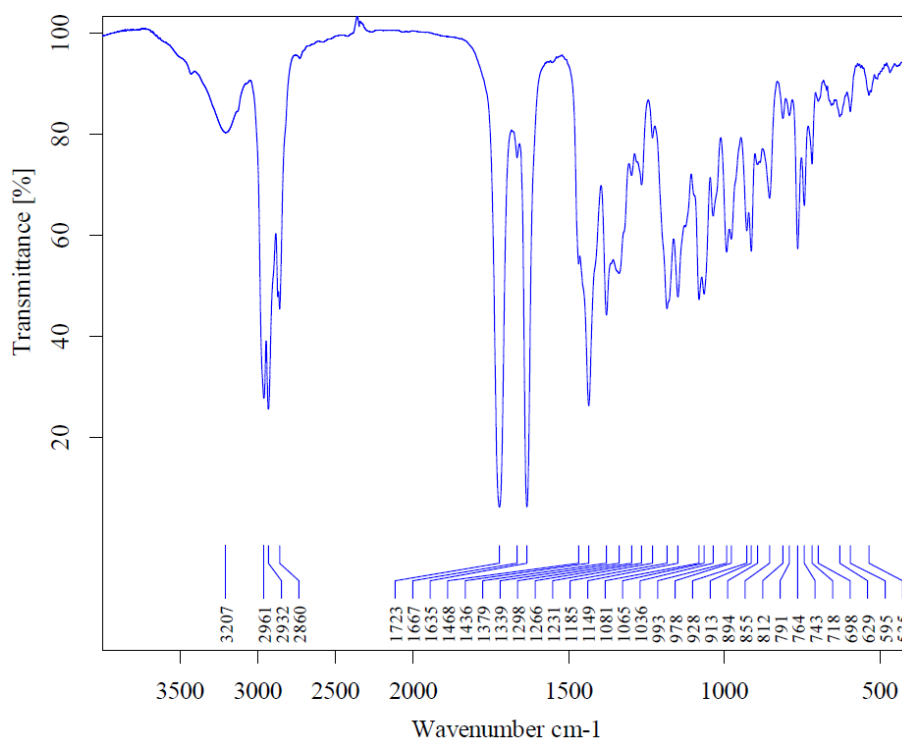


Рисунок 65 - ИК спектр 4-(диэтиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.26**

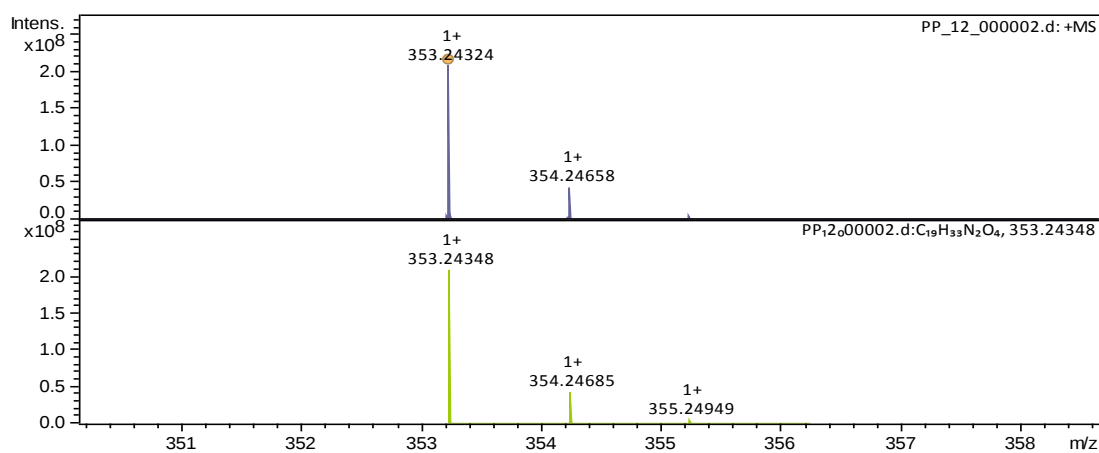


Рисунок 66 - Масс-спектр 4-(диэтиламино)-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5-(2H)-она **2.26**

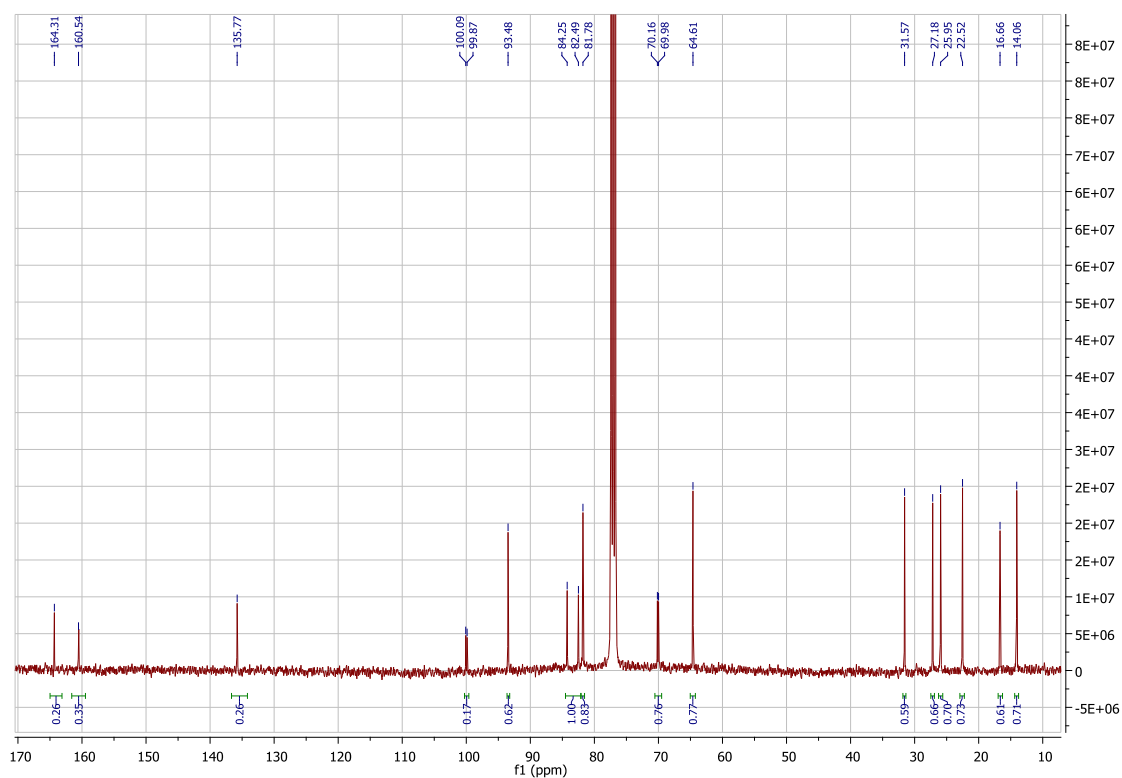


Рисунок 67 - Спектр ЯМР ^{13}C продукта (2S,3R,4R)-4-фтор-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-он **2.34**

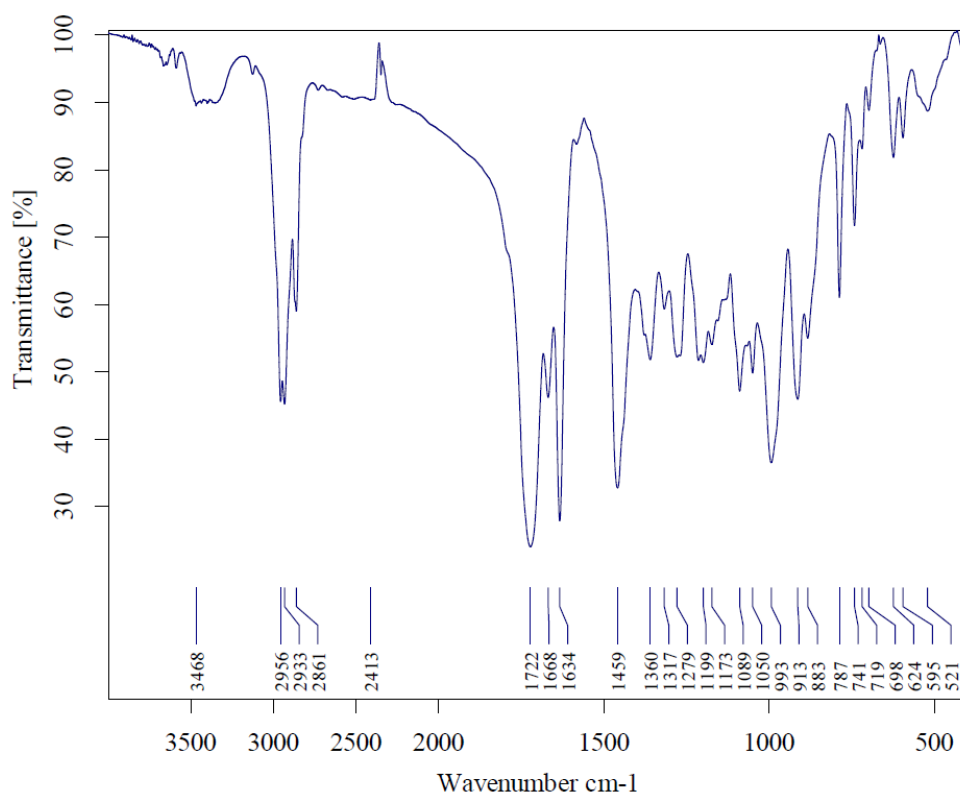


Рисунок 68 - ИК спектр (2S,3R,4R)-4-фтор-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-он **2.34**

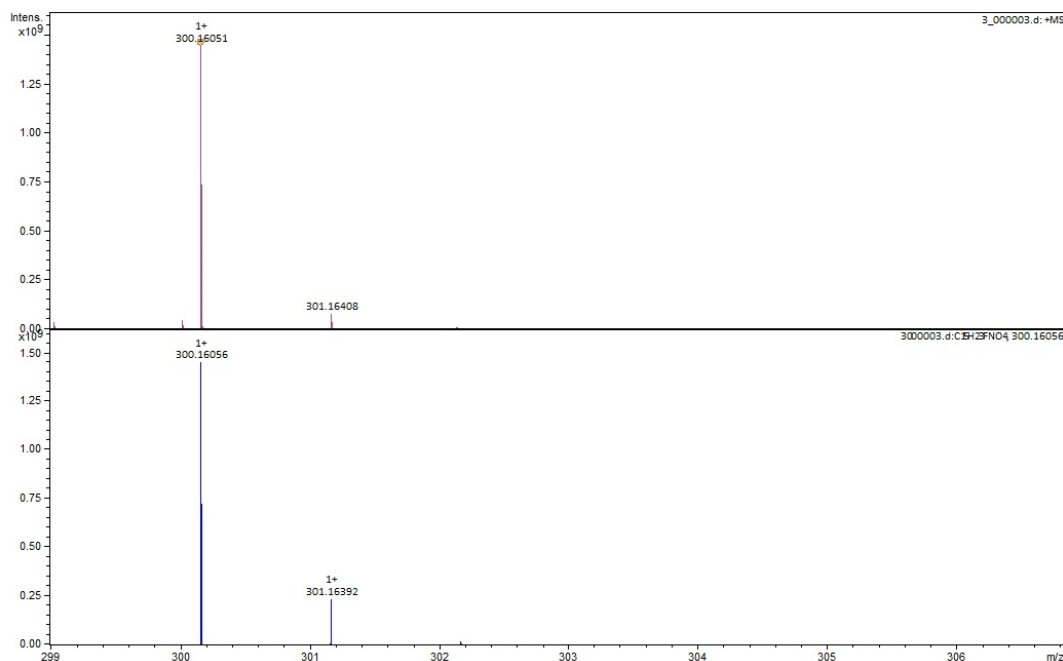


Рисунок 69 - Масс-спектр (2S,3R,4R)-4-фтор-3-гидрокси-6-метокси-3-метил-7-метилен-2-пентил-3,4,6,7-тетрагидропирано[2,3-с]пиррол-5(2H)-он **2.34**