

*На правах рукописи*



САЛИМОВА АЛЬФИЯ РАЙСОВНА

**Ti-КАТАЛИЗИРУЕМОЕ ГОМО- И КРОСС-ЦИКЛОМАГНИРОВАНИЕ  
1,2-ДИЕНОВ В СИНТЕЗЕ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ  
nZ,(n+4)Z-ДИЕНОВЫХ КИСЛОТ – ИНГИБИТОРОВ  
ТОПОИЗОМЕРАЗ I И II**

1.4.3. – Органическая химия

1.4.16. – Медицинская химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук**

Уфа-2024

Работа выполнена в Институте нефтехимии и катализа – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИНК УФИЦ РАН) (в Лаборатории каталитического синтеза и Лаборатории молекулярного дизайна и биологического скрининга веществ-кандидатов для фарминдустрии)

- Научный руководитель:** **Дьяконов Владимир Анатольевич**  
доктор химических наук, доцент, профессор РАН, руководитель группы «Лаборатория металлоорганического синтеза и катализа №25» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
- Научный консультант:** **Джемилева Лиля Усеиновна**  
доктор медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник Лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
- Официальные оппоненты:** **Волчо Константин Петрович**, доктор химических наук, профессор РАН, главный научный сотрудник ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н.Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук
- Зорин Владимир Викторович**, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент АН Республики Башкортостан, заведующий кафедрой Биохимии и технологии микробиологических производств технологического факультета ФГБОУ ВО Уфимский государственный нефтяной технический университета
- Ведущая организация:** **ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН»**

Защита состоится 11 февраля 2025 года в 16 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета 24.1.108.03. на базе ФГБУН Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, 1, зал Ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ФИЦ ПХФ и МХ РАН <https://icp-ras.ru/>. Текст автореферата размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу <http://vak3.minobrnauki.gov.ru/>.

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.108.03



к.б.н. Л.В. Аникина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Поиск новых эффективных и малотоксичных противоопухолевых препаратов – одна из важнейших задач современной медицинской химии. Одним из подходов к решению данной задачи является разработка новых соединений, воздействующих на молекулярные мишени, которые играют важную роль в процессах канцерогенеза и при повреждении которых происходит гибель опухолевой клетки.

Из литературы известно, что ДНК-зависимые ферменты - топоизомеразы, ответственные за топологию ДНК при ее синтезе и играющие одну из ключевых ролей в функционировании генетического аппарата клетки, рассматриваются в качестве перспективных внутриклеточных мишеней для разработки современных противоопухолевых соединений – ингибиторов топоизомераз.

В настоящее время известно большое число соединений различных классов способных оказывать ингибирующее действие на топоизомеразы, в том числе и выделенных из природных объектов, например, камптотецин, подофиллотоксин, антрациклины и многие другие. Однако, наряду с эффективным действием, они обладают рядом существенных недостатков, основные из которых – высокая токсичность, низкая растворимость, низкая селективность действия в отношении злокачественных новообразований и развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

Большим потенциалом среди известных ингибиторов топоизомераз человека обладают 5Z,9Z-диеновые кислоты, выделяемые из различных видов морских губок, кораллов и плодов голосеменных растений, т.к. они принадлежат к группе неспецифических блокаторов ферментов, и, как следствие, не приводят к необратимому повреждению ДНК, обладают низкой токсичностью.

Известные в литературе методы и подходы к синтезу этого класса соединений многостадийны, требуют применения дорогостоящих и труднодоступных реактивов, что существенно осложняет исследования в этой области.

В связи с вышеизложенным, разработка ценного для практического применения в лабораторной практике и последующего внедрения в методологию органического синтеза принципиально нового метода конструирования непредельных высших карбоновых кислот, содержащих строго 5Z,9Z-двойные связи высокой степени стереочистоты, близкой к 100 %, а также их производных, молекулы которых наряду с nZ,(n+4)Z-двойными связями включают функциональные группы различной природы, активные синтетические и природные фармаконы с противоопухолевой и антиоксидантной активностью, а также дополнительные двойные связи с различным удалением от карбоксильной группы, является важной и актуальной задачей.

**Степень разработанности темы.** В мировой литературе накоплен обширный материал в области изучения ингибирующей активности различных классов природных и синтетических соединений по отношению к топоизомеразам I и II человека. Кроме того, селективное регулирование активности этих ферментов с помощью ингибиторов различного действия является одним из основных способов терапии онкологических заболеваний, что свидетельствует о важности и высокой перспективности исследований, связанных с поиском новых ингибиторов указанных ферментов с целью создания на их основе эффективных противоопухолевых и антибактериальных препаратов.

Важной и крайне интересной группой липидов являются 5Z,9Z-диеновые кислоты. Исходя из того, что жирные 5Z,9Z-диеновые кислоты проявляют широкий спектр биологической активности, включая противомаларийное, противомикробное и противовирусное действие, а также имеют достаточно низкую токсичность в отношении эукариотических клеток, данный класс соединений является очень перспективным для создания на их основе различных лекарственных субстанций.

Главным сдерживающим фактором для дальнейшего всестороннего изучения 5Z,9Z-диеновых кислот является: во-первых – это отсутствие эффективных и универсальных синтетических подходов для их синтеза. Во-вторых, известные на сегодняшний день методы синтеза многостадийны и трудоемки (6–20 стадий), а выходы целевого продукта не превышают 0.5–15%. В-третьих, большинство реакций сопровождаются образованием смеси стереоизомеров.

Таким образом, создание общего универсального метода синтеза природных и синтетических стереоизомерно чистых 5Z,9Z-диеновых кислот, позволяющего получать целевой продукт

эффективно, с минимальным количеством стадий синтеза, а также всестороннее изучение влияния структуры кислот на проявляемую ими активность ингибирования ферментов, ответственных за топологию молекулы ДНК, является важной и актуальной задачей органической и медицинской химии.

**Цель исследования.** Создание эффективных малостадийных, универсальных и удобных для практического применения методов синтеза стереоизомерно чистых диеновых кислот и их производных, содержащих в своей структуре 1Z,5Z-диеновую группу, получение которых основано на разработанной авторами оригинальной реакции перекрестного каталитического межмолекулярного цикломагнирования алифатических и функционально-замещенных терминальных алленов с помощью доступных реактивов Гриньяра под действием комплексных катализаторов на основе Ti.

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

1) Разработать универсальный, одnoreакторный метод стереоселективного синтеза высших непредельных карбоновых кислот, содержащих в своей структуре 1Z,5Z-диеновую систему.

2) Синтезировать производные 5Z,9Z-диеновых кислот с различным положением диеновой группировки относительно карбоксильной группы для установления основных закономерностей, влияющих на активность ингибирования топоизомеразы человека I и II *in vitro*.

3) Изучить закономерности влияния структуры исследуемых соединений на каталитическую активность ключевых ферментов клеточного цикла с целью выявления наиболее активных образцов для ингибирования топоизомераз.

**Научная новизна.** Впервые разработан эффективный каталитический метод синтеза природных и синтетических жирных nZ,(n+4)Z-диеновых кислот с высокими выходами и селективностью, основанный на применении новой реакции перекрестного межмолекулярного цикломагнирования терминальных алифатических и O-содержащих 1,2-диенов с помощью реактивов Гриньяра под действием катализатора  $\text{Cr}_2\text{TiCl}_2$ .

Разработаны альтернативные методы синтеза природных nZ(n+4)Z-диеновых кислот.

Для синтезированных высших диеновых кислот, а также их производных, впервые проведены исследования по изучению их свойств в качестве ингибиторов топоизомеразы человека I и II *in vitro*. Найдены активные ингибиторы топоизомераз I и II, установлены закономерности влияния структуры nZ(n+4)Z-диеновых кислот на проявляемую ими активность ингибирования топоизомеразы, а также изучена их цитотоксическая активность в отношении опухолевых клеточных линий.

Впервые осуществлен стереоселективный синтез ранее не описанной в литературе (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты, обладающей выраженной ингибирующей активностью топоизомераз I и II *in vitro*.

Впервые проведены эксперименты *in vivo* по изучению противоопухолевых свойств 5Z,9Z-диеновых кислот на лабораторных животных с перевитой злокачественной карциномой легких Льюис (LLC) и солидной злокачественной мышинной лимфомой (RLS). Обнаружено, что (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновая кислота проявляет достоверный противоопухолевый эффект на группах мышей с LLC, (5Z,9Z)-11-фенил-ундека-5,9-диеновая кислота проявляет достоверный противоопухолевый эффект на группах мышей с RLS, соответствующее эффекту при применении доксорубина.

Впервые разработан оригинальный эффективный малостадийный метод синтеза синтетических аналогов природных 5Z,9Z-диеновых кислот, а также проведены исследования по изучению противораковых свойств *in vitro* в отношении клеточных культур различных видов лейкемии (Jurkat, HL-60, K562, U937). Одновременно с помощью проточной цитофлуориметрии изучены влияние природных 5Z,9Z-диеновых кислот и их синтетических производных на клеточный цикл и способность индуцировать апоптоз.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Выполнена программа ориентированных фундаментальных исследований по созданию и разработке важных и перспективных для применения в практике стереоселективных методов синтеза природных 5Z,9Z-диеновых кислот и их синтетических производных различной химической структуры.

Одновременно проведено подробное изучение их свойств *in vitro* в качестве ингибиторов топоизомеразы человека I и II, установлена зависимость структуры кислот и природы заместителя на эффективность ингибирования топоизомераз и с помощью молекулярного докинга *in silico* показан детальный механизм ингибирования фермента.

Выполненные исследования и полученные результаты открывают новые перспективы для создания на основе 5Z,9Z-диеновых кислот современных, малотоксичных противоопухолевых препаратов таргетного действия для лечения онкологических заболеваний.

**Методология и методы исследования.** В диссертационном исследовании были использованы как современные методы органического синтеза и металлокомплексного катализа, так и классические подходы, и способы изучения и идентификации структур химических соединений, а именно одномерная, двумерная, гомо- и гетероядерная ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия (MALDI TOF/TOF), ИК-спектроскопия. Также были привлечены классические методы выделения и очистки соединений (ректификация, тонкослойная и колоночная хроматография, перекристаллизация). Биологическая активность соединений изучалась с привлечением проточной цитометрии. В работе были использованы различные раковые иммортализованные линии клеток различных видов лейкемии (Jurkat, HL-60, K562, U937), полученные из Европейской клеточной коллекции (ECCAC).

**Положения, выносимые на защиту.**

1) Разработан новый метод стереоселективного синтеза высших непредельных карбоновых кислот, содержащих 1Z,5Z-диеновую систему, с привлечением на ключевой стадии оригинальной реакции Ti-катализируемого гомо- и кросс-цикломагнирования функционально-замещенных 1,2-диенов с применением доступных реактивов Гриньяра.

2) Установлены основные закономерности влияния структуры исследуемых соединений и природы заместителя на каталитическую активность ключевых ферментов, ответственных за топологию ДНК *in vitro*.

3) Определены ингибирующие свойства наиболее активных производных 5Z,9Z-диеновых кислот в отношении топоизомеразы I *in vivo* на линейных мышцах (линия C57Bl/6j).

4) Разработан новый метод синтеза синтетических аналогов природных 5Z,9Z-диеновых кислот, содержащих в своей структуре сложноэфирную группировку.

5) Обнаружено влияние положения и ориентации сложноэфирной группировки в молекуле 5Z,9Z-диеновых кислот на противораковую активность *in vitro* на клеточных культурах лейкемии (Jurkat, HL-60, K562, U937).

**Степень достоверности и апробация работы.** Высокая достоверность полученных научных результатов достигнута применением современных методов анализа структуры органических соединений, а также привлечением эффективных методов анализа клеточных популяций с помощью проточной цитометрии и анализа активности ферментов топологии ДНК. Материалы диссертационной работы широко представлены на отечественных и зарубежных симпозиумах и конференциях – II-й Международный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии «МедОргБиоХим» (Крым, 2015), Международная конференция по медицинской химии «MedChem» (Новосибирск, 2015), Научная конференция грантодержателей «Фундаментальные химические исследования XXI-го века» (Москва, 2016), XX-й Менделеевский съезд по общей и прикладной химии» (Екатеринбург, 2016), Международная научно-практическая конференция «Органические и гибридные функциональные материалы и аддитивные технологии» (Москва, 2018).

**Личный вклад автора.** Формулировка темы диссертационного исследования, а также определение целей и задач было проведено автором совместно с научным руководителем д.х.н., проф. РАН Дьяконовым В.А. Личный вклад автора состоит в поиске и анализе литературных данных, планировании экспериментов, отработке методик синтезов, анализе структур полученных соединений, интерпретации данных, полученных в ходе экспериментальных работ, участии в проведении тестов полученных соединений на биологическую активность, написании статей и тезисов докладов для апробации на конференциях.

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных трудов, из них 7 статей в международных журналах, включенных в список ВАК и индексируемых в системах

Scopus и Web of Science, а также 6 тезисов докладов на российских и международных научно-практических конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 167 страницах машинописного текста, включает 7 схем, 31 рисунок и 4 таблицы. Состоит из введения, литературного обзора на тему «Успехи в химии природных и полусинтетических ингибиторов топоизомеразы I/II», обсуждения результатов, состоящего из 5 глав, экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы (243 наименования).

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность члену-корреспонденту РАН Джемилеву У.М. за помощь при выборе направления исследования, новые идеи, постоянную поддержку при обсуждении и интерпретации полученных результатов, за формирование исследовательского взгляда на мир. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность своему научному руководителю д.х.н., проф. РАН Дьяконову В.А. за выбор направления исследования, за внимание, неоценимую помощь в формулировке целей и задач диссертации, обсуждение результатов, поддержку на всех этапах научной работы. Автор благодарит д.м.н., доцента Джемилеву Л.У. за проведение биологических исследований, за ценные советы, научные консультации и помощь при выполнении диссертационной работы. Также автор выражает искреннюю благодарность к.х.н. Макарову А.А. за совместную работу по теме диссертации, за неоценимую помощь в получении новых экспериментальных навыков, рекомендации и помощь при ее выполнении и написании и всестороннюю поддержку. Автор выражает признательность д.х.н., проф. РАН Рамазанову И.Р. и к.б.н. Баеву Д.С. за помощь в выполнении исследований *in silico*. Особую благодарность автор выражает д.б.н., профессору, зав. лаборатории фармакологических исследований Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН Толстиковой Т.Г. за проведение исследований биологической активности синтезированных соединений на линейных животных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

**Первая глава** (литературный обзор) содержит анализ современного состояния исследований в области химии природных и полусинтетических ингибиторов топоизомераз I/II.

Во **второй главе** (обсуждение результатов) представлены результаты проведенных исследований по разработке общего стереоселективного метода синтеза природных и синтетических высших  $nZ, (n+4)Z$ -диеновых кислот, а также их производных. Приведены результаты исследований, направленных на изучение активности ингибирования синтезированных соединений топоизомераз I (hTop1) и II (hTop2a) *in vitro*. Представлены результаты экспериментов по изучению противоопухолевой активности *in vivo* и *in vitro*.

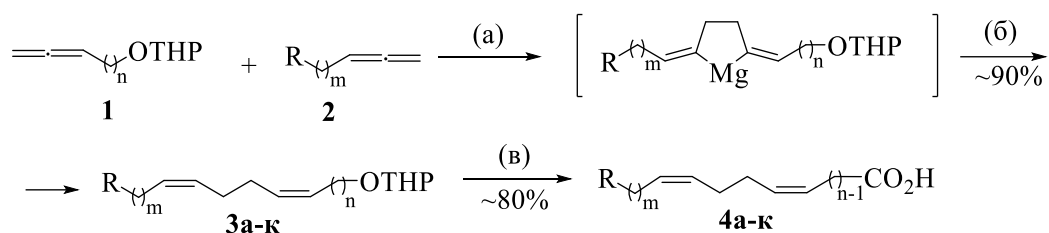
В **третьей главе** (экспериментальная часть) приведено описание методик эксперимента и спектральные характеристики синтезированных соединений.

### 1. Разработка общего стереоселективного метода синтеза природных и синтетических высших $nZ, (n+4)Z$ -диеновых кислот и изучение активности ингибирования человеческих топоизомераз I/IIa *in vitro*

В развитие проводимых ранее исследований в области перекрестного цикломагнитирования O-содержащих и алифатических 1,2-диенов мы разработали эффективный универсальный метод синтеза диеновых кислот, содержащих в своей структуре 1Z,5Z-диеновую группу. Согласно разработанной стратегии синтеза  $nZ, (n+4)Z$ -диеновых жирных кислот, первой стадией является  $\text{Cr}_2\text{TiCl}_2$ -катализируемое кросс-цикломагнитирование тетрагидропирановых эфиров алкадиен-1-олов **1** с терминальными алифатическими алленами **2**, индуцированное  $\text{EtMgBr}$  в условиях (1:2:EtMgBr:Mg:[Ti] = 10:12:40:32:0.5;  $\text{Et}_2\text{O}$ , 6 ч, 20–22 °C) с образованием 2,5-диалкилиденмагнезациклопентанов, которые затем гидролизуют в тетрагидропирановые эфиры алкадиенолов **3**. Окисление этих продуктов по Джонсу ( $\text{CrO}_3\text{--H}_2\text{SO}_4$ , 0,5 ч, 0 °C) приводило к

получению целевых диеновых кислот **4а-к** с заданным 1*Z*,5*Z*-положением диеновой группы по отношению к карбоксильной группе с выходами 61–75 % и стереоселективностью 98 % (схема 1).

При изучении каталитического цикломагнирования 1,2-диенов мы обнаружили, что строение тетрагидропирановых эфиров алкадиен-1-олов **1** и длина концевого 1,2-диена **2** существенно не влияют на выход и селективность образования эфиров тетрагидропирана **3**.



**Реагенты и условия:** а): EtMgBr, Mg, [Ti]; б): H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>; в): реагент Джонса, [Ti] = Cp<sub>2</sub>TiCl<sub>2</sub>  
 (R=Me): n = 2: m = 11 (а); n = 4: m = 5 (б), 9 (в), 11 (г), 13 (д), 17 (е); n = 5: m = 8 (ж);  
 n = 6: m = 7 (з); n = 10: m = 3 (и), 11 (к).

Схема 1

Учитывая полученные ранее результаты и литературные данные об ингибирующей активности 5*Z*,9*Z*-диеновых кислот в отношении топоизомеразы I человека и об исключительно высокой ингибирующей активности (5*Z*,9*Z*)-5,9-эйкозадиеновой кислоты в отношении hTop1, мы попытались определить влияние положения 1*Z*,5*Z*-диеновой системы относительно карбоксильной группы в синтезированных кислотах на активность ингибирования топоизомераз I и II человека. Отметим, что к началу наших исследований данные об ингибировании топоизомеразы II человека диеновыми жирными кислотами отсутствовали.

В результате исследований ингибирующей активности диеновых кислот **4** по отношению к ферменту топоизомеразы I и II *in vitro* при релаксации суперспирализованной плазмидной ДНК в стандартных условиях (рисунок 1 и 2, соответственно) были определены активные ингибиторы топоизомераз I и II, а также выявлена связь между их структурой и ингибирующей активностью, что определяет наиболее перспективные пути химической модификации соединений с целью усиления их химиотерапевтических свойств.

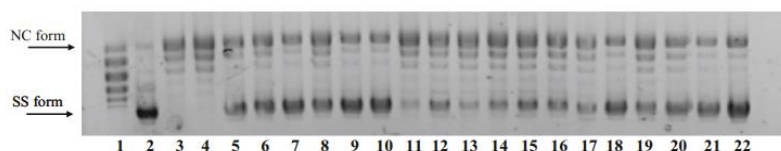


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов релаксации *in vitro* суперспирализованной плазмидной ДНК под действием топоизомеразы I («Topogen», США) в присутствии **4е-к** (NC-form – открытая форма плазмиды, SS-form – суперспирализованная форма плазмиды)

Увеличение концентрации вносимой диеновой кислоты от 50 до 250 мкМ приводило к постепенному уменьшению числа образующихся топоизомеров и увеличению доли как суперспиральной формы ДНК, так и открытой кольцевой формы, что свидетельствует о замедлении процесса релаксации, т.е. снижении активности топоизомеразы I. Без изучаемых соединений в системе этот эффект не наблюдается (рисунок 1, дорожки 3, 4).

В присутствии кислот **4е-к** заметное ингибирование наблюдалось уже при концентрации 50 мкМ, что проявлялось в сохранении остаточных количеств сверхспиральной ДНК по сравнению со сверхспиральной ДНК в качестве отрицательного контроля. Все исследуемые ненасыщенные диеновые кислоты вели себя практически одинаково в изученном диапазоне концентраций, оказывая ингибирующее действие на топоизомеразу I в концентрациях 50 мкМ и выше. Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что исследуемые диеновые кислоты подавляют каталитическую активность топоизомеразы I даже в микромолярных концентрациях. Механизм взаимодействия диеновых кислот с топоизомеразой до сих пор не совсем

ясен. По-видимому, их действие включает как стабилизацию ковалентного комплекса ДНК-топо I (специфическое ингибирование), так и конкуренцию диеновой кислоты и фермента за участки связывания ДНК (неспецифическое ингибирование).

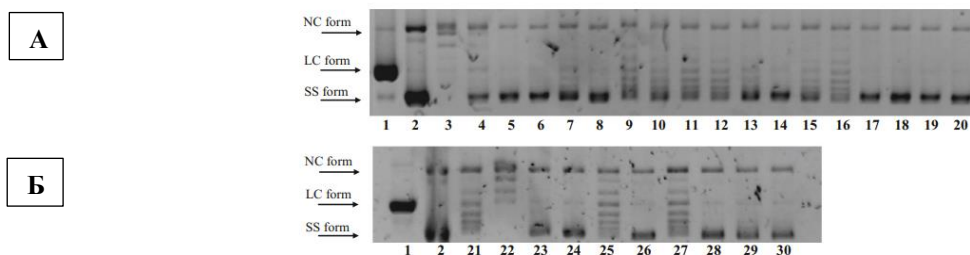


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов релаксации *in vitro* суперспирализованной плазмидной ДНК под действием топоизомеразы II $\alpha$  («Topogen», США) в присутствии **4б**, **4е-к** (NC-form – открытая форма плазмиды, NL-form – линейная форма плазмиды, SS-form – суперспирализованная форма плазмиды)

Среди ряда исследуемых соединений, (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновая (**4б**) и (7Z,11Z)-эйкоза-7,11-диеновая (**4з**) кислоты оказались более сильным ингибитором топоизомеразы II, чем другие кислоты (рисунок 2). Их ингибирующая концентрация составляла 0.1 мкМ. Увеличение концентрации этих кислот приводит к снижению активности топоизомеразы в количестве образующихся топоизомеров и лишь частичной релаксации суперспирализованной формы ДНК. Кислота **4з** оказывает достаточно сильное ингибирующее действие (концентрация 0.1 мкМ) на топоизомеразу II, тогда как ее ингибирующее действие на топоизомеразу I проявляется при более высокой концентрации (50 мкМ).

Для выяснения механизма действия полученных соединений было проведено компьютерное молекулярное моделирование с использованием трехмерной модели связывания тестируемого соединения с активными центрами топоизомеразы I, II $\alpha$  и с ДНК, полученной кристаллографическими методами. Осуществлен молекулярный докинг десяти тестируемых соединений **4а-к** в сайты связывания топоизомеразы I, II $\alpha$  и ДНК.

Результат молекулярного докинга кислот **4** в модели топоизомераза I – лиганд позволяет сделать вывод о том, что низкая ингибирующая активность топоизомеразы I ненасыщенных кислот с длиной углеводородной цепи в 20 атомов углерода и различным положением диеновой системы подтверждает важность положений двойной связи при 5 и 9 атомах углерода.

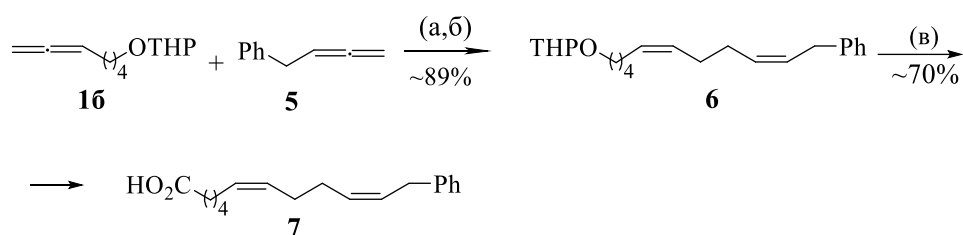
Таким образом, вполне вероятно, что диеновые кислоты, являющиеся низкомолекулярными лигандами, замедляют протекание каталитического цикла действия топоизомера блокируя связывание топоизомеразы как с дуплексом, так и с ДНК. Подобные ингибиторы ограничивают активности работы фермента топоизомеразы I и действуют по неспецифическому механизму ингибирования.

## 2. Стереоселективный синтез (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты и исследование ее ингибирующей активности в отношении топоизомеразы I и II $\alpha$ человека

В развитие проводимых исследований нами была выдвинута идея о необходимости введения в молекулу изучаемых нами стереоизомерно чистых высших 5Z,9Z-диеновых кислот фенильной группы, которая, как мы предположили, может играть роль резервуара электронов, что приведет к более активному комплексообразованию фенилзамещенных кислот с активным центром топоизомераз или молекулой ДНК. Учитывая вышеизложенное, мы провели стереоселективный синтез (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты **7**. Согласно разработанной ранее и описанной выше стратегии синтеза 5Z,9Z-диеновых кислот, осуществлялось путем межмолекулярного перекрестного цикломагнитирования 2-(гепта-5,6-диен-1-илокси)тетрагидро-2-пирана (**1б**) и бута-2,3-диен-1-илбензола (**5**) с EtMgBr в присутствии активированного Mg и катализатора Cr<sub>2</sub>TiCl<sub>2</sub> в выбранных условиях эксперимента (5:6:EtMgBr:Mg:[Ti]=10:12:40:32:0.5, Et<sub>2</sub>O, 8ч, 20-22 °C). Кислотный гидролиз реакционной смеси дал 2-[(5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диен-1-ил]окси}тетрагидро-2-пиран (**6**) с выходом 89%. Окислением продукта **6** по Джонсу была



получена ранее неописанная (5*Z*,9*Z*)-11-фенилундека-5,9-диеновая кислота **7** с выходом 70% (схема 2).



Реагенты и условия: а): EtMgBr, Mg, [Ti]; (б): H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>; (в): реагент Джонса, [Ti] = Cp<sub>2</sub>TiCl<sub>2</sub>

Схема 2

Следующим этапом было исследование ингибирующего действия кислоты **7** на активность топоизомеразы I человека *in vitro* при релаксации суперспирализованной плазмидной ДНК в стандартных условиях (рисунок 3).

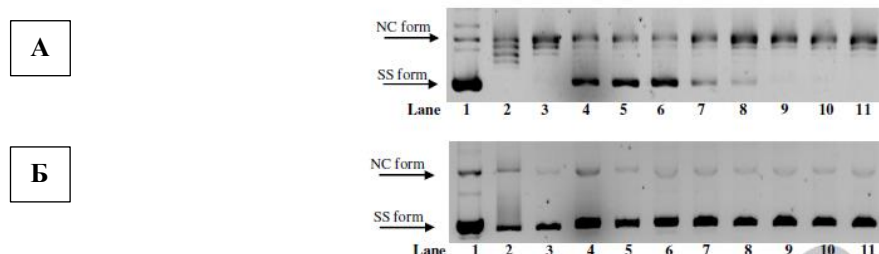


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов релаксации 250 нг плазмидной ДНК (pHOT1) *in vitro* под действием топоизомеразы I («Тороген», США) в присутствии кислоты **7**

В присутствии кислоты **7**, как и в случае с камптотецином, можно было заметить линию открытой кольцевой формы плазмиды. Однако ее интенсивность была ниже, чем в присутствии камптотецина – высокоселективного ингибитора топоизомеразы I. Ингибирование топоизомеразы I может быть связано с прямым взаимодействием соединения **7** с молекулой ДНК, изменяющим ее молекулярную форму (конформацию), в отличие от механизма действия камптотецина. Наблюдаемая в наших экспериментах электрофоретическая подвижность молекул ДНК может быть обусловлена не только изменением активности топо I, но и влиянием самих диеновых кислот на конформацию молекулы ДНК. Поэтому возникла необходимость определить диапазон концентраций, в котором исследуемые соединения могут влиять на электрофоретическую подвижность ДНК. Чтобы определить, вызывают ли синтезированные соединения (**46** и **7**) конформационные изменения в спирали ДНК и существует ли связь между аффинностью связывания кислот с плазмидой и ДНК, мы исследовали их способность удалять и обращать вспять сверхспирализацию замкнутой кольцевой плазмидной ДНК pHOT1 (рисунок 4).

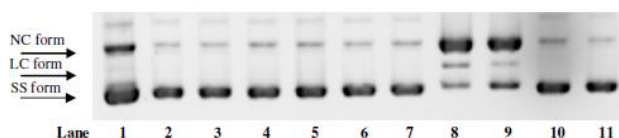


Рисунок 4 – Модификация электрофоретической подвижности суперспирализованной плазмидной ДНК pHOT1 при инкубации (30 мин, 37 °С) с различными концентрациями соединений **46**, **7**, камптотецина (СРТ) и этопозида (VP16) (NC-form – открытая кольцевая форма плазмиды, NL-form – линейная конформационная форма плазмиды, SS-form – ковалентно закрытая форма плазмиды)

На рисунке 4 показано, что соединение **7** способно достаточно эффективно релаксировать ДНК плазмиды pHOT1 в области микромолярных концентраций, о чем свидетельствует уменьшение формы SS и увеличение формы NC и появление формы LC. В электрофореграммах в качестве контроля использовали необработанную плазмидную ДНК pHOT1, которая представляет

собой смесь преимущественно замкнутой кольцевой формы и небольшого количества полос открытой кольцевой формы (*дорожка 1*). С увеличением концентрации кислоты **7** от 5 до 10 мкмоль (рисунок 4, *дорожки 7, 8*) количество разорванной ДНК увеличивается в пользу суперспирализованной ДНК. Для двух тестовых соединений камптотецина и этопозида степень взаимодействия с ДНК соответствует соединению **7**. Примечательно, что в экспериментах с ДНК плазмиды рНОТ1 только соединение **7** вызывало эффективное расщепление ДНК.

Вероятно, ингибирующее действие кислоты **7** на топоизомеразу I обусловлено ее высокой аффинностью связывания с ДНК, что, по-видимому, затрудняет взаимодействие топо I со специфическими последовательностями ДНК или это соединение локально изменяет конформацию ДНК. В пользу этого предположения свидетельствуют данные молекулярного докинга соединения **7**, выполненные с использованием уточненной компьютерной модели сайта связывания рассматриваемого соединения с активным центром топоизомеразы I, полученной кристаллографическими методами (рисунок 5). Компьютерное моделирование показывает, что благодаря относительно небольшому размеру молекулы (по сравнению с камптотецином), (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновая кислота легко помещается, как и ожидалось, в относительно емкую белковую полость активного центра топоизомеразы I

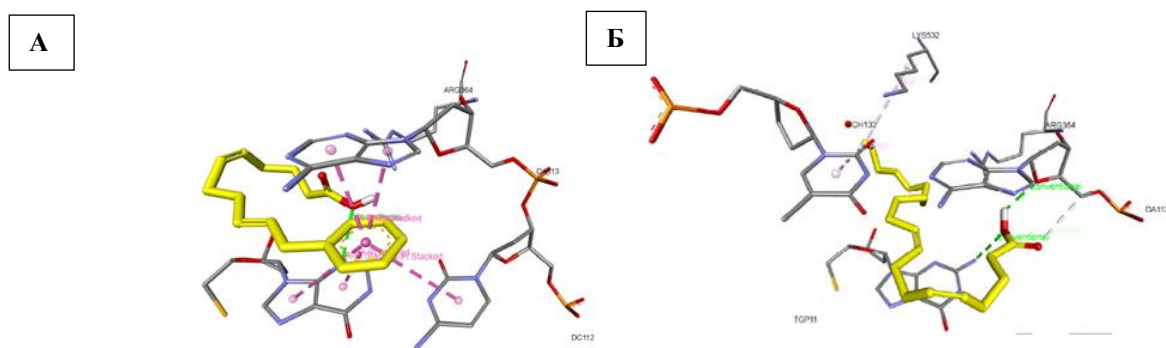


Рисунок 5 – Докинг (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты **7** (А) и (5Z,9Z)-5,9-эйкозадиеновой кислоты **46** (Б) в активном центре топоизомеразы I (водородные связи показаны пунктирными линиями, желтым – структура лиганда)

Сравнение расположения кислоты **7** и (5Z,9Z)-5,9-эйкозадиеновой кислоты **46**, синтезированной нами ранее, которая также проявляла высокую ингибирующую активность hTop1, в активном центре топоизомеразы I, указывает на то, что липофильная часть кислоты **7**, как и кислота **46**, образует благоприятные гидрофобные контакты с Arg364 (рисунок 5). Замена алкильной цепи в исходной молекуле кислоты **46** на липофильный фенильный фрагмент приводит к активному вовлечению фенильной системы в стэкинг (взаимодействие) с ароматической структурой нуклеотидов (аденином). Известно, что стэкинг является основным типом нековалентного взаимодействия в структуре ДНК, стабилизирующим спиральную конфигурацию. В результате кислота **7** более тесно взаимодействует с ДНК по сравнению с кислотой **46**, имеющей длинные алкильные цепи.

В дальнейшем мы изучали ингибирующее действие кислоты **7** в отношении топоизомеразы II человека *in vitro* в условиях релаксации суперспирализованной плазмидной ДНК в стандартных условиях (рисунок 6).

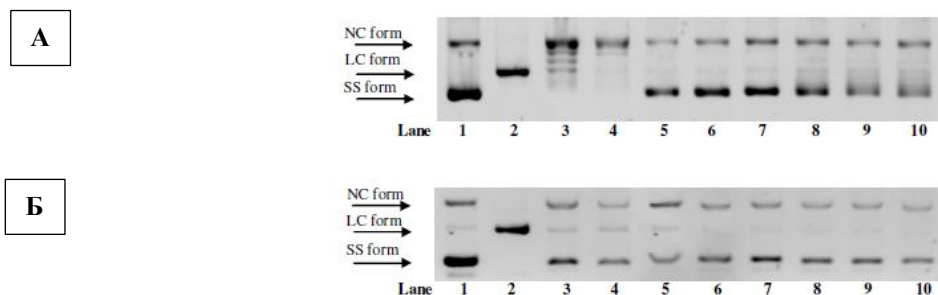


Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов релаксации 250 нг плазмидной ДНК (pHOT1) *in vitro* под действием топоизомеразы II, (Topogen, USA) в присутствии (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты **7** (вещество внесено перед добавлением фермента топоизомеразы II)

Результаты, представленные на рисунке 6 (А и Б), свидетельствуют о том, что при релаксации суперспирализованной плазмидной ДНК, в которой топоизомераза II ингибируется кислотой **7** (в данном конкретном случае 1 единица фермента ингибируется 0,08 мкМ соединения, *дорожки 5-10*), последовательное снижение концентрации исходной кислоты от 5 до 0,06 мкМ сопровождается накоплением преимущественно суперспирализованной плазмиды (рисунок 6, *дорожки 5-10*, гель с содержанием этидия бромид при электрофоретическом разделении конформеров плазмиды). При разделении продуктов этой реакции методом гель-электрофореза с бромидом этидия (рисунок 6, гель с содержанием этидия бромид при электрофоретическом разделении конформеров плазмиды) в присутствии кислоты **7** мы наблюдали дозозависимое накопление линейной формы плазмиды, характерное для так называемых ядов топо II или при специфическом ингибировании. Для подтверждения данного специфического механизма ингибирования фермента с участием кислоты **7** необходимы дополнительные методы анализа. По-видимому, ингибирующее действие кислоты **7** на топоизомеразу II определяется как более высоким сродством к ДНК (результаты молекулярного докинга), так и более активным действием кислоты **7** на топоизомеразу II, а именно, взаимодействие с каталитическим центром топоизомеразы II за счет наличия ароматического кольца в молекуле. Наше предположение подтверждается молекулярным докингом кислоты **7**, проведенным с использованием уточненной компьютерной модели сайта связывания рассматриваемого соединения с активным центром топоизомеразы II и ДНК, полученной кристаллографическими методами.

По данным компьютерного моделирования, фенильный радикал кислоты **7** активно участвует в стэкинге с ароматическими системами пуриновых фрагментов молекулы ДНК. Фенильный радикал расположен между пуринами в плоскости, параллельной их ароматическим системам. По-видимому, такое взаимодействие обусловлено тем, что кислота находится в рецептор-связывающем кармане, образованном топоизомеразой II и ДНК, в котором электронная плотность тестируемого соединения несколько смещена.

Таким образом, нами разработан оригинальный метод синтеза ранее неописанной (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты с высоким выходом и высокой стереоселективностью (>98%). Эта кислота оказывает выраженное ингибирующее действие на топоизомеразы I и II *in vitro*. Проведенное исследование позволило не только найти среди протестированных соединений активные ингибиторы топоизомераз I и II, но и выявить связь между их структурой и ингибирующей активностью. Результаты наших экспериментов показали, что (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновая кислота и (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновая кислота, взятые в субмикромольных концентрациях, способны ингибировать каталитическую активность топо I и топо II, где первое соединение является более сильным ингибитором ферментов. Результаты, полученные при изучении влияния кислот на электрофоретическую подвижность ДНК, свидетельствуют о том, что кислота **7** оказывает определенное влияние на подвижность ДНК, которое становится заметным при концентрациях 250 мкМ и выше. Механизм взаимодействия диеновых кислот с ферментами (топо I и топо II) до сих пор не совсем ясен. Предположительно, воздействие диеновых кислот может включать стабилизацию ковалентного комплекса ДНК с топо I, а также конкуренцию топоизомераз и диеновых кислот за места связывания ДНК.



#### 4. Исследование противоопухолевой активности наиболее перспективных производных 5Z,9Z-диеновых кислот *in vivo*

Из числа детально изученных *in vitro* двух кислот – (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновая кислота и (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновая кислота – показали высокую ингибирующую активность топоизомераз I (hTop1) и II (hTop2a) *in vitro*. Поэтому было принято решение о наработке указанных выше кислот и проведении дополнительных их испытаний *in vivo* с целью определения дозозависимой противоопухолевой активности производных природных 5Z,9Z-диеновых кислот при внутрижелудочном способе введения в ранние сроки после перевивки солидной злокачественной мышины лимфомы (RLS), резистентной к циклофосфану и злокачественной карциномы легких Льюис (LLC).

Перевивку клеток лимфомы RLS производили внутримышечно в объеме 500 кл. в 0,1 мл физиологического раствора 40 мышам-самкам СВА массой 25-30 г., содержащимся в условиях обычного вивария при естественном световом режиме, получавших стандартный корм и воду. Карцинома LLC, растущая в виде солидного узла, метастазирующая гематогенно в легкие, не подвергаясь спонтанной регрессии, была перевита мышам-самкам линии С57В1/6j массой 18-22 г., содержащимся в условиях обычного вивария при естественном световом режиме, путем внутримышечного введения суспензии опухолевых клеток в 0,1 мл физиологического раствора в количестве  $10^6$  кл. на мыш. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о гуманном обращении с лабораторными животными. Перевивочный материал взят из банка опухолевых штаммов Института цитологии и генетики СО РАН.

Исследования проводили с использованием двух групп мышей с RLS. В каждой группе было не менее 10 животных. Тестируемые соединения вводились внутрижелудочно 3 раза в день через день в виде раствора в подсолнечном масле, что обусловлено более легким прохождением подобных растворов через гистогематические барьеры в дозах 100 и 30 мг/кг (суммарные дозы, соответственно, 300 и 90 мг/кг). Группа мышей с опухолью, получавшая внутрижелудочно подсолнечное масло в эквивалентном объеме, являлась контрольной. Эталонной (референсной) группе животных вводили водный раствор паклитаксела однократно в дозе 30 мг/кг. После завершения перевивки, начиная через 2 дня после отмены испытуемого вещества и до начала гибели животных, в группах проводился анализ динамики роста опухолевых трансплантатов (с 11 по 18 день после перевивки).

Анализ динамики роста трансплантатов опухоли лимфомы в период с 11-го по 18-й день после перевивки показал постепенное усиление противоопухолевого эффекта у паклитаксела и у (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты (4б, В1). Если нивелировать разницу в размерах опухолевых узлов в каждой группе на 11-й день опыта, то в последующие дни их прирост у животных, которые получали паклитаксел и (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновую кислоту, был меньше, чем в контроле, как показано на графике (рисунок 7). Эти данные коррелируют с отмеченной выше тенденцией уменьшения размеров трансплантатов в этих же группах относительно таковых у контрольных животных.

Основываясь на данные полученные в результате экспериментов *in vivo* на группах мышей с RLS при изучении противоопухолевой активности 5Z,9Z-диеновых кислот установлено, что В1 при внутрижелудочном введении в масляном растворе не проявляет достоверный противоопухолевый эффект (в суммарных дозах 90 и 300 мг/кг). В заданных условиях у (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты выявлена лишь тенденция к задержке роста трансплантатов на 15-20% относительно контроля. Паклитаксел, вводимый внутривентриально в эффективной дозе 30 мг/кг, оказывает достоверный противоопухолевый эффект 25-30%. Выявлено, что (5Z,9Z)-

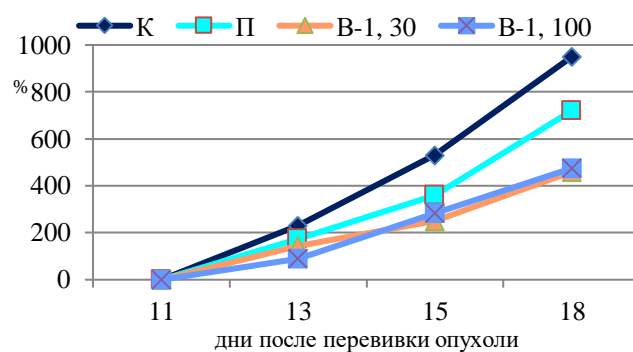


Рисунок 7 – Относительная скорость роста опухолевых узлов в период после отмены агентов (в % относительно размеров на 11-й день после перевивки), К – контроль; П – паклитаксел

эйкоза-5,9-диеновая кислота в дозах до 100 мг/кг обладает удовлетворительной переносимостью и не влияет на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

При исследовании карциномы легких Льюис (LLC) у мышей линии C57Bl/6j в результате экспериментов установлено, что внутрибрюшинное введение водной эмульсии (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты со второго по 9-й день после перевивки не оказывает противоопухолевого эффекта: через двое суток после отмены агента размеры опухолевых узлов не имели достоверных различий с контролем вне зависимости от дозы (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты. В последующие дни наблюдений разницы с контролем также не зафиксировано.

Однако, анализ показателей выживаемости выявил достоверное увеличение продолжительности жизни мышей под влиянием (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты в дозе 30 мг/кг относительно контрольной группы и мышей с введением паклитаксела. Наиболее эффективный референсный препарат – паклитаксел – проявил выраженную токсичность, вызвав существенную летальность у животных после повторного введения.

Согласно полученным нами данным на фоне внутрибрюшинного введения (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновая кислота с 11-го по 18-й дни у мышей наблюдалась достоверная задержка роста опухолевых узлов относительно контроля. Ингибирующее действие (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты имело более выраженный и устойчивый характер, чем у циклофосфана, который проявил недостоверный эффект (рисунок 8).

Таким образом, при внутрибрюшинном введении в период прогрессивного роста LLC (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновая кислота эффективно задерживает рост первичного узла, ингибируя деление клеток опухоли. Этот эффект имеет дозозависимый характер: с уменьшением дозы со 100 до 30 мг/кг противоопухолевое действие уменьшается.

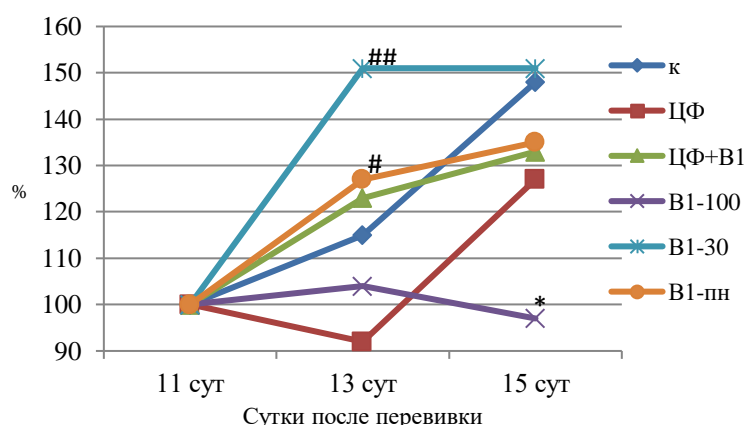


Рисунок 8 – Динамика роста трансплантатов LLC под влиянием различных режимов введения (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты, К- контроль; ЦФ – циклофосфан (50 мг/кг); В1 – (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты; ЦФ+В1 – циклофосфан (50 мг/кг)+ В1 (100 мг/кг); В1-100 (100 мг/кг); В1-30 (30 мг/кг); В1-пн (30 мг/кг перинодально)

На основании проведенного исследования можно заключить, что (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновая кислота обладает противоопухолевыми свойствами, которые проявляются при ее введении в относительно высоких дозах (в фазе прогрессии). Переносимость (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты животными при курсовом введении в диапазоне доз 30-100 мг/кг хорошая.

Основываясь на данные полученные в результате экспериментов *in vivo* на группах мышей с RLS, внутрибрюшинное введение мышам (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты (7, В2) через 5 дней после перевивки вызвало достоверную задержку роста опухолевых узлов к 10-му дню опыта. Средние размеры трансплантатов у опытных мышей были в 1,5 раз меньше, чем в контроле. Аналогичный эффект оказал противоопухолевый препарат доксорубин (рисунок 9). Повторное введение В2 через 12 дней после перевивки способствовало дальнейшему поддержанию его ингибирующего действия на опухолевые клетки. В эти сроки у В2 наблюдалось небольшое отставание от эффекта доксорубина (на 10%), хотя достоверных различий между размерами трансплантатов в опытной и референсной группой не было.

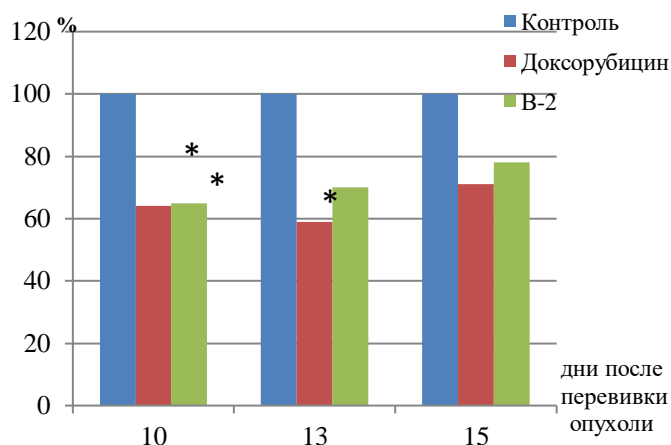


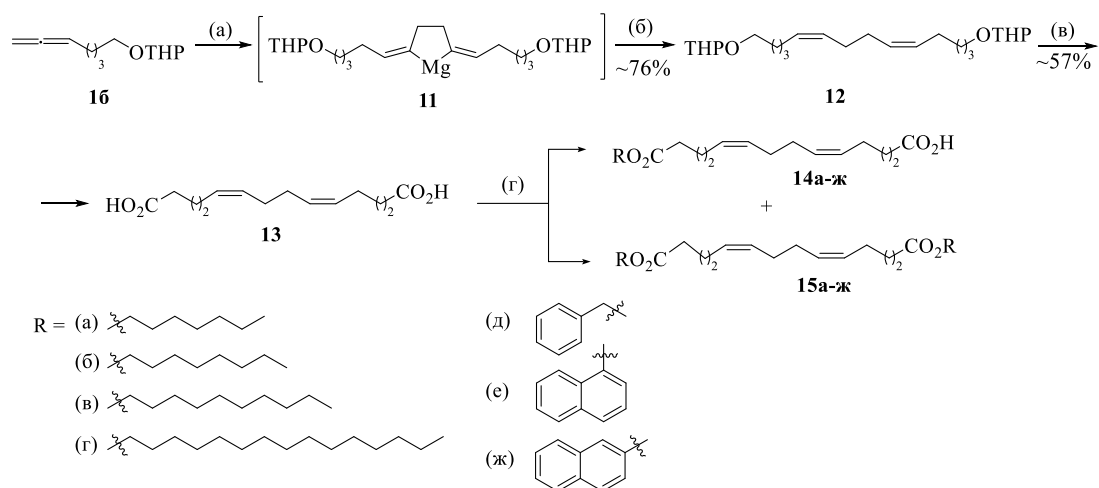
Рисунок 9 – Изменение размеров трансплантатов лимфомы RLS под действием (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты и доксорубицина относительно контроля

Опираясь на результаты проведенного исследования на группах мышей с RLS можно сделать вывод о том, что (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновая кислота обладает противоопухолевой активностью. Противоопухолевый эффект (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты, соответствует эффекту доксорубицина, при этом кислота оказывает менее выраженное токсическое действие на организм животных.

#### 5. Новые синтетические производные 5Z,9Z-диеновых кислот: стереоселективный синтез и изучение их противоопухолевой активности *in vitro*

На следующем этапе выполнения исследований, в рамках диссертационной работы, основываясь на полученные нами ранее экспериментальные результаты и на разработанный подход к получению 5Z,9Z-дикарбоновых кислот, осуществлен стереоселективный синтез синтетических аналогов природных 5Z,9Z-диеновых кислот, содержащих одновременно сложноэфирную группу, путем осуществления реакции этерификации алифатических и ароматических спиртов (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диеновой кислотой и алифатических и ароматических карбоновых кислот (5Z,9Z)-1,14-ундека-5,9-диендиолам.

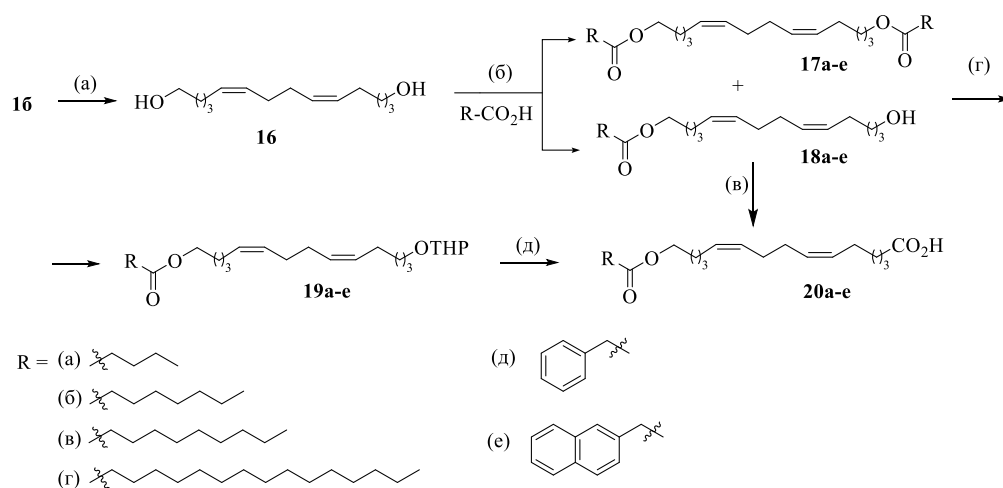
Опираясь на разработанную стратегию синтеза 5Z,9Z-диеновых кислот была проведена реакция гомо-цикломагнирования тетрагидропиранового эфира гепта-5,6-диен-1-ола **16** с использованием активированного металлического Mg и этилмагнийбромида. В качестве катализатора был использован  $\text{Cr}_2\text{TiCl}_2$  (5 мол.%). Кислотный гидролиз образующегося *in situ* магнезациклопентана **11** привел к образованию тетрагидропиранового эфира гепта-5,6-диен-1-ола **12**. Далее проводилось окисление **12** реагентом Джонса ( $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ ), что привело к образованию (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диендиеновой кислоты **13** (схема 5). При последующей каталитической этерификации алифатических и ароматических спиртов с (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диендиеновой кислотой **13** с помощью DCC/DMAP с выходом от ~69-81% образуются целевые 5Z,9Z-диеновые кислоты **14а-ж**, наряду с симметричными диэфирами **15а-ж**, выход которых не превышает 15% (схема 5).



**Реагенты и условия:** (а): EtMgBr, Mg, Cp<sub>2</sub>TiCl<sub>2</sub> (5 mol%), Et<sub>2</sub>O; (б): H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>; (в): H<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ацетон, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (г): DCC/DMAP.

Схема 5

В развитие этого подхода нами была разработана оригинальная схема синтеза 5*Z*,9*Z*-диеновых кислот, содержащих одновременно сложноэфирную группу, включающая на первом этапе этерификацию карбоновых кислот с (5*Z*,9*Z*)-1,14-ундека-5,9-диендиолом **16**, полученным снятием тетрагидропирановой защиты с эфира **12** с помощью *p*-TSA, CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH, с получением моно- **17а-е** и диэфиров **18а-е** диола **16** (схема б). В дальнейшем целевые кислоты **20а-е** могут быть получены двумя путями: 1) прямым окислением спиртов **18а-е** с помощью дихромата пиридиния (PDC) или 2) окислением тетрагидропирановых эфиров **19а-е** соответствующих спиртов **18а-е** реактивом Джонса (схема б). Показано, что несмотря на введение дополнительной стадии второй путь является более предпочтительным, так как позволяет синтезировать кислоты **20а-е** с конечным выходом 69%, образование кислот по первому пути идет не селективно с выходом порядка 40%.



**Реагенты и условия:** (а): *p*-TSA, CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH; (б): DCC/DMAP; (в): PDC; (г): 3,4-дигидро-2*H*-пиран, HCl; (д): H<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ацетон, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Схема 6

Разработанный подход позволил синтезировать ряд 5*Z*,9*Z*-диеновых кислот – аналогов ранее синтезированных кислот, отличающихся ориентацией карбоксильной группы.

В результате проведенного анализа по изучению противораковых свойств синтезированных 5*Z*,9*Z*-диеновых кислот *in vitro* в отношении линейных культур клеток различных видов лейкемии (Jurkat, HL-60, K562, U937) и нормальных фибробластах было обнаружено, что кислоты, полученные этерификацией (5*Z*,9*Z*)-1,14-тетрадека-5,9-диендиоловой кислоты с алифатическими и ароматическими спиртами, проявляют высокую цитотоксичность в отношении практически всех



наиболее частых видов лейкоemий. Активность эфиров ненасыщенных кислот заметно снижается при замене ароматических групп алифатическими, что может быть связано с дополнительными эффектами, обусловленными  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействием ароматического радикала с молекулярной мишенью (топоизомеразой), обнаруженными нами ранее для (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты. Также было показано, что увеличение количества метиленовых звеньев в алифатических спиртах приводит к стерическим затруднениям внедрения сложных эфиров в полость фермента.

Исследование цитотоксических свойств также показало, что кислоты, синтезированные по схеме б, обладают более высоким цитотоксическим действием, чем аналоги, однако, установленные ранее тенденции сохраняются.

Известно, что противоопухолевая активность ненасыщенных жирных кислот связана с ингибированием топоизомераз. Поэтому следующим этапом наших исследований было изучение ингибирующей активности синтезированных синтетических 5Z,9Z-диеновых кислот, проявивших наибольшую цитотоксическую активность в отношении топо I человека *in vitro*.

В результате было обнаружено, что увеличение концентрации диеновой кислоты от 0,025 мкМ до 0,125 мкМ (**20a**) или от 0,01 до 0,07 мкМ (**20д**) вызывает постепенное увеличение количества образующихся топоизомеров и уменьшение доли как суперспирализованной, так и открытой кольцевой формы ДНК, что свидетельствует об усилении релаксации, то есть увеличении активности топоизомеразы I при уменьшении концентрации ингибитора. В отсутствие фермента в образцах ДНК, содержащих соединения **20a** и **20д**, такого эффекта не продемонстрировано. Все соединения в интересующем диапазоне концентраций вели себя практически одинаково, ингибирование топоизомеразы I начиналось с концентраций выше 0,01 мкМ (**20д**).

Для исследования индукции апоптоза было выбрано два ведущих соединения (**20a** и **20д**), проявивших наибольшую цитотоксичность в отношении клеточных линий в культуре раковых клеток Jurkat. Наибольшее процентное содержание клеток Jurkat на стадии позднего апоптоза (93% и 83%) обнаружено при концентрациях соединения **20a** 0,2 и 0,1 мкМ, соответственно (рисунок 10, гистограммы 3 и 4). Соединение **20д** в концентрации 0,2 мкМ было несколько менее активным в отношении индукции апоптоза: процент позднего апоптоза клеток Jurkat составил около 76% (рисунок 10, гистограмма 5), что сопоставимо с действием камптотецина (рисунок 10, гистограмма 2).

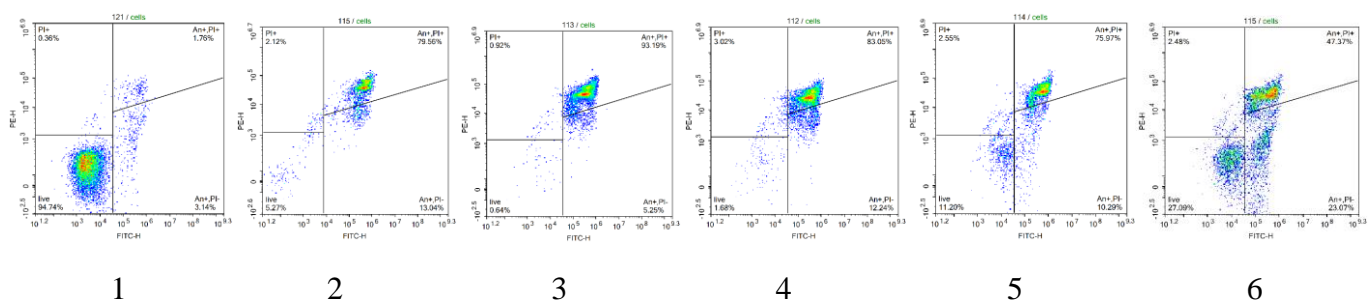


Рисунок 10 – Цитофлуориметрический анализ апоптоз-индуцирующей активности в раковых клетках Jurkat под действием соединений **20a**, **20д** и камптотецином: (1) контроль, (2) камптотецин, (3) **20a** (0.2 мкМ), (4) **20a** (0.1 мкМ), (5) **20д** (0.2 мкМ), (6) **20д** (0.1 мкМ). Статистически значимые отличия от значений в контроле показаны \*\*\*( $p < 0.001$ ).

Онкогенная трансформация клеток сопровождается нарушением программы контроля целостности генома, что проявляется, в частности, в потере способности трансформированных клеток блокировать пролиферацию после повреждения ДНК. Клетки, которые не могут остановить клеточный цикл для устранения повреждений, либо запускают программу апоптоза, либо размножаются с генетическими дефектами, тем самым увеличивая генетическую нестабильность популяции. Из многочисленных исследований известно, что повреждение клеточной ДНК останавливает клеточный цикл в контрольных точках.

Нами было изучено влияние соединений **20a** и **20д** на характер распределения клеток по фазам клеточного цикла опухолевой культуры Jurkat (рисунок 11). В зависимости

от концентрации, соединения вызывали однотипные изменения в характере распределения клеток по фазам цикла. Показатели клеточного цикла, обработанных соединениями **20a** и **20д**, характеризовались значительным преобладанием клеток, находящихся в фазе G<sub>0</sub> (интервал sub-G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>), выраженным уменьшением популяции G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> и наличием накопления клеток в S-фазе.

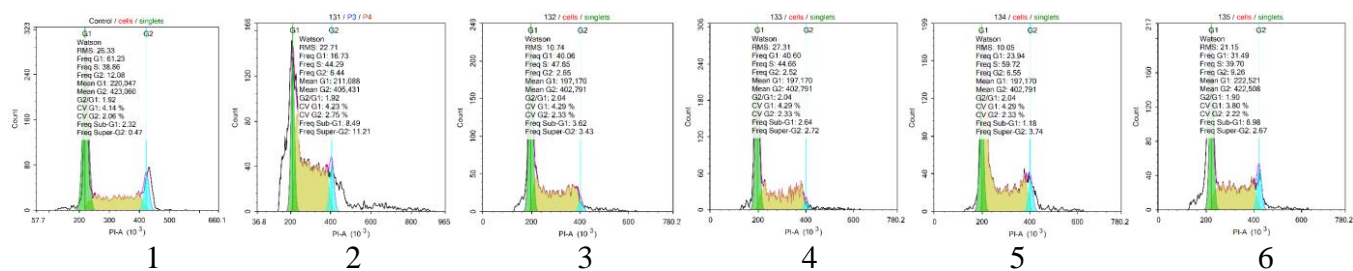


Рисунок 11 – Фазы клеточного цикла клеток Jurkat, обработанных соединениями **20a**, **20д** и камптотечином: (1) контроль, (2) камптотечин, (3) **20a** (0.2 мкМ), (4) **20a** (0.1 мкМ), (5) **20д** (0.2 мкМ), (6) **20д** (0.1 мкМ). Статистически значимые отличия от значений в контроле показаны \*\*\*( $p < 0.001$ ).

Исследование продемонстрировало наличие пика гиподиплоидной ДНК (рисунок 11, гистограммы 3 и 6), что указывает на неспособность остановить цикл деления в контрольных точках, которое в конечном итоге приводит к гибели клеток. Действие соединений **20a** и **20д** на клетки Jurkat отличается от действия камптотечина более выраженной блокировкой S-фазы (рисунок 11, гистограммы 3, 4, 5 и 6). Таким образом, соединения **20a** и **20д** останавливают клеточный цикл в S-фазе.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о высоком противоопухолевом потенциале исследуемых (5Z,9Z)-диеновых кислот.

В развитие наших исследований также была изучена активация и ингибирование наиболее универсальных внутриклеточных сигнальных путей, отвечающих за пролиферацию клеток и инициацию апоптоза в опухолевых клетках Jurkat после обработки соответствующими синтезированными диеновыми кислотами **20a** и **20д** посредством мультиплексного анализа по технологии Luminex xMAP. Были проанализированные белки, составляющих фосфорилированную и нефосфорилированную фракции 9 основных киназ в сигнальных путях: экспрессия CREB, JNK, NFκB, p38, ERK1/2, Akt, p70S6K, STAT3, STAT5 и фосфорилированных ERK/MAP kinase (Thr185/Tyr187), Akt (Ser473), STAT3 (Ser727), JNK (Thr183/Tyr185), p70 S6 kinase (Thr412), NFκB (Ser536), STAT5A/B (Tyr694/699), CREB (Ser133), и p38 (Thr180/Tyr182) белков в 6 образцах лизатов клеток опухолевой линии Jurkat.

Исходя из попарного сравнения фосфорилированной и нефосфорилированной фракции киназ основные изменения соотношения этих двух фракций выражены для сигнальных путей Akt, p70S6K, ERK1/2, NfκB и CREB.

Результаты исследования показали, что соединения **20a** и **20д** действуют схоже и наиболее выраженно снижают все виды киназных белков в опухолевой клетке в концентрации даже 0.5 μM, что влияет на количество фосфорилированных форм различных киназ по сравнению с контролем. Под воздействием соединений **20a** и **20д** наиболее выраженно подавлена выработка p38, Akt и CREB.

Таким образом, соединения **20a** и **20д** действуют схоже на белковый профиль исследуемых сигнальных путей опухолевых клеток Jurkat, подавляя основные сигнальные пути, ответственные за рост и дифференцировку клеток. Как классические цитостатики, являющиеся ингибиторами топоизомеразы I, данные вещества имеют большой потенциал в качестве противоопухолевых соединений.

## Заключение

В рамках диссертационной работы выполнена запланированная программа ориентированных фундаментальных исследований, посвященных разработке эффективного, универсального и перспективного метода синтеза природных и синтетических стереоизомерно чистых nZ(n+4)Z-

диеновых кислот, а также их производных, получение которых основано на применении оригинальной реакции перекрестного каталитического межмолекулярного цикломагнирования алифатических и функциональнозамещенных терминальных алленов с помощью доступных реактивов Гриньяра под действием комплексного катализатора на основе Ti.

Важное прикладное значение имеют исследования направленные на изучение способности ингибирования 5Z,9Z-диеновых кислот топоизомераз I (hTop1) и II (hTop2 $\alpha$ ) *in vitro*. Выявлена закономерность влияния структуры 5Z,9Z-диеновых кислот на проявляемую ими активность. Определены вероятные механизмы действия исследуемых соединений на топоизомеразу.

К числу значимых достижений диссертационной работы следует отнести эксперименты по изучению противоопухолевой активности синтезированных соединений *in vivo*.

На основании результатов можно сделать вывод о том, что 5Z,9Z-диеновые кислоты являются крайне перспективной группой соединений для дальнейшего исследования и открывают новые возможности для формирования на их основе современных, малотоксичных, терапевтически-эффективных противоопухолевых лекарственных препаратов избирательного действия.

### Основные результаты и выводы

1. Выполнена программа ориентированных фундаментальных исследований, посвященных разработке эффективного, универсального и перспективного для применения в практике медицинской и органической химии метода синтеза природных и синтетических стереоизомерно чистых nZ(n+4)Z-диеновых кислот, получение которых основано на применении оригинальной реакции перекрестного каталитического межмолекулярного цикломагнирования алифатических и функционально замещенных терминальных алленов с помощью доступных реактивов Гриньяра под действием комплексного катализатора на основе Ti. Метод характеризуется высокой стереоселективностью (>98%) и высокими выходами целевых продуктов реакции (61-72%).

2. Разработанные препаративные методы получения nZ(n+4)Z-диеновых кислот использованы в синтезе линеек природных и ранее неописанных жирных кислот с различным расположением 1Z,5Z-диеновой группировки относительно карбоксильной группы в мультиграммовых количествах, что позволило изучить закономерности влияния структуры синтезированных ненасыщенных стереоизомерно чистых nZ(n+4)Z-диеновых кислот на проявляемую ими активность ингибирования по отношению к топоизомеразе I (hTop1) и II (hTop2 $\alpha$ ). Обнаружено, что существенное влияние на активность ингибирования оказывает расположение 1Z,5Z-диеновой группировки относительно карбоксильной группы. Одновременно показано, что 5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновая кислота проявляет высокую ингибирующую активность топоизомераз I (hTop1) и II (hTop2 $\alpha$ ) *in vitro*. Изучена цитотоксическая активность указанного соединения в отношении опухолевых клеточных культур HL-60 и K562. Показано, что 5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновая кислота эффективно подавляет рост клеток линии K562 в сравнении с камптотецином и этопозидом (IC<sub>50</sub>=0.27 $\pm$ 0.015мкМ).

3. Взаимодействием алифатических 1,2-диенов с алленами, содержащими терминальный 1,3-диоксолановый фрагмент в реакции кросс-цикломагнирования на ключевой стадии синтеза, через промежуточное образование альдегида, разработан альтернативный способ стереоселективного синтеза 5Z,9Z-диеновых кислот с выходом от ~70-80%. Разработанный метод синтеза открывает простой путь к получению триеновых и полиеновых кислот.

4. Разработан оригинальный метод синтеза неописанной ранее в литературе (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты. Показано, что (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновая кислота проявляет выраженную активность в ингибировании топоизомераз I и II *in vitro*. Выявлен положительный эффект введения электронодонорного фенильного радикала в структуру 5Z,9Z-диеновых кислот, заключающийся в увеличении степени ингибирования топоизомеразы I и II. Исследованиями *in silico* показано, что замена алкильной цепочки в молекуле 5Z,9Z-диеновой кислоты на фенильный радикал приводит к тому, что процесс ингибирования может носить двойственный характер, т.е. происходить по специфическому и неспецифическому механизму ингибирования.

5. Определена дозозависимая противоопухолевая активности 5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновой и (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислот – наиболее перспективных производных природных 5Z,9Z-диеновых кислот, проявивших высокую активность ингибирования топоизомераз I/II, в экспериментах *in vivo* на мышах с перевитой злокачественной карциномой легких Льюис (LLC) и солидной злокачественной мышинной лимфомой (RLS). Выявлено достоверное увеличение продолжительности жизни мышей с LLC под влиянием (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты.

6. Впервые получены синтетические аналоги природных 5Z,9Z-диеновых кислот, содержащие в своей структуре алифатический и ароматический фрагменты, путем осуществления реакции этерификации (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диовой кислоты алифатическими и ароматическими спиртами и алифатических и ароматических карбоновых кислот с (5Z,9Z)-1,14-ундека-5,9-диендиолом. Установлено, что синтезированные сложные эфиры ненасыщенных 5Z,9Z-диеновых кислот проявляют высокий цитотоксический эффект в отношении ряда раковых и нормальных клеточных линий (Jurkat, HL-60, K562, U937, Fibroblasts), индуцируя гибель клеток через апоптоз, вызывая арест клеточного цикла в фазе G1/S. Также показано, что синтезированные соединения проявляют ингибирующую активность по отношению к ферменту топоизомеразе I. Установлено, что 5Z,9Z-диеновые кислоты значимо меняют белковый профиль основных 9 киназ опухолевых клеток Jurkat, подавляя сигнальные пути, ответственные за рост и пролиферацию клетки, в сторону ингибирования роста и подавления пролиферации.

7. Установлено, что цитотоксическая активность сложных эфиров ненасыщенных 5Z,9Z-диеновых кислот заметно снижается при замене ароматических радикалов на алифатические, а также при увеличении длины алифатического радикала. Уменьшение активности, вероятно, обусловлено дополнительными эффектами благодаря р-р-взаимодействию ароматического радикала с молекулярной мишенью (топоизомеразой), обнаруженными нами ранее для (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты. Также показано, что с увеличением количества метиленовых звеньев в алифатических спиртах вследствие стерических факторов, возникают препятствия для включения исследуемых эфиров в полость фермента вследствие стерических факторов.

#### Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. D'yakonov, V.A. Stereoselective synthesis of 11-Phenylundeca-5Z,9Z-dienoic acid and investigation of its human topoisomerase I and II $\alpha$  inhibitory activity / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, **A.R. Mulyukova**, D.S. Baev, E.K. Khusnutdinova, T.G. Tolstikova, U.M. Dzhemilev // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2015. – V.25(11). – P. 2405–2408.

2. D'yakonov, V.A. 11-Phenylundeca-5Z,9Z-dienoic acid: stereoselective synthesis and dual topoisomerase I/II $\alpha$  inhibition / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, **A.R. Mulyukova**, D.S. Baev, E.K. Khusnutdinova, T.G. Tolstikova, U.M. Dzhemilev // Current Cancer Drug Targets. – 2015. – V.15(6). – P. 504-510.

3. D'yakonov, V.A. Catalytic cyclometallation in steroid chemistry III: Synthesis of steroidal derivatives of 5Z,9Z-dienoic acid and their human topoisomerase I inhibitory activity / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, R.A. Tuktarova, A.A. Makarov, I.I. Islamov, **A.R. Mulyukova**, U.M. Dzhemilev // Steroids. – 2015. – V.102. – P. 110-117.

4. Дьяконов, В.А. Синтез и превращения металлациклов. Сообщение 46. Перекрестное цикломагнирование 1,2-диенов в синтезе 5Z,9Z-диеновых кислот - эффективных ингибиторов топоизомеразы I / В.А. Дьяконов, Л.У. Джемилева, А.А. Макаров, **А.Р. Мулюкова**, Р.А. Туктарова, И.И. Исламов, У.М. Джемилев // Известия АН, Серия химическая. – 2015. – №9. – 2135-2140.

5. D'yakonov, V.A. nZ,(n+4)Z-dienoic fatty acids: a new method for the synthesis and inhibitory action on topoisomerase I and II $\alpha$  / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, **A.R. Mulyukova**, D.S. Baev, E.K. Khusnutdinova, T.G. Tolstikova, U.M. Dzhemilev // Medicinal Chemistry Research. – 2016. – V.25(1). – P. 30-39.

6. D'yakonov, V.A. A new stereoselective synthesis of biologically active di- and trienoic acids containing a 1Z,5Z-diene moiety / V.A. D'yakonov, A.A. Makarov, **A.R. Salimova**, E.N. Andreev, U.M. Dzhemilev // Mendeleev Communications. – 2017. – V.27. – P. 234-236.

7. Makarov, A.A. New Synthetic Analogs of Natural 5Z,9Z-Dienoic Acids: Stereoselective Synthesis and Study of the Anticancer Activity / A.A. Makarov, L.U. Dzhemileva, **A.R. Salimova**, E.Kh. Makarova, I.R. Ramazanov, V.A. D'yakonov, U.M. Dzhemilev // Bioorganic Chemistry. – 2020. – V.104. – P.104303.

8. D'yakonov, V.A. Natural and Synthesis nZ,(n+4)Z-Dienoic Fatty Acids: A New Method for the Synthesis and Inhibitory Action on Topoisomerase I and II $\alpha$  / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A.Makarov, **A.R. Mulyukova**, U.M. Dzhemilev // MedChem. – Novosibirsk, 2015. P.170.

9. D'yakonov, V.A. Stereoselective Synthesis of 11-Phenylundeca-5Z,9Z-dienoic Acid and Investigation of Its Human Topoisomerase I and II $\alpha$  Inhibitory Activity / / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, **A.R. Mulyukova**, U.M. Dzhemilev // MedChem. – Novosibirsk, 2015. – P.171.

10. Дьяконов, В.А. Высшие nZ,(n+4)Z-диеновые кислоты: новый метод синтеза и ингибирующая активность по отношению к человеческим топоизомеразам I и II $\alpha$  / В.А. Дьяконов, Л.У. Джемилева, А.А. Макаров, **А.Р. Мулюкова**, У.М. Джемилев // Второй Международный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии. – Крым, 2015 – 2015. – С.85.

11. Дьяконов, В.А. Новое поколение малотоксичных таргетных противоопухолевых препаратов на основе природных и синтетических 5Z,9Z-диеновых кислот / В.А. Дьяконов, А.А. Макаров, Р.А. Туктарова, Л.У. Джемилева, М.М. Юнусбаева, **А.Р. Салимова**, С.Р. Ишмухаметова, У.М. Джемилев // Научная конференция грантодержателей РФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века». – Москва, 2016 – С.132

12. Дьяконов, В.А. 5Z,9Z-Диеновые кислоты: стереоселективный синтез и противоопухолевая активность / В.А. Дьяконов, Л.У. Джемилева, А.А. Макаров, **А.Р. Салимова**, Р.А. Туктарова, У.М. Джемилев // XX-Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – Екатеринбург, 2016. – С.593

13. Дьяконов, В.А. Природные и синтетические 5Z,9Z-диеновые кислоты: стереоселективный синтез и противоопухолевая активность / В. А. Дьяконов, Л.У. Джемилева, Р.А. Туктарова, А.А. Макаров, М.М. Юнусбаева, **А.Р. Салимова**, С.Р. Ишмухаметова и У.М. Джемилев // Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии» – Новосибирск, 2017. – С.74.