

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Институт нефтехимии и катализа – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук (ИНК УФИЦ РАН)

На правах рукописи



Салимова Альфия Раисовна

**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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, доцент,
профессор РАН
Дьяконов Владимир Анатольевич

Научный консультант:
доктор медицинских наук, доцент
Джемилева Лиля Усеиновна

Уфа – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. Успехи в химии природных и полусинтетических ингибиторов топоизомеразы I/II	14
1.1 ДНК-топоизомеразы I и II человека.....	14
1.2 Алкалоиды	16
1.2.1 Камптотецин, его производные и аналоги.....	16
1.3 Флавоноиды.....	28
1.4 Тритерпены.....	34
1.5 Хиноны и нафтохиноны.....	37
1.6 Фенолы и полифенолы.....	41
1.7 Эпиподофиллотоксины.....	43
1.8 Жирные кислоты	44
1.9 Заключение по литературному обзору.....	50
ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	53
2.1 Разработка общего стереоселективного метода синтеза природных и синтетических высших nZ,(n+4)Z-диеновых кислот и изучение активности ингибирования человеческих топоизомераз I/IIa <i>in vitro</i>	53
2.2 Стереоселективный синтез (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты и исследование ее ингибирующей активности в отношении топоизомеразы I и IIa человека	61
2.3 Альтернативные методы синтеза природных 5Z,9Z-диеновых кислот	72
2.4 Исследование противоопухолевой активности наиболее перспективных производных 5Z,9Z-диеновых кислот <i>in vivo</i>	74

2.5 Новые синтетические производные 5Z,9Z-диеновых кислот: стереоселективный синтез и изучение их противоопухолевой активности <i>in vitro</i>	83
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	138
ВЫВОДЫ	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	142

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

BDMC – бисдиметоксикуркумин

sEPA – конъюгированная эйкозапентаеновая кислота

CH₃OH – метанол

CHCl₃ – хлороформ

COSY – гомоядерная корреляционная спектроскопия

Cr₂TiCl₂ – дихлорид титаноцена

CPT – камптотецин

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DCC – N,N-дициклогексилкарбодимид

DMAP – 4-диметиламинопиридин

DMC – диметоксикуркумин

EGCG – эпигаллокатехин-3-галлат

EtMgBr – этилмагнийбромид

H460 – клеточная линия карциномы легких человека

HeLa – клеточная линия карциномы шейки матки человека

HL-60 – клеточная линия промиелоцитарной лейкемии

HMBC – гетероядерная корреляционная спектроскопия через несколько связей

HSQC – гетероядерная корреляционная спектроскопия

hTop1 – топоизомераза I

hTop2 α – топоизомераза II α

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

Jurkat – клеточная линия T-лимфобластной лейкемии человека

K562 – клеточная линия хронической миелогенной лейкемии человека

LLC – карцинома легких Льюиса

MIC – минимальная ингибирующая концентрация

NOESY – спектроскопия на основе эффекта Оверхаузера

p-TSA – п-Толуолсульфоновая кислота

RLS – злокачественная мышечная лимфома

RTCA – анализ клеточных взаимодействий или реакций в реальном времени

Торо I – топоизомераза I

Торо II – топоизомераза II

TU100 – 12,13-дигидро-N-метил-6,11,13-триоксо-5H-бензо[4,5]циклогепта [1,2-b]
нафталин-5,12-имин

U-937 – клеточная линия гистиоцитарной лимфомы человека

A549 – клеточная линия рака лёгких человека

АТФ – аденозинтрифосфат

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК – оптическая спектроскопия в инфракрасной области

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

Топо I – топоизомераза I

Топо II – топоизомераза II

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

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 определенные 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 исследования. В мировой литературе накоплен обширный материал, касающийся изучения ингибирующей активности различных классов природных и синтетических соединений по отношению к топоизомеразам I и II человека. Кроме того, уже сейчас 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.

В литературе имеется достаточно большое количество публикаций о жирных кислотах, проявляющих ингибирующую активность в отношении топоизомераз I и II. Показано, что насыщенные жирные кислоты (C6-C22) не активны в отношении топоизомеразы I, в отличие от ненасыщенных кислот (C16-C21), содержащих в своей структуре одну *цис*-двойную связь, проявляющих высокую ингибирующую активность в отношении данного энзима.

Важной и крайне интересной группой липидов, проявляющих широкий и разнообразный спектр биологических активностей, являются 5Z,9Z-диеновые кислоты. Установлено, что длинноцепочечные 5Z,9Z-диеновые кислоты (C20-C30) наиболее известны как ингибиторы топоизомеразы I. Кислоты с более короткой

углеводородной цепью (C16-C19) обладают антибактериальной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов, и достаточно слабо ингибируют топоизомеразу I. Исходя из того, что жирные 5Z,9Z-диеновые кислоты проявляют достаточно широкий спектр биоцидной активности, а именно противомаларийное, противомикробное и противовирусное действие, а также имеющие достаточно низкую токсичность в отношении эукариотических клеток, данный класс соединений является очень перспективным в плане разработки различных лекарственных субстанций.

Однако, существует ряд труднопреодолимых проблем для дальнейшего всестороннего изучения данного класса соединений – во-первых, это отсутствие эффективных и универсальных синтетических подходов для синтеза этих соединений. Во-вторых, известные на сегодняшний день методы их синтеза многостадийны и трудоемки (6–20 стадий), а выходы целевого продукта не превышают 0.5–15%. В-третьих, большинство реакций сопровождается 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 комплексного катализатора на основе Ti.

Задачи исследования:

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 (61-72%) и селективностью (>98%), основанный на применении новой реакции перекрестного межмолекулярного цикломагнирования терминальных алифатических и O-содержащих 1,2-диенов с помощью реактивов Гриньяра под действием катализатора Cr_2TiCl_2 .

Разработаны альтернативные методы синтеза природных nZ(n+4)Z-диеновых кислот. Показано, что в реакцию кросс-цикомагнирования вступают не только пирановые эфиры 1,2-диенов, но и 1,2-диены, содержащие диоксолановый фрагмент.

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 в отношении 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 эффективный малостадийный метод синтеза аналогов природных 5Z,9Z-диеновых кислот, позволяющий получать целевой продукт с высокой стереорегиоселективностью, 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 ценность работы. Выполнена широкая 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). Разработан новый метод синтеза синтетических аналогов природных 5Z,9Z-диеновых кислот, содержащих в своей структуре сложноэфирную группировку.

4) 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 апробации результатов. 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 структуры 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 конференциях.

Объём и структура 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, 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 Тостиковой Т.Г. за проведение исследований биологической активности синтезированных соединений на линейных животных.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Успехи в химии природных и полусинтетических ингибиторов топоизомеразы I/II

1.1 ДНК-топоизомеразы I и II человека

Топоизомеразы – группа ДНК-модифицирующих ферментов, которые регулируют основные процессы жизнедеятельности клеток, такие как транскрипция, репликация, митоз, репарация нуклеиновых кислот. Данный класс ферментов способен релаксировать суперспирализованные (суперскрученные) молекулы ДНК путём введения одно- или двуцепочечных разрывов с последующим лигированием (восстановлением), то есть контролировать уровень суперскрученности ДНК во время различных клеточных процессов. Топоизомеразы присутствуют во всех эукариотических и прокариотических клетках, а также в некоторых вирусах. Топоизомеразы способны регулировать процессы, которые необходимы для жизнедеятельности опухолевой клетки. Поэтому вполне обоснованно рассматривать данный фермент в качестве внутриклеточной молекулярной мишени для воздействия различных препаратов, используемых в противоопухолевой терапии. В действительности многие низкомолекулярные химические соединения, проникая в ядра клеток, могут взаимодействовать как с ДНК, так и с ДНК-зависимыми ферментами. В результате такого взаимодействия происходит нарушение структуры и функции ДНК, вносятся изменения в локальную конформацию биологических макромолекул, происходит разрыв нитей ДНК и нарушение матричного синтеза. В ответ на повреждения ДНК нарушается клеточный цикл и жизнеспособность клетки. В результате достигается терапевтический эффект – задержка пролиферации и/или гибель опухолевой клетки.

В зависимости от механизма действия фермента все топоизомеразы подразделяются на два основных типа: 1) топоизомеразы I типа – вносят одноцепочечные разрывы в ДНК; 2) топоизомеразы II типа – вносят двуцепочечные разрывы в ДНК. В зависимости от того, как фермент связывается с ДНК

топоизомеразы I типа подразделяются на два подтипа: 1) топоизомеразы I α – фермент образует связь с 5'-концом ДНК и 2) топоизомеразы I β – фермент образует связь с 3'-концом ДНК [1]. Топоизомеразы II типа еще недавно не подразделяли на подтипы. Однако в результате идентификации топоизомеразы II в археобактериях *S. Shibatae* [2] обнаружено, что структура данного фермента отличается от всех ранее известных топоизомераз II-го типа. Поэтому с недавнего времени все топоизомеразы II-го типа подразделяются на два основных подтипа: топоизомеразы II β – топоизомеразы II археобактерии *S. Shibatae* и топоизомеразы II α – все остальные топоизомеразы II.

Топоизомераза I была открыта в 1969 г. В настоящее время топоизомеразы типа I найдены почти во всех классах живых организмов [3].

Топоизомераза I высокоизбирательна к субстрату – в частности, важны особенности первичной структуры и вариабельность конформации ДНК. Топоизомеразы первого типа осуществляют реакцию релаксации ДНК двумя возможными механизмами: 1) механизм свободного вращения ДНК и 2) механизм пропускания цепи через образующийся разрыв [4].

Топоизомераза II обеспечивает конденсацию и сегрегацию хромосом в митозе, поэтому клетки, в которых этот фермент ингибирован, нежизнеспособны. В клетках человека имеются две изоформы топоизомеразы II (II α и II β). Активность топоизомеразы II α возрастает в пролиферирующих клетках и максимальна в S-фазе клеточного цикла – об этом свидетельствует прекращение репликации при фармакологическом ингибировании этого фермента. Подобно топоизомеразе I, топоизомераза II образует переходный комплекс с участком ДНК и вызывает разрыв двунитевой ДНК, который лигируется ферментом, что восстанавливает целостность макромолекулы и изменяет ее конформацию [5].

Таким образом, исследование механизмов действия ферментов топоизомеризации ДНК, а также их ингибиторов, играют важную роль для дальнейшего развития молекулярной биологии и биомедицины. Понимание механизмов их функционирования имеет большое значение для фундаментальной науки, так как данные ферменты обеспечивают упорядоченное хранение и

правильную передачу генетической информации в живой клетке последующим поколениям. К тому же, избирательное регулирование активности фермента топоизомеразы с помощью ингибиторов различного действия является одним из ключевых способов терапии раковых заболеваний.

Приведенные выше данные о топоизомеразах как перспективных внутриклеточных мишенях химиотерапевтических препаратов, свидетельствуют о важности и высокой перспективности исследований, связанных с поиском новых ингибиторов указанных ферментов с целью создания на их основе эффективных противоопухолевых и антибактериальных препаратов.

1.2 Алкалоиды

1.2.1 Камптотецин, его производные и аналоги

Камптотецин – выделен из коры и стебля *Camptotheca acuminata* (Дерево жизни) – небольшого реликтового дерева, произрастающего в Китае [6]. В 1985 году группой исследователей из Китая было показано, что камптотецин проявляет противоопухолевую активность. Соединение показало высокую эффективность при лечении экспериментальной лейкемии у лабораторных мышей. В дальнейшем в результате клинических исследований, было установлено, что молекулярной мишенью камптотецина является фермент топоизомеразы I. Соединение является специфическим ингибитором топоизомеразы I, стабилизирующим ковалентный комплекс ДНК и топоизомеразы [7].

Камптотецин имеет уникальную пентациклическую структуру с пирроло[3,4-*b*]хинолиновым ядром, аннелированным с 2-пиридоновым циклом. Возможность образования двух форм – лактонной (активная форма) и карбоксильной (неактивная форма), обуславливает зависимость его фармакологической активности от pH среды (схема 1.1) [8].

Камптотецин, а также его производные взаимодействуют с ДНК и с ферментом топоизомеразой. В результате данного взаимодействия осуществляется формирование ковалентного комплекса ДНК – топоизомераза и

происходит его стабилизация. Повторное лигирование ДНК становится невозможным, так как происходит блокировка восстановления целостности ДНК и образование нерепарированных разрывов, что приводит к повреждению ДНК и инициации апоптоза клетки [9].

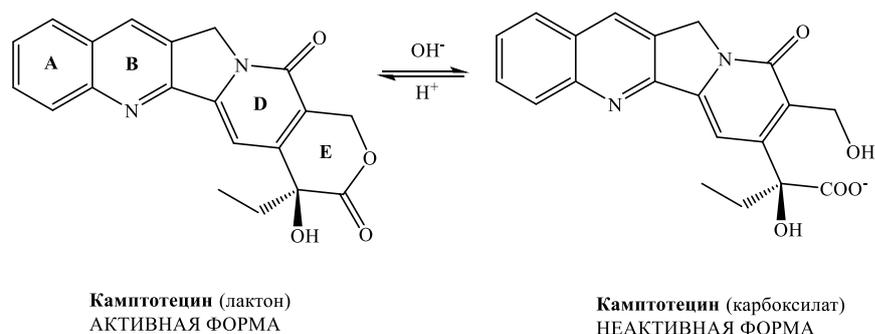


Схема 1.1 – Равновесие между активной лактонной формой камптотецина и его неактивным карбоксилатным производным

В молекуле камптотецина α -гидроксилактонный фрагмент (цикл E), имеющий один хиральный центр S-конфигурации в 20 положении, является наиболее важной частью, обеспечивающей взаимодействие по трем позициям с ферментом (рисунок 1.1). Гидроксильная группа в 20-м положении образует водородную связь с боковой цепью остатка Asp533 фермента. Другие два атома кислорода лактонного цикла связаны водородными связями с гуанидиновой группой Arg364. Карбонильная группа кольца D в 17-ой позиции взаимодействует с аминогруппой пиримидинового цикла посредством водородной связи, обеспечивая контакт камптотецина с цитозином на нерасщепленной нити ДНК, стабилизируя комплекс ДНК-Торо I [10].

Цитотоксичность СРТ также обусловлена преобразованием однонитевых разрывов ДНК в двухнитевые во время S-фазы клеточного цикла, когда комплексы, образованные топоизомеразой I, камптотецином и ДНК, препятствуют продвижению репликационной вилки [11–13].

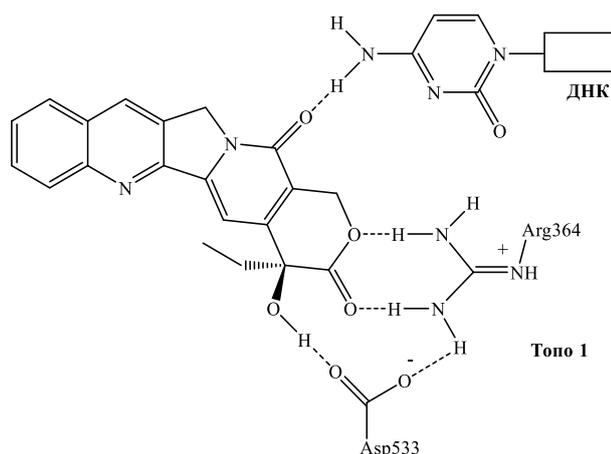


Рисунок 1.1 – Структура комплекса топоизомеразы-камптотецин-ДНК

Крайне плохая растворимость в воде, высокая токсичность и сложность извлечения из биологического сырья – основные сдерживающие факторы, ограничивающие широкое применение камптотецина в медицинской практике в качестве противоопухолевого препарата. В связи с вышеизложенным, наряду с изучением особенностей действия СРТ, группами исследователей ведется активный поиск и отбор синтетических аналогов камптотецина с более высокой гидрофильностью и обладающих минимальными побочными эффектами [14-17].

В 1996 г. Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США были одобрены водорастворимые синтетические аналоги – топотекан и иринотекан, применяемые при лечении рака яичника и метастатического рака толстой и прямой кишки. В группу камптотецинов второго поколения также входят 9-аминокамптотецин (9AC), 9-нитрокамптотецин (9NC) (рубитекан), и соединение GG211 (7-(4-метилпиперазино-метил)-10,11-этилендиоксикамптотецин), которые также проявили высокую эффективность в лечении различных видов рака.

Производные камптотецина и гомакамптотецина – луртотекан, гиматекан, протекан, каренитецин, силатекан, дифломотекан и другие находятся на II/III стадиях предклинических испытаний.

Еще одним важным ограничением, сдерживающим применение камптотецина, является его быстрая и спонтанная инактивация (в течение нескольких минут) из-за раскрытия кольца E (схема 1.1) в комплексе, образованном топоизомеразой I, камптотецином и ДНК. Хотя, эта реакция является обратимой,

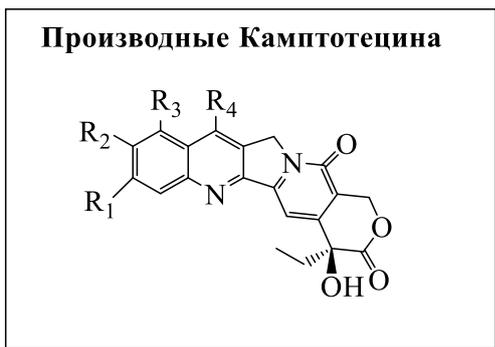
потенциально её равновесие сдвинуто в сторону карбоксилата при физиологическом нейтральном рН. Кроме того, активные производные лактона быстро инактивируются в крови за счет взаимодействия карбоксилатов с сывороточным альбумином [18]. В настоящее время для преодоления указанной выше проблемы используются следующие подходы:

– в рамках первого подхода проводят расширение кольца E на один атом углерода, который, с одной стороны, ограничивает способность раскрытия кольца E, и одновременно делает невозможным повторное замыкание цикла после его раскрытия [19,20]. Синтетические соединения указанной структуры называются гомокамптотецины. Гомокамптотецин – дифломотекан (BN80915) в настоящее время проходит вторую фазу предклинических испытаний (рисунок 1.2) [21, 22]. Существенным недостатком такого подхода является то, что полученные производные также инактивируются при необратимом раскрытии кольца E [23].

– в рамках другого подхода, с целью стабилизации кольца E, проводят его трансформацию из 6-ти в 5-членный цикл (рисунок 1.2). В результате синтеза α -кетопроизводных, на примере соединения S39625 [24], достигнута полная стабилизация кольца E [25]. Эти эксперименты являются еще одним доказательством того, что раскрытие E-лактонного цикла не является необходимым условием для связывания Top1 с производными СРТ. Соединение S39625 находится на стадии рассмотрения для последующих предклинических испытаний.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что к настоящему времени сделан существенный прорыв в синтезе и направленной модификации СРТ с целью синтеза эффективных специфических ингибиторов топоизомеразы I и разработке на их основе современных противоопухолевых препаратов.

Производные Камптотецина



$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$ (**Камптотецин**)

$R_1 = R_4 = H, R_2 = OH, R_3 = -CH_2-NMe$ (**Топотекан**)

$R_1 = R_3 = H, R_2 = -\text{CO}-\text{N}(\text{piperidine})-\text{N}(\text{piperidine}), R_4 = Et$ (**Иринотекан**)

$R_1 = R_3 = H, R_2 = OH, R_4 = Et$ (**SN-38**)

$R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = NH_2$ (**9-Амино СРТ**)

$R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = NO_2$ (**Рубитекан**)

$R_1 = R_2 = R_3 = H, R_4 = -\text{N}(\text{O})-\text{C}(\text{C})_3$ (**Гиматекан**)

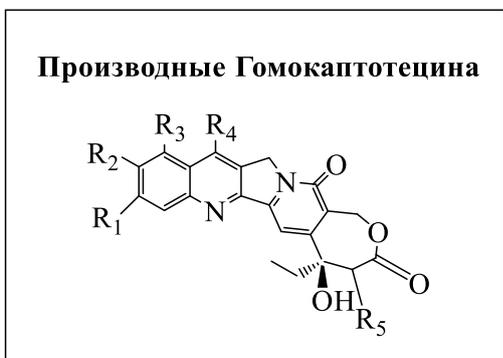
$R_1 = R_2 = R_3 = H, R_4 = -\text{Si}(\text{C})_3$ (**Каренитецин**)

$R_1 = R_2 = R_3 = H, R_4 = -\text{Si}(\text{C})_3$ (**Силатекан**)

$R_1 = R_2 = \text{O}(\text{C})_2, R_3 = H, R_4 = -\text{N}(\text{piperidine})-\text{N}(\text{piperidine})$ (**Луртотекан**)

$R_1 = F, R_2 = Me, R_3 = R_4 = -\text{NH}_2$ (**Экзатекан**)

Производные Гомокамптотецина



$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ (**Гомокамптотецин**)

$R_1 = R_2 = F, R_3 = R_4 = R_5 = H$ (**Дифломотекан**)

$R_1 = Cl, R_2 = Me, R_3 = R_5 = H, R_4 = -\text{N}(\text{piperidine})$ (**BN8092**)

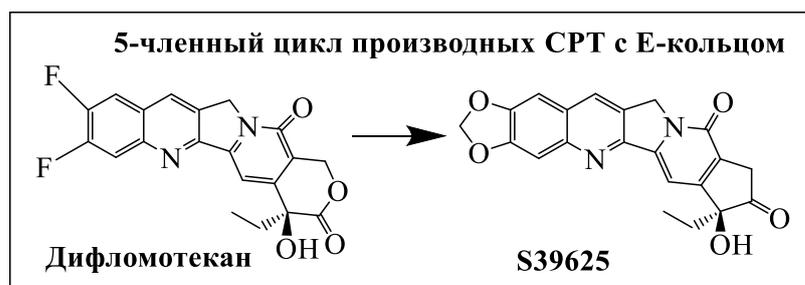


Рисунок 1.2 – Некоторые структуры производных и аналогов СРТ

Несмотря на достигнутые результаты в области лечения онкологических заболеваний, отдельного внимания заслуживает проблема развития множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), под которой понимается повышенная устойчивость или невосприимчивость клеток к целому ряду лекарственных препаратов различного химического строения и с разным механизмом действия. Научными исследованиями показано, что существуют

различные приспособительных механизмы, которые приводят к развитию МЛУ. К ним относятся активация транспортных белков и системы экзоцитоза, изменения генов и белков, контролирующих апоптоз и клеточный цикл, активация ферментов системы глутатиона и др. Также показано, что существует тесная связь между МЛУ и количественной изменчивостью клеточных популяций. В процессе деления опухолевой ткани в результате мутации происходит изменение генетического материала клетки. Образуются лекарственно-резистентные мутанты, которые устойчивы к действию лекарственного препарата. Количество таких клеток начинает преобладать по мере сокращения лекарственно-чувствительных популяций клеток, что приводит доминирование наиболее агрессивных клеточных клонов [26].

Решением данной проблемы может быть установление различных механизмов и стратегий, обеспечивающих развитие устойчивости опухолевых клеток по отношению к лекарственным препаратам, проведение генетического анализа и идентификация мутации клеток, а также отбор новых таргетных препаратов, способных воздействовать непосредственно на ферменты клеточного цикла и повышать чувствительность опухоли к химиотерапевтическому и лучевому воздействию. Необходимо упомянуть, что в последние годы в химиотерапии онкологических заболеваний наблюдается тенденция к замене высокотоксичных препаратов интеркаляторов и алкилирующих агентов, неселективно повреждающих ДНК опухолевой клетки, новыми соединениями, нековалентно взаимодействующими с ДНК и влияющими на репликацию и транскрипцию. Таким образом, конструирование и направленный синтез низкомолекулярных органических соединений, способных нековалентно и сайт-специфично связываться с узкой бороздкой ДНК, является крайне важной задачей для современной медицинской химии [27]. В настоящее время ведется большое количество исследований, ориентированных на поиск, изучение и отбор ингибиторов топоизомераз (TopI и TopII α) природного происхождения. Также активно ведется поиск методов синтеза принципиально новых синтетических аналогов и полусинтетических производных известных химических соединений

с установленной биологической активностью, которые имеют высокий потенциал для создания противоопухолевых субстанций, которые способны ослаблять репарационные возможности опухолевой клетки путем стабилизации ковалентных ДНК-белковых комплексов, изменяя каталитическую активность фермента. Также необходимо установление молекулярных мишеней, подробное изучение механизмов взаимодействия новых соединений с внутриклеточными мишенями. Механизм действия новых производных известных противоопухолевых соединений может отличаться от механизма взаимодействия с молекулярными мишенями прототипа, что может обуславливать различия в эффективности таких соединений и требует тщательного изучения их биологической активности.

Принимая во внимание вышеизложенное, а также учитывая значимость исследований, направленных на поиск новых таргетных соединений специфических и неспецифических ингибиторов топоизомераз далее приводятся сведения о природных соединениях (алкалоидах, жирных кислотах, флавоноидах, полифенолах, нафтохинонах и др.), а также их полусинтетических аналогах – ингибиторах топоизомераз I и/или II, не относящихся к соединениям ряда камптотецина.

Пирролохиназохинолиновый алкалоид **люотонин** (рисунок 1.3), выделенный из растения *Peganum nigellastrum*, обладает высоким цитотоксическим эффектом на клеточные линии лейкемии. Структурная схожесть люотонина с камптотецином, вероятно, обуславливает и схожий с камптотецином механизм ингибирования топоизомеразы I, что было продемонстрировано экспериментами *in vitro* и наблюдаемыми эффектами на химерных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих человеческую Топо I [28]. Позднее, в работах [29-31] синтезирован ряд производных люотонина, отдельные представители которых проявили антипролиферативную активность, существенно превышающую активность исходного соединения.

Алкалоид **эводиамин** (рисунок 1.3) экстрагируется из плодов растения *Evodiae fructus* и *Evodiae rutaecarpa*. Эводиамин и ряд его производных [32-34], проявили ингибирующую активность *in vitro* по отношению к TopI и TopII, а также

показали антипролиферативную и апоптотическую активность. Показано, что 3-амино-10-гидроксиэводиамин и его синтетические производные проявляют активность по отношению к раковым клеткам в различных клеточных линиях и *in vivo* у мышей *nude* с ксенотрансплантатами [35].

Кватернизированный бензофенантридиновый алкалоид **нитидин** (рисунок 1.3), выделенный из растений *Zanthoxylum nitidum* и *Toddalia asiatica* [36], проявляет высокую противоопухолевую активность в отношении карциномы легких Льюиса (LLC) у мышей [37]. Показано, что нитидин является интеркалятором ДНК и двойственным ядом топоизомераз I и II [38]. Следует отметить, что, если для ингибирования Топо I необходимо 0.15-0.3мМ нитидина, то ингибирование Топо II происходит при 100-кратном увеличении его концентрации (40 мМ) [39]. Исследования на клеточных линиях показали, что основной молекулярной мишенью нитидина является топоизомераза I [40].

Близкие структурные аналоги нитидина – **фагаронин** и **коралин** (рисунок 1.3) – также являются двойными ингибиторами топоизомераз [41, 42]. Показано [41], что ингибирование каталитической активности топоизомеразы I происходит при концентрациях фарагонина выше 30 мкМ, ингибирование активности топоизомеразы II – выше 25 мкМ. Бензофенантридиновые алкалоиды интеркалируют в ДНК и связываются преимущественно с регионами ДНК смешанной последовательности, особенно содержащих чередующиеся пуриновые и пиримидиновые основания [43].

Многочисленными исследованиями продемонстрировано, что бензофенантридиновые алкалоиды, помимо топоизомераз могут быть активны и по отношению к другим биологическим мишеням, в том числе, являться сильнодействующими и селективными ингибиторами протеинкиназы C, связываться с рецептором вазопрессина V1, ингибировать таксол-опосредованную полимеризацию тубулина и холинэстеразу [44, 45].

Природный алкалоид **берберин** (рисунок 1.3), содержащийся в растениях *Coptis chinensis*, *Radix Colombo*, *Berberis vulgaris* и др., обладает широким спектром фармакологического и биохимического действия, включая противоопухолевую

[46], противомикробную [47], антиаритмическую [48] активности. Данный алкалоид обладает довольно широким потенциалом для использования в качестве лекарственного средства в терапии различных заболеваний, а также синтеза на его основе новых производных.

Показано, что берберин хлорид и ряд его производных проявляют ингибирующую активность в отношении человеческой топоизомеразы I [49]. Авторами обнаружено, что производные, принадлежащие к ряду 13-монофенилалкил производных, не способны ингибировать образование комплекса фермент-ДНК и не оказывают ингибирующего действия на топоизомеразу. Однако, производные 13-дифенилалкила действуют как каталитические ингибиторы и способны препятствовать релаксации и расщеплению, но не релаксации каталитического цикла фермента.

Таспин (рисунок 1.3), впервые выделен из травы *Radix et Rhizoma Leonticis* и также содержится в коре южноамериканского дерева *Croton lechleri*, проявляет антиангиогенные свойства, позволяя снижать экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста фибробластов (β FGF) в человеческих опухолевых и эндотелиальных клетках [50]. Было обнаружено, что этот растительный алкалоид является двойным ингибитором топоизомераз I и II, а также способен индуцировать апоптоз клеточных линий карциномы толстой кишки HCT116 [51]. Показано, что таспин имеет схожий с СРТ механизм взаимодействия с ДНК [52].

Ламелларины (рисунок 1.3) – группа алкалоидов, первоначально выделенна в 1985 году из морских моллюсков *Lamellaria*, а позже обнаруженна в морских организмах *Ascidians*, являются эффективными ингибиторами Торо I [53]. В результате проведенных исследований по изучению механизма ингибирования топоизомеразы I ламелларином D в процессе релаксации ДНК установлено, что гидроксильные группы 20–ОН и 8–ОН могут вступать во взаимодействие с аминокислотными остатками Glu356 и Asn722 активного центра Top1 посредством водородных связей, что, соответственно, способствует стабилизации тройного комплекса, образующего между ДНК-Top1 и ламелларином D и ингибированию топоизомеразы I [54].

Природное соединение **лириоденин** (рисунок 1.3) – оксоапорфиновый алкалоид, выделенный из кустарника *Zanthoxylum nitidum*, обладает цитотоксическим эффектом, а его хелатный комплекс с золотом (III) ингибирует Top1 [55]. Несмотря на то, что комплекс является крайне эффективным ядом Top1 *in vitro*, в работе отсутствуют какие – либо сведения о механизме его цитотоксического действия.

Антофин (рисунок 1.3) привлекает внимание химиков-синтетиков и фармакологов из-за проявляемых свойств ингибитора роста большого числа опухолевых клеточных линий [56, 57]. Установлено, что ингибирование пролиферации клеток происходит в G2/M фазе клеточного цикла [58]. Кроме того, авторами показано, что антофин эффективно ингибирует Top1, а также проявляет цитотоксический эффект к 9 опухолевым клеточным линиям (A549, BEL-7402, SGC-7901, DU-145, HT-29, MCF7, MDA-MB-231, U251, B16) [59].

Алкалоид **вакаин** (рисунок 1.3) выделенный из *Ascidian Clavelina*, способствует ингибированию реакции релаксации суперспирализованной ДНК, катализируемой топоизомеразой I, и образованию ковалентных комплексов ДНК-Top1 [60]. Это свойство вакаина позволило синтезировать на его основе ряд производных, обладающих ингибирующей Top1 активностью [61]. Предполагается, что вакаин интеркалирует в ДНК, а выступающая за пределы двойной спирали часть молекулы вступает в непосредственное молекулярное взаимодействие с ферментом.

Природный алкалоид **лунакридин** (рисунок 1.3) также является интеркалятором ДНК и ингибитором TopII, проявляющий антибактериальное действие к золотистому стафилококку NCTC 6571 и цитотоксичность к опухолевым клеточным линиям HeLa и H226 [62].

Пентациклический алкалоид **неоамфимицин** (рисунок 1.3), выделенный из морских губок *Xestospongia sp.*, известен как эффективный ингибитор топоизомеразы II и, подобно этопозиду, способен задерживает рост перевиваемых опухолей у мышей [63].

Ликобетаин (рисунок 1.3) представляющий собой кватеринизированный фенантридиновый алкалоид, выделенный из цветкового растения рода *Lycoris radiata* семейства *Amaryllidaceae*, обладает противоопухолевыми свойствами [64]. Экспериментальные исследования на лабораторных животных показали, что внутривенное введение ликобетаина сдерживает рост некоторых злокачественных новообразований, в том числе и карциному легкого Льюиса (LLC) [65, 66]. Ликобетаин проявляет цитотоксичность по отношению клеточной линии LXFL 529L ($IC_{50}=1.2\text{мкМ}$), ингибирует рост лейкозных клеточных линий человека ($IC_{50}=1,3\text{ мкМ}$) [67]. Кроме того, при внутрибрюшинном введении ликобетаина в дозах 30 мг/кг приводит к существенной задержке роста опухоли на 1-5 и 8-12 сутки у мышей с привитой карциномой легких LXFL529 [68]. Ликобетаин является двойным ингибитором топоизомераз I/II и стабилизирует ковалентный комплекс ДНК-TopI.

Калотриксины (рисунок 1.3) – соединения, экстрагированные из фотоаутофичных культур двух изолятов цианобактерий *Cyanobacter calothrix* [69], являясь структурными аналогами известных ядов топоизомеразы I, ингибируют *in vitro* рост хлорхинин-устойчивых линий возбудителей малярии *Plasmodium falciparum* [70] и HeLa клеток человека дозозависимым образом [71, 72]. Калотриксины А и Б, наряду с двумя метилированными аналогами, являются ингибиторами топоизомеразы I и обратимо стабилизируют бинарный комплекс топоизомеразы I – ДНК, приводя к гибели клетки [73]. Исследования по изучению влияния калотриксинов и их производных на клеточный цикл показали, что калотриксин В сдерживает пролиферацию клеток в G1 фазе клеточного цикла при концентрации 0.1 мкМ, тогда как более высокие значения концентрации калотриксинов приводят к накоплению клеток, находящихся в фазах S- и G2.

Недавно было показано, что природный алкалоид, выделенный из *Ocotea leucoxydon* избирательно ингибирует топоизомеразу I. Впоследствии, с использованием *in vitro* тест систем для детекции соединений-ингибиторов топоизомеразы I было установлено, что основным действующим веществом

экстракта, ответственным за ингибирование Top1, является алкалоид апорфинового ряда – **дицетринон** (рисунок 1.3) [74].

Пиридоакридиновые алкалоиды (дегидрокуанониамин В, шермиламин С и цистодинин J), выделенные из растения *Fijian Cystodytes sp.*, наряду с пиридоакридином и дипломином, проявляют дозозависимое ингибирование пролиферации клеток опухоли толстого кишечника человека (НСТ) *in vitro*. Все вышеуказанные соединения ингибируют топоизомеразу II и одновременно способны интеркалировать в ДНК. Дополнительные исследования показывают, что основной клеточной мишенью пиридоакридиновых алкалоидов является ДНК, они нарушают синтез ДНК и РНК, но практически не влияют на синтез белка [75].

Природное соединение **эллиптицин** (5,11-диметил-6Н-пиридо-[4,3-*b*]карбазол) (рисунок 1.3), выделенное из дерева вида *Ochrosia elliptica*, проявляет противоопухолевую активность и способность ингибировать топоизомеразу II. Кроме того, одно из производных эллиптицина – 9-гидрокси-N-метилэллиптицин ацетат (Celiptium), внедрено в клиническую практику в качестве препарата для лечения метастатического рака молочной железы, лейкемии и некоторых миелобластных солидных опухолей [76]. Как и многие противоопухолевые агенты, эллиптицин имеет мультимодальный механизм действия, включающий интеркаляцию в ДНК и ингибирование энзима Торо II [77].

В результате проведенных исследований показано, что эллиптицин и соли 6-метилэллиптицина являются двойственными ингибирами топоизомеразы I и II, обладают значительным сродством к ДНК. Результаты анализа релаксации топоизомеразы показали, что все новые производные эллиптицина ведут себя как интеркалирующие агенты, а также проявляют цитотоксичность по отношению к 12 линий опухолевых клеток (HT29 и SW480 (colon), MCF-7 (breast), A2780 (ovarian), H460 (lung), A431 (skin), DU145 (prostate), BE2-C (neuroblastoma), SJ-G2, SMA и U87 (glioblastoma), MIA (pancreas)) [78].

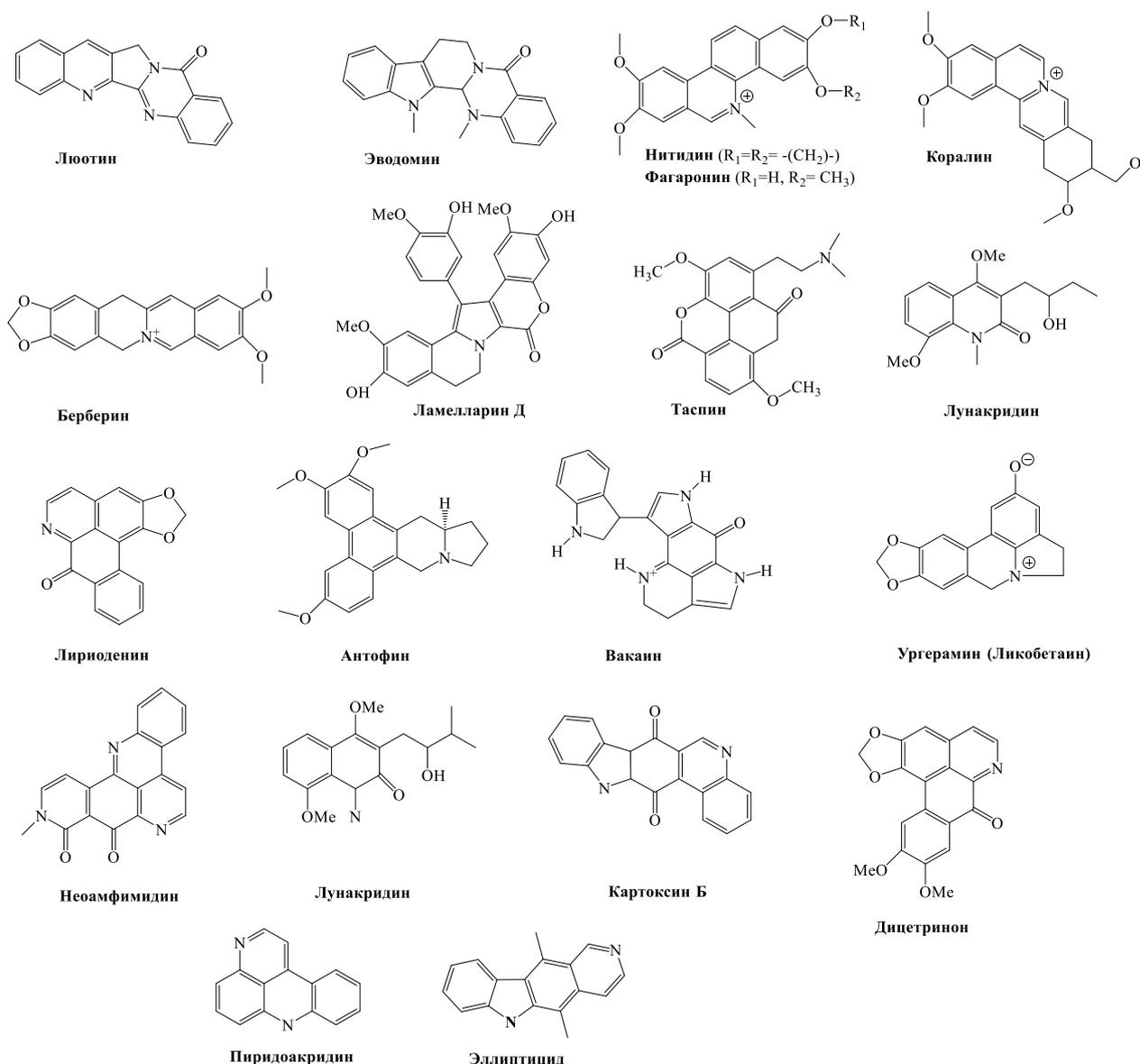


Рисунок 1.3 – Структуры некоторых алкалоидов, проявляющих активность ингибирования топоизомераз I/II

1.3 Флавоноиды

Флавоноиды – многочисленный класс полифенолов, растительного происхождения, который включает в себя гидроксипроизводные флавона (флавоноиды), 2,3-дигидрофлавона (флаваноны), 4-фенилкумарина (неофлавоноиды), изофлавона (изофлавоноиды), флавоны с восстановленной карбонильной группой (флаванолы) [79].

Флавоноиды – растительные пигменты, пищевые антиоксиданты, дубильные вещества. В последнее время наблюдается интерес к этому классу соединений со

стороны фармакологов благодаря обнаруженным у ряда флавоноидов антибактериальных и противоопухолевых свойств [80].

Пищевые флавоноиды – **кверцетин**, **апигенин**, **фисетин** и **мирицетин** (рисунок 1.4) – принадлежат к большой группе вторичных метаболитов растений. Проведенные в разное время эпидемиологические исследования имеют противоречивый характер: с одной стороны, показано, что продукты, богатые флавоноидами, могут иметь антиканцерогенный эффект [81, 82], и, наоборот, диета, богатая флавоноидами, канцерогенна [83, 84]. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что за описанные выше эффекты могут быть ответственны топоизомеразы I/II, так как каталитическое ингибирование топоизомераз выполняет хемопротекторную функцию, но, также может быть ответственно за хромосомные изменения, вследствие которых проявляются канцерогенные эффекты [85].

Кверцетин (рисунок 1.4) и ряд его структурных аналогов известны в качестве ингибиторов роста опухолевых клеток [86]. Экспериментами *in vitro* и *in vivo* показано, что кверцетин проявляет цитотоксическую активность по отношению к клеткам рака яичников. Кроме того, показано, что применение кверцетина усиливает цитотоксическое действие ряда противоопухолевых соединений группы цисплатина [87]. Изучение взаимодействия кверцетина, акацетина, апигенина и кемферола с рекомбинантной человеческой топоизомеразой I показало, что указанные флавоноиды предотвращают релегирование молекулы ДНК, но по механизму отличному от СРТ [88]. Эти соединения, в отличие от камптотецина, не воздействуют непосредственно на каталитический интермедиат и не препятствуют расщеплению ДНК. Однако, образование тройного комплекса с ДНК и топоизомеразой I, во время реакции расщепления, ингибирует этап повторного лигирования ДНК. В результате проведенных исследований *in vitro* показано, что **мирицетин** и **мирицетин-3-галактозид** способны ингибировать топоизомеразу I в реакции релаксации суперскрученной ДНК [89]. Близкий структурный аналог мирицетина **лютеолин** (рисунок 1.4) полностью стабилизирует расщепление комплекса Topo1-ДНК при

концентрации 40 мкМ ($IC_{50}=5$ мкМ) по механизму, схожему с СРТ. При этом авторы предполагают, что в отличие от камптотецина, лютеолин взаимодействует как с ферментом, так и с ДНК-субстратом [90].

С учетом того, что определенные флавоноиды могут интеркалировать в ДНК, некоторые авторы полагают, что флавоноиды ингибируют релаксационную активность топоизомеразы I как непосредственно прямым воздействием на фермент, так и за счет сложных процессов, основанных на взаимодействии с Top1 и интеркаляцию в ДНК [91]. Например, Das В.В. с соавторами полагают, что байкалеин, лютеолин и кварцетин стабилизируют ковалентный комплекс Topo1-ДНК, и, кроме того, способны связываться со свободным ферментом и интеркалировать в ДНК [92].

В развитие иницированных ранее исследований М. López-Lázaro с соавторами на примере флавоноидов кварцетин, апигенин, мирицетин и фисетин, попытались установить закономерности влияния их структуры на проявляемую ингибирующую активность в отношении топоизомераз I и II, а также способность индуцировать образование комплексов фермент-ДНК в клетках линии лейкемии человека (K562) [93, 94].

Кварцетин и апигенин способствуют возникновению комплексов TopoII-ДНК и не индуцируют образование комплексов TopoI-ДНК в опухолевых клетках. Фисетин проявляет свойства каталитического ингибитора обоих ферментов, но не индуцирует образования комплексов TopoI-ДНК и TopoII-ДНК. Мирицетин, наоборот, индуцирует высокий уровень формирования комплексов Topo-ДНК для обоих энзимов [95].

Изучение закономерности структура-активность на примере исследованных соединений свидетельствует о важной роли гидроксильной группы при С-5 углеродном атоме. В частности, присутствие С-5 гидроксильной группы в мирицетине отвечает за высокую активность в отношении Topo I и II, а именно этот факт важен для образования комплексов ДНК-Top. Отсутствие гидроксильной группы в молекуле фисетина подтверждает данное утверждение [96].

Известно также, что некоторые широко потребляемые пищевые флавоноиды (кверцетин, генистеин, куркумин, и кемпферол), в биологически значимых концентрациях могут вызвать инактивацию гена лейкемии (KMT2A - гистон лизин-N-метилтрансфераза 2A или белок острого лимфобластного лейкоза 1 или белок цинкового пальца HRX) в стволовых кроветворных клетках. [97]. Флавоноиды, выделенные из какао, также оказывают ингибирующее воздействие на топоизомеразу II и пролиферацию опухолевых клеток [98].

Антоцианидины **дельфинидин** и **цианидин** ингибируют человеческие топоизомеразы I и II, не стабилизируя ковалентный комплекс ДНК-Тор [99]. Также показано, что дельфинидин дозозависимым образом проявляет протективную функцию против повреждающих ДНК эффектов, вызванных действием ядов топоизомеразы II *in vitro* [100].

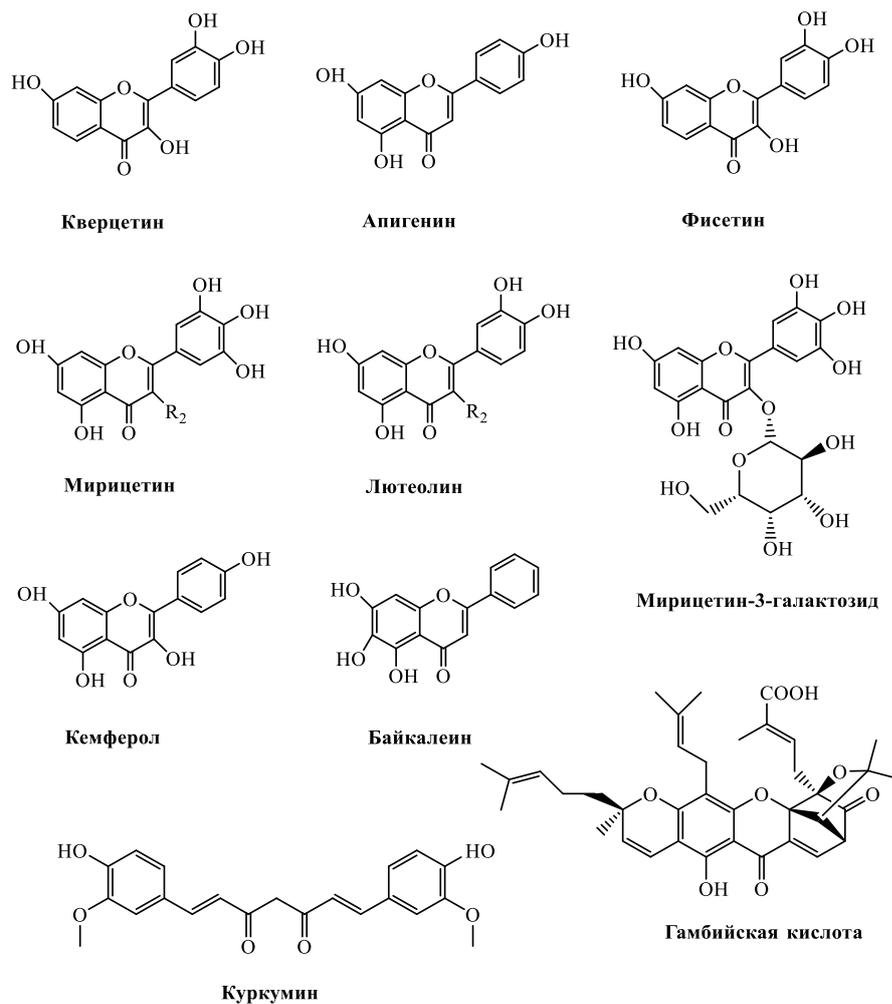


Рисунок 1.4 – Структуры некоторых флавоноидов, проявляющих активность ингибирования топоизомераз I/II

Группа **5-гидрокси-7-метоксифлавонов** с различными заместителями в кольце В проявили противоопухолевую активность в отношении клеточной линии назофарингеальной карциномы человека (КВ) и мышинового лейкоза (P-388). Практика исследований закономерностей структура-активность позволяет прийти к выводу, что за способность ингибирования топоизомеразы I, ответственны гидроксильные группы при C-5 и C-4', а также метоксильные группы при C-7 и C-3' углеродных атомах [101]. В литературе имеются также сведения о флавоноидах, способных ингибировать топоизомеразу II, в числе которых различные пищевые полифенолы [102]. **(-)-эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG)** – биологически активный флавоноид, содержащийся в зеленом чае, является редокс-зависимым ядом топоизомеразы II [103]. Например, **изоликвиритигенин**, обнаруженный во многих овощах (в частности, в бобовых и луке-шалоте), вызывает остановку клеточного цикла через необратимое ингибирование топоизомеразы II [104].

4-гидроксидеррицин, содержащийся в корнях *Angelica keiskei Koizumi*, проявляет выраженную антипролиферативную активность в опухолевых клеточных линиях (HL-60, CRL1579, A549 и AZ521), противоопухолевую и антиметастатическую активность *in vivo* [105], проявляется ингибирующую активность в отношении топоизомеразы II и не активен в отношении топоизомеразы I [106].

Гамбийская кислота (рисунок 1.4) – основной компонент смолы *Gamboges*, секрет дерева *Garcinia hanburyi*, произрастающего в Юго – Восточной Азии, используется в традиционной китайской медицине. Антипролиферативное действие гамбийской кислоты обусловлено ингибированием каталитической активности топоизомеразы IIα. Кроме того, гамбийская кислота предотвращает повреждение ДНК и гидролиз АТФ [107]. Кислота способна ингибировать пролиферацию клеток вызывая апоптоз, что широко изучено на примере опухолевых клеточных линий различного происхождения (MG63, HOS, U2OS, HepG2) [108, 109].

Симоциклин Д8 – антибиотик, выделенный из *Streptomyces antibioticus Tu 6040*, ингибирует активность ДНК-гиразы, является ингибитором топоизомеразы II

и проявляет высокую противоопухолевую активность по отношению к клеткам злокачественной мезотелиомы и немелкоклеточному раку легкого [110].

Куркумин (рисунок 1.4) – основное химическое соединение, содержащееся в составе корня куркумы. В настоящее время большое количество работ посвящены исследованиям терапевтических эффектов куркумина, в частности, он активно исследуется в качестве потенциального противоопухолевого средства для лечения онкологических заболеваний. В эксперименте *in vitro* на клеточных культурах куркумин способен вызывать апоптоз опухолевых клеток без цитотоксического воздействия на здоровые клетки [111]. Проводятся клинические испытания препарата [112]. Было показано, что куркумин индуцирует образование комплексов топоизомеразы I – ДНК и топоизомеразы II – ДНК в клеточной линии лейкемии человека K562 [113].

Помимо куркумина из корня куркумы выделены **диметоксикуркумин (DMC)** и **бисдиметоксикуркумин (BDMC)**, которые также являются ингибиторами топоизомеразы II. Способность DMC и BDMC необратимо блокировать рекомбинантную человеческую топоизомеразу IIa существенно увеличивается в присутствии кровяной соли, что свидетельствует о необходимости окислительных превращений для достижения более полного расщепления ДНК [114].

Серия из пяти **3,5-бисарилиден-4-пиперидонов** – аналогов куркумина и их конъюгатов с жирными кислотами синтезированы и испытаны в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Цитостатический потенциал этих соединений оценивали в отношении мышинных лейкозных клеток (L1210), человеческих Т-лимфоцитов (СЕМ) и клеток карциномы шейки матки (HeLa). Большинство исследуемых гибридных молекул проявило значительную противоопухолевую и ингибирующую активность в отношении топоизомеразы IIa *in vitro*. Также показано, что конъюгаты жирных кислот вызывают значительно меньшее повреждение клеток фибробластов человека, чем применяемый в терапии онкологических заболеваний противоопухолевый препарат сорафениб *in vitro* [115].

1.4 Тритерпены

Тритерпеноиды – класс природных органических соединений, которые широко распространены в природе, поскольку ответственны за функционирование многих процессов жизнедеятельности в растениях, животных, грибах, бактериях и простейших. Тритерпеноиды обладают широким спектром биологической активности. Например, урсоловая, олеановая и бетулиновая кислоты, целастрол, пристимерин, лупеол и авицин обладают потенциальными противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами. Наравне с различными биологическими эффектами они являются ингибиторами ТороI и ТороIIa, предотвращая образование комплекса Топоизомеразы-ДНК [116]. Пентациклический скелет тритерпеноидов является важным структурным элементом, который обуславливает проявляемую ими ингибирующую активность по отношению к топоизомеразам [117].

С целью усиления противоопухолевой активности тритерпеноидов применяют следующие основные приемы – введение в их структуру цианогрупп, имидазольных фрагментов, синтез оксимов, получение гибридных молекул и сложных эфиров с жирными кислотами на их основе [118, 119].

Бетулиновая кислота (рисунок 1.5) – пентациклический тритерпеноид растительного происхождения, обладающий широким спектром фармакологического действия, включая противовоспалительную, противомаларийную и анти-ВИЧ активности, а также является перспективным противоопухолевым агентом и в настоящее время находится на первой фазе клинических испытаний. В работе A.R. Chowdhury с соавторами показано, что бетулиновая кислота ингибирует Торо I, препятствуя возникновению комплекса ДНК-топоизомеразы. Наличие карбоксильной функциональной группы является необходимым структурным элементом, обуславливающим проявляемую ими активность, а гидрирование двойной связи при C-20 атоме углерода, расположенном в боковой цепи, приводит к усилению активности ингибирования Торо I [120].

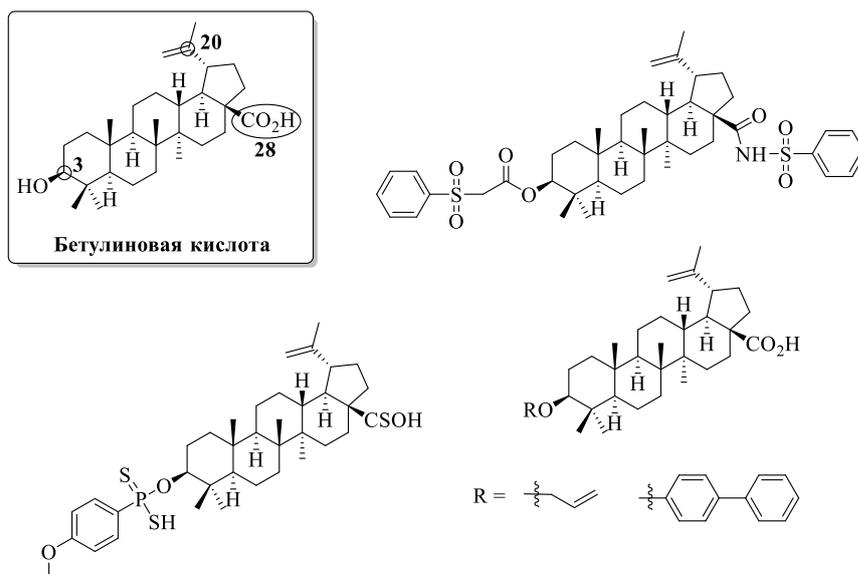


Рисунок 1.5 – Производные бетулиновой кислоты – ингибиторы топоизомераз I/II

Коллективом авторов в результате химических трансформаций бетулиновой кислоты по C-3, C-20 и C-28 атомам углерода был осуществлен синтез 14 производных. Показано, что 3-*O*-[*N*-(фенилсульфонил)капбамоил-17-*N*-(фенилсульфонил)амид]бетулиновая кислота проявила ингибирующую активность по отношению к Торо I и Торо II, в 1,5 раза превышающую активность камптотецина. Четыре из 14 синтезированных производных проявили ингибирующую активность в отношении топоизомеразы II, в 1,5 раза превышающую активность этопозида. Также данными авторами показано, что новые производные бетулиновой кислоты проявили более высокую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеточных линий (SW948, HCT-116, MDA-MB-231) по сравнению с исходным соединением [121].

Nakagawa-Goto с соавторами показано, что в результате этерификации бетулиновой кислоты по гидроксильной группы, расположенной при C-3 углеродном атоме и ее гомолога цеанотиновой кислоты с различными непредельными кислотами, синтезировано шестнадцать тритерпеноидов. Из числа синтезированных соединений наибольший ингибирующий эффект по отношению к Торо I проявил эфир бетулина и 3,3-диметилакриловой кислоты [122].

Босвеллиевая кислота – основной биологически активный компонент индийского ладана. Обладает широким спектром фармакологического и

биологического действия, который подтвержден многочисленными исследованиями *in vitro* и на животных, а также рядом клинических исследований. Является ингибитором топоизомераз I и II [123, 124].

Ацетил-босвеллиевые кислоты – пентациклические тритерпены, входящие в состав смолы дерева *Boswellia serrata*. Эти соединения являются двойными каталитическими ингибиторами топоизомераз I и II. Цитотоксическая активность ацетил-босвеллиевых кислот обусловлена ингибированием активности фермента по механизму, который не включает стабилизацию расщепляемого комплекса или интеркаляцию в ДНК. Авторы предполагают, что производные ацетил-босвеллиевых кислот напрямую связываются с топоизомеразой, конкурируя с ДНК. Показано, что ацетил-босвеллиевые кислоты являются более мощными ингибиторами топоизомераз по сравнению с камптотецином, амсакрином или этопозидом [125].

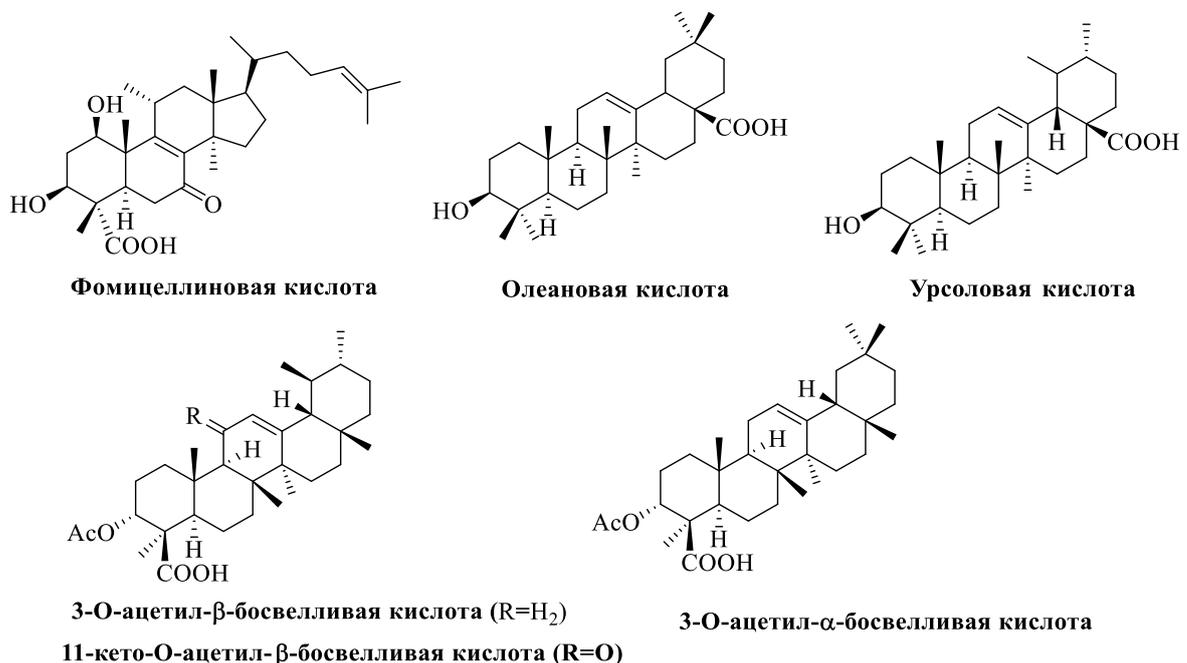


Рисунок 1.6 - Структуры некоторых тритерпеноидов, проявляющих ингибирующую активность топоизомераз I/II

Фомителлиновая кислота (рисунок 1.6), вырабатываемая пористыми грибами *Fomitella fraxinea* и **урсоловая кислота**, обнаруженная в деревьях *Tabebuia caraiba* и *Campsis radicans*, являются ингибиторами ДНК-полимераз

млекопитающих, проявляют ингибирующую активность по отношению к Торо I и Торо II. По мнению авторов, указанные кислоты не связываются с ДНК, а взаимодействуют с ферментами Торо I и II напрямую. Показано, что фомителлиновая и урсоловая кислоты ингибируют рост раковых клеток линии NUGC, значение LD₅₀ составляет 38 мкМ и 30 мкМ, соответственно [126].

Олеаноловая кислота (рисунок 1.6) – пятичленный тритерпеноид природного происхождения, содержащийся в растениях *Hibiscus sabdariffa* и деревьях *Olea europaea*. Авторами осуществлена химическая трансформация олеановой кислоты по функциональным группам при C-3, C-12, C-13, и C-17 атомах углерода с целью установления зависимости структура-активность. Среди синтезированных производных обнаружены соединения, обладающие двойственной ингибирующей активностью по отношению к топоизомеразам I и II, в том числе, превышающей активность СРТ и этопозиды. Показано, что двойная связь при C12–C13 атомах углерода является важным элементом структуры олеановой кислоты, отвечающим за ингибирующее действие как в отношении Торо I, так и Торо II. Введение длинноцепочечного фрагмента в 3 и 17 позиции в разной степени приводит к повышению ингибирующей активности соединений [127, 128].

1.5 Хиноны и нафтохиноны

Хиноны проявляют антибактериальную [129], противоопухолевую [130], и противовирусную активности [131], являются эффективными ингибиторами бактериальной ДНК-гиразы, топоизомераз I и II млекопитающих [132, 133].

Наиболее известными представителями хинонов, проявляющих противоопухолевую активность, являются антрациклины – **доксорубин** и **митоксантрон**, являющиеся ингибиторами топоизомеразы II.

Семена чернушки посевной *Nigella sativa* на протяжении столетий использовались в качестве лекарственного средства при наличии проблем, связанных с дыхательной системы, желудка, кишечника, сердечно-сосудистой системы, повышения иммунитета и улучшения общего состояния организма. Более

поздние исследования показали, что экстракт семян индуцирует апоптоз и проявляет противоопухолевую активность на животных и клеточных моделях, ингибирует топоизомеразу II. Основным биологически активным компонентом является **тимохинон** (рисунок 1.7), имеющий структурное сходство с 1,4-бензохиноном [134].

Антрациклины – большая группа хиноидных соединений, которые используются для лечения некоторых форм рака. Являются ингибиторами топоизомеразы II. Наиболее популярные соединения, которые применяются в терапии злокачественных опухолей – даунорубицин, доксорубицин, идарубицин, эпирубицин, акларубицилин и пирарубицин. Хотя эти соединения весьма эффективны в терапии рака, механизм их действия не является специфичным; они действуют на опухолевые и другие клетки различными механизмами. Один из ключевых факторов, ограничивающий применения антрациклинов – кардиотоксичность и развитие МЛУ [135].

Хинон **HU-331** (рисунок 1.7) проявляет высокую противоопухолевую активность в отношении человеческих опухолевых клеточных линии *in vitro* и опухолевых трансплататов у голых мышей *in vivo*. HU-331 не оказывает воздействия на клеточный цикл опухолевых клеток, не приводит к апоптозу, или активации каспазы. HU-331 ингибирует топоизомеразу II уже в наномолярных концентрациях, но практически не оказывает ингибирующего действия в отношении топоизомеразы I. Таким образом, HU-331 является одним из наиболее специфичных ингибиторов топоизомераз II, в сравнении с известными хинонами, проявляющими противоопухолевую активность [136].

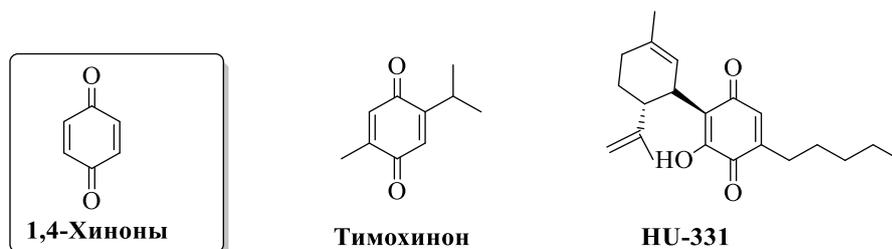


Рисунок 1.7 – Структуры некоторых 1,4-хинонов, проявляющих активность ингибирования топоизомераз I/II

Помимо топо-"ядов", открыт ряд соединений, способных нарушать функции топоизомераз, не образуя ковалентный комплекс с ферментом и ДНК. Такой феномен называют неспецифическим ингибированием топоизомераз, а ингибиторы – неспецифическими или "супрессорами" [137]. Так, природное соединение **β-лапахон** (рисунок 1.8) способно подавлять активность топоизомеразы I, не образуя с ней ковалентный комплекс [138]. Аналогичный механизм наблюдается для **изодиоспирина** – природное соединение, выделенное из *Diospyros morrisiana*, которое состоит из асимметричного 1,2-бинафтохинонового хромофора (рисунок 1.9). Соединение проявляет цитотоксическую активность к опухолевым клеточным линиям (Нера-3В, KB, Colo-205, HeLa) [139] и ингибирует Top1 путем прямого воздействия и ограничения доступа фермента к ДНК [140]. **α-Лапахон** (рисунок 1.9), и его лактон-содержащие аналоги, являются эффективными ингибиторами топоизомеразы II. Пиранонафтохиноновые производные α- и β- лапахон индуцирует abortивную диссоциацию топоизомеразы II из ДНК, приводя к необратимому накоплению отдельных фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой, инициируя негомологичную рекомбинацию в клетке [141].

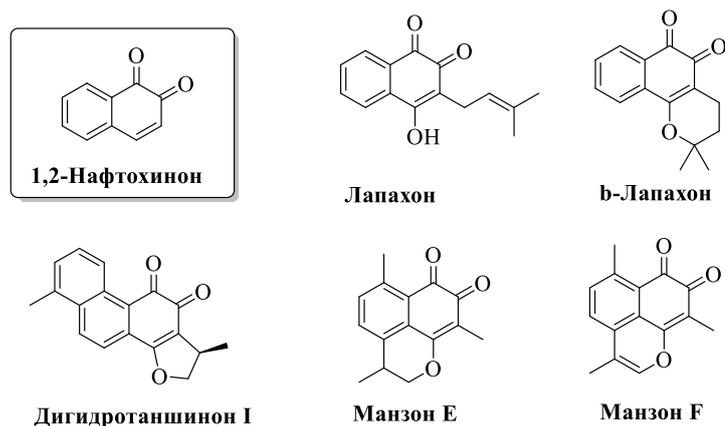


Рисунок 1.8 – Структуры некоторых 1,2-нафтохинонов, проявляющих активность ингибирования топоизомераз I/II

Сесквитерпен орто-нафтохинон **манзонон Е** (рисунок 1.8), выделенный из японского растения *Ulmus davidiana*, эффективно ингибирует топоизомеразу I и обладает противоопухолевой активностью по отношению к клеточным линиям

лейкемии (U937, K562, HL-60 и THP-1) [142]. С-9 хлор- и бромзамещенные производные манзонон Е с триазольными фрагментами в С-3 положении являются эффективными ингибиторами топоизомеразы I и II. Оценка цитотоксической активности по отношению к клеточным линиям A549, HL-60, K562 и HeLa указывает на то, что эти соединения являются мощными противоопухолевыми агентами [143].

Нафтохинон **плюмбагин** (рисунок 1.9), выделенный из травянистого растения *Plumbago zeylanica*, и его хелатные комплексы с медью (II) показали цитотоксический эффект и способность ингибирования топоизомеразы I [144].

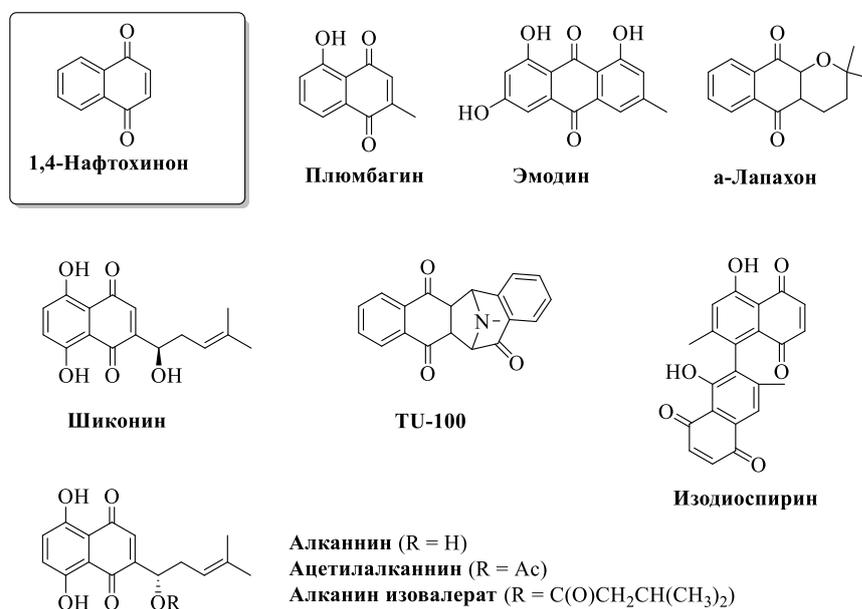


Рисунок 1.9 – Структуры некоторых 1,4-нафтохинонов, проявляющих активность ингибирования топоизомераз I/II

Алканнин и **шиконин** являются природными нафтохинонами (рисунок 1.9). F. Yang с соавторами осуществлен синтез ряда производных приведенных выше соединений и было установлено, что нафтохиноны, содержащие, по меньшей мере, одну фенольную гидроксильную группу, являются эффективными ингибиторами топоизомеразы I и II [145].

В попытке создать более эффективные химиотерапевтические соединения, синтезирован аддукт нафтохинона 12,13-дигидро-N-метил-6,11,13-триоксо-5Н-

бензо[4,5]циклогепта[1,2-b]нафталин-5,12-имин (**TU100**) (рисунок 1.9). Исследования жизнеспособности клеток показали, что TU100 специфичен для эукариот и является эффективным ингибитором топоизомеразы I и II, не интеркалирующих в ДНК. Кроме того, преинкубация TU100 с ферментом приводит к существенному снижению IC₅₀. Препарат представляет собой новый ингибитор топоизомеразы замедленного действия, который работает в отсутствие ДНК [146].

Эмодин – антрахинон, полученный из растения и грибов, обладает потенциальной генотоксичностью (рисунок 1.9). Эмодин приводит к двухцепочечному разрыву ДНК путем стабилизации комплексов расщепления ТопоII-ДНК и ингибирования гидролиза АТФ [147]. На основе эмодина синтезирован новый класс соединений **галоэмодины**, проявивших сильную ингибирующую активность в отношении бактериальной топоизомеразы I и ДНК-гиразы, но не в отношении топоизомеразы человеческого происхождения [148].

1.6 Фенолы и полифенолы

Макроциклическое бисбибензильное соединение **риккардин D** (рисунок 1.10), экстрагированное из растения *Dumortiera hirsuta*, проявляет проапоптотические и цитотоксические свойства в отношении клеточной линии промиелоцитарной лейкемии HL-60 и карциномы легких человека H460. Одновременно показано, что в процессе релаксации ДНК под действием топоизомеразы II риккардин D при относительно высоких концентрациях проявляет большую активность ингибирования фермента по сравнению с этопозидом [149].

Различные аналоги **тирфостина**, которые, по сути, являются мощными и селективными блокаторами протеинтирозинкиназ, также обладают способностью связываться непосредственно с топоизомеразой I. Например, производное тирфостина AG-555 (рисунок 1.10) является ингибитором тирозинкиназы и взаимодействует непосредственно с топоизомеразой I, препятствуя процессу релаксации ДНК. Полагают, что антипролиферативная активность производных

тирфостина связана как с его способностью ингибировать как протеинкиназу, так и топоизомеразу I [150, 151].

Ресвератрол (рисунок 1.10) хорошо известный природный стильбен, способен ингибировать способность рекомбинантной топоизомеразы $\text{P}\alpha$ человека к декатенированной ДНК *in vitro*, действуя как яд топоизомеразы $\text{P}\alpha$ в опухолевых клетках [152, 153].

Алкилгидрохиноны также проявили ингибирующую активность в отношении топоизомеразы $\text{P}\alpha$ [154]. Сообщается о серии умеренно-мощных **алкил-кумаратов**, выделенных из растения *Artemisia annua L.*, включая докозил-*p*-кумарат, проявляющего свойства эффективного ингибитора топоизомеразы $\text{P}\alpha$ [155].

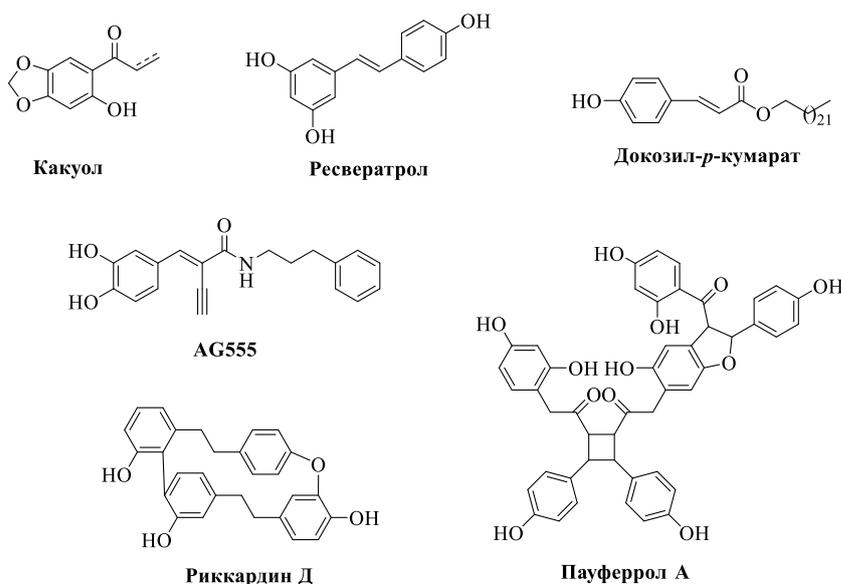


Рисунок 1.10 – Структуры некоторых фенолов и полифенолов, проявляющих активность ингибирования топоизомераз I/II

Пауферрол А – производное халькона (рисунок 1.10), выделенное из стеблей растения *Caesalpinia ferrea Mart*, проявил сильную ингибирующую активность по отношению к топоизомеразе $\text{P}\alpha$ человека, при значении $\text{IC}_{50}=2.1$ мкМ, и ингибирующую активность пролиферации клеток посредством индукции апоптоза в клетках линии HL-60 лейкемии человека, при значении $\text{IC}_{50}=5.2$ мкМ [156].

Природное соединение **какуол** (рисунок 1.10), выделенное из корневища растения *Asarum sieboldii*, а также его производные, способны ингибировать релаксацию ДНК, опосредуемую топоизомеразой I человека. Исследования различных стадий каталитического цикла показали, что ингибирование происходит на уровне расщепления и не препятствует связыванию ДНК [157].

1.7 Эпиподофиллотоксины

Эпиподофиллотоксины – вещества, встречающиеся в корне растения *American Mayapple plant (Podophyllum peltatum)*. Некоторые производные эпиподофиллотоксина в настоящее время используются для лечения раковых заболеваний. К ним относятся этопозид и тенипозид (рисунок 1.11). Противоопухолевое действие этих препаратов основано на ингибировании топоизомеразы II [158].

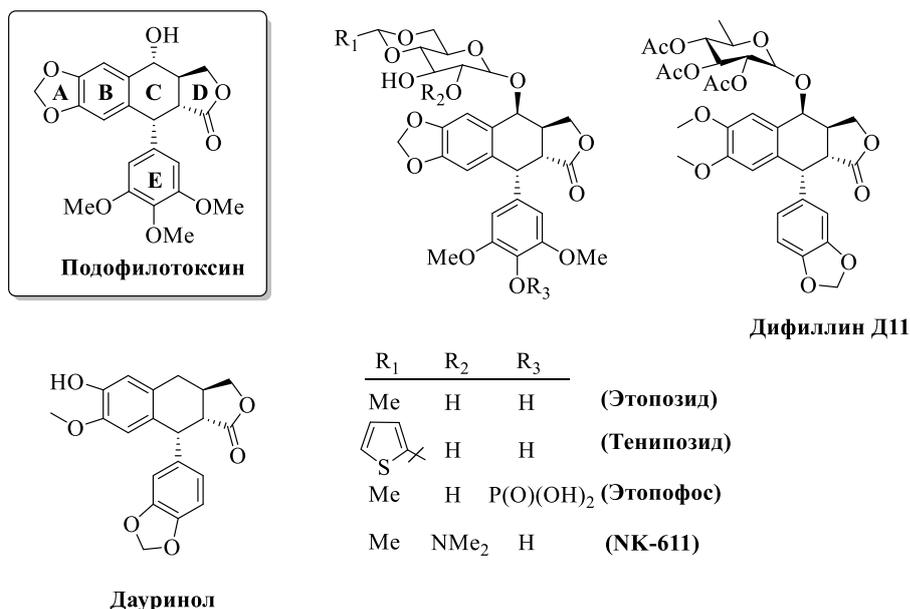


Рисунок 1.11 – Структуры некоторых производных эпиподофиллотоксина, проявляющих активность ингибирования топоизомераз I/II

Этопозид (VP-16) – специфический ингибитор топоизомеразы II, представляет собой полусинтетическое производное подофиллотоксина [159]. Этопозид применяют в химиотерапии рака яичников, рака желудка, лимфомы Ходжкина, острого лейкоза, мягкотканых сарком, нейробластомы [160]. Этопозид

связывается с топоизомеразой II, ингибирует выполняемую ей функцию лигирования, что приводит к накоплению разрывов ДНК, нарушению репликации, транскрипции и клеточного цикла и, как следствие, приводит к гибели клеток [161].

Как отмечалось выше, с момента внедрения этопозида в клиническую практику в 1971 году, он остается основным противоопухолевым препаратом для лечения большинства солидных и гематологических опухолей, а также применяется в комбинации с такими противоопухолевыми препаратами как цитарабин, митоксантрон, моноклональным антителом ритуксимаб или цисплатин [162].

Однако, при использовании этопозида наблюдаются побочные эффекты, в том числе, миелосупрессии и нейротоксичность, а также и риск вторичной лейкемии в долгосрочной перспективе [163].

С целью преодоления побочных эффектов, а также синтеза новых более эффективных противоопухолевых соединений осуществлен синтез обширной библиотеки производных подофилотоксина, выступающих в качестве селективных ингибиторов Торо II [164, 165]. Некоторые из синтезированных производных – TOP-53 [166, 167], GL331 [168], NK611 [169], тафлупозид [170] в настоящее время находятся на стадии предклинических испытаний. Но до сих пор ни один из кандидатов не был одобрен для использования в клинической практике из-за высокой токсичности или низкой эффективности. Несмотря на эти неудачи, как со стороны онкологов, так и химиков наблюдается неугасающий интерес к производным подофилотоксина в виду их высокого противоопухолевого потенциала.

1.8 Жирные кислоты

Топостатин (рисунок 1.12), выделенный из бактерии *Thermomonospora alba* является двойственным ингибитором топоизомераз I и II, при этом топостатин не стабилизирует ковалентный комплекс ДНК-TopI и не токсичен по отношению к опухолевым клеткам [171]. Топостатин представляет собой циклический псевдопептид с длинной боковой углеводородной цепочкой. Показано, что

ингибирующая активность топостатина зависит от рН и температуры и максимальна при рН = 6 и 28°C. Группами исследователей из различных бактерий выделены липид-содержащие аминокислоты и пептиды, проявляющие ингибирующую активность в отношении топоизомераз [172]. Например, **топостин В-572**, содержащийся в культуральной жидкости *Flexibacter topostinus*, является эффективным ингибитором топоизомеразы I [173]. Учитывая тот факт, что большое количество жирных кислот, фосфолипидов и церамид-сульфатов проявляют ингибирующую активность по отношению к топоизомеразе I, предполагается, что и липофильность и анионная природа соединения играют важную роль в процессе ингибирования фермента [174, 175]. Перечисленные ингибиторы топоизомераз взаимодействуют с ферментом в отсутствие ДНК.

В литературе имеется достаточно большое количество публикаций о жирных кислотах, проявляющих ингибирующую активность в отношении топоизомераз I и II [176-179].

J.H. Jung совместно с сотрудниками из актинобактерий *Streptomyces sp.*, содержащихся в морских губках, выделена смесь кислот нормального, изо- и антиизо-строения – штамм КМ86-9В, ингибирующих топоизомеразу I. Авторами показано, что, из числа испытанных кислот, наибольшую активность проявляют насыщенные С15–С17 кислоты изо- и антиизо структуры [180].

В работе К. Suzuki с соавтрами было изучено ингибирующее действие различных жирных кислот на топоизомеразы, а также исследованы закономерности влияния структуры жирных кислот на проявляемую ими активность и механизм их действия. Показано, что насыщенные жирные кислоты (С6-С22) не активны в отношении топоизомеразы I, в отличие от ненасыщенных кислот (С16-С21), содержащих в своей структуре одну *цис*-двойную связь, проявляющих высокую ингибирующую активность в отношении данного фермента. Выявлено, что сила ингибирования зависит как от длины цепи, так и от положения двойной связи в молекуле. *Транс*-изомер олеиновой кислоты и ее метиловый эфир не проявили ингибирующую активность к топоизомеразе I и II, тогда как из числа исследованных соединений, *цис*-петрозелиновая и *цис*-вакценовая кислоты (С18)

проявили наибольшую активность. Установлено, что петрозелиновая кислота, являясь ингибитором топоизомераз, действует непосредственно на фермент без интеркаляции в ДНК [181].

N.M. Carballeira совместно с сотрудниками разработали семистадийный метод синтеза природной (Z)-14-метил-9-пентадеценовой кислоты с конечным выходом 16%, которая ингибирует топоизомеразу I, выделенную из плаценты человека, в концентрации более 500 мкМ [182].

Эленовая кислота (R-2,4-диметил-22-(п-гидроксифенил)-докос-3(E)-еновая кислота) (рисунок 1.12), выделенная из индонезийской губки *Plakinastrella* (0.012 м.д. %) и охарактеризованная в 1995 P.J. Scheuer с сотрудниками [183] проявила выраженную цитотоксичность ($IC_{50} = 5-22$ мг/мл) в отношении опухолевых клеточных линий P-388, A-549, NUGC-3 и MEL-28, ингибирующую активность топоизомеразы I и II и выступает в качестве индикаторного фермента при лечении рака легких при 0.1 мкг/мл [184].

Эленовая кислота не взаимодействует непосредственно с ДНК. В работе Y. Mizushima показано, что она является ингибитором телячьей ДНК-полимеразы альфа ($IC_{50}=7.7$ мкМ) и крысиной ДНК-полимеразы бета ($IC_{50}=12.9$ мкМ). Эленовая кислота не проявила активности в отношении ДНК-полимеразы растений и прокариот, таких как ДНК полимеразы I кишечной палочки (*Escherichia coli*), или других ферментов, участвующих в метаболизме ДНК, таких как обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), РНК-полимеразы бактериофага T7 и бычьей дезоксирибонуклеазы I [185].

Пинелловая кислота (9S,12S,13S-тригидрокси-10E-октадеценовая кислота) (рисунок 1.12), выделенная из коры дерева *Tilia amurensis*, проявила сильную ингибирующую активность как по отношению к топоизомеразе I ($IC_{50}=4$ мкМ) так и по отношению к топоизомеразе II ($IC_{50}=3$ мкМ) *in vitro*, но не проявила цитотоксического эффекта в отношении клеточной линии аденокарциномы толстой кишки человека (HT-29), клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7) и клеточной линии карциномы печени человека (HepG-2) [186].

Алкиновые кислоты (рисунок 1.12), содержащиеся в корнях растений *Ximena americana*, *Pentagonia gigantifolia* и мн. др., привлекают внимание химиков и фармацевтов ввиду проявляемого ими широкого диапазона биологического действия (пестицидная, фунгицидная, антимикобактериальная, антипаразитарная, противогрибковая активности, ингибирующая активность лейкотриеновой В4-оксидазы и почечной СУР450 ω -гидроксилазы) [187-190].

В 2009 году N.M. Carballeira с коллегами разработали 4х стадийный метод синтеза встречающихся в природе ацетиленовых жирных кислот [191]. Осуществлен синтез 6-гептадециновой кислоты и 6-эйкозиновой кислоты, а также используя аналогичную синтетическую последовательность, были синтезированы (6Z)-гептадеценная кислота и (6Z)-эйкозеновая кислота. Из числа синтезированных кислот, 6-эйкозиновая кислота проявила наибольшую антипротозойную активность по отношению к *Leishmania donovani promastigotes* ($EC_{50} = 1-6$ мкг/мл). Показано, что n-гептадекановая и n-эйкозановая кислоты не проявляют активность в отношении *Leishmania donovani*, что указывает на то, что ненасыщенность (непредельность) жирных кислот является необходимым условием для проявления лейшманицидной активности. Также было показано, что (6Z)-эйкозеновая и 6-эйкозиновая кислоты являются ингибиторами *Leishmania DNA topoisomerase IB enzyme*. Стоит отметить что, это первое исследование жирных кислот, оценивающее их в качестве ингибиторов топоизомеразы I *Leishmania donovani* [191].

В 2012 году N.M. Carballeira с сотрудниками разработали препаративный метод получения 2-алкиновых кислот [192]. На основании разработанного метода осуществлен синтез 2-октадециновой кислоты (2-ОДК), 2-гексадециновой кислоты (2-ГДК) и 2-тетрадециновой кислоты (2-ТДК). Из числа синтезированных кислот, 2-ОДК показала наилучшую ингибирующую активность в отношении *Leishmania donovani* фермента *DNA topoisomerase IB enzyme* (LdTopIB) с $EC_{50} = 5.3 \pm 0.7$ мкМ и $IC_{50} = 11$ мкМ. Эффективность ингибирования кислот убывает ряду: 2-ОДК > 2-ГДК > 2-ТДК. Синтезированные кислоты показали слабую ингибирующую активность в отношении человеческой топоизомеразы IB (hTopIB). Таким образом,

установлено, что ингибирующая активность 2-алкиновых кислот в отношении LdTopIB зависит от длины цепи и наличия тройной связи [191, 192].

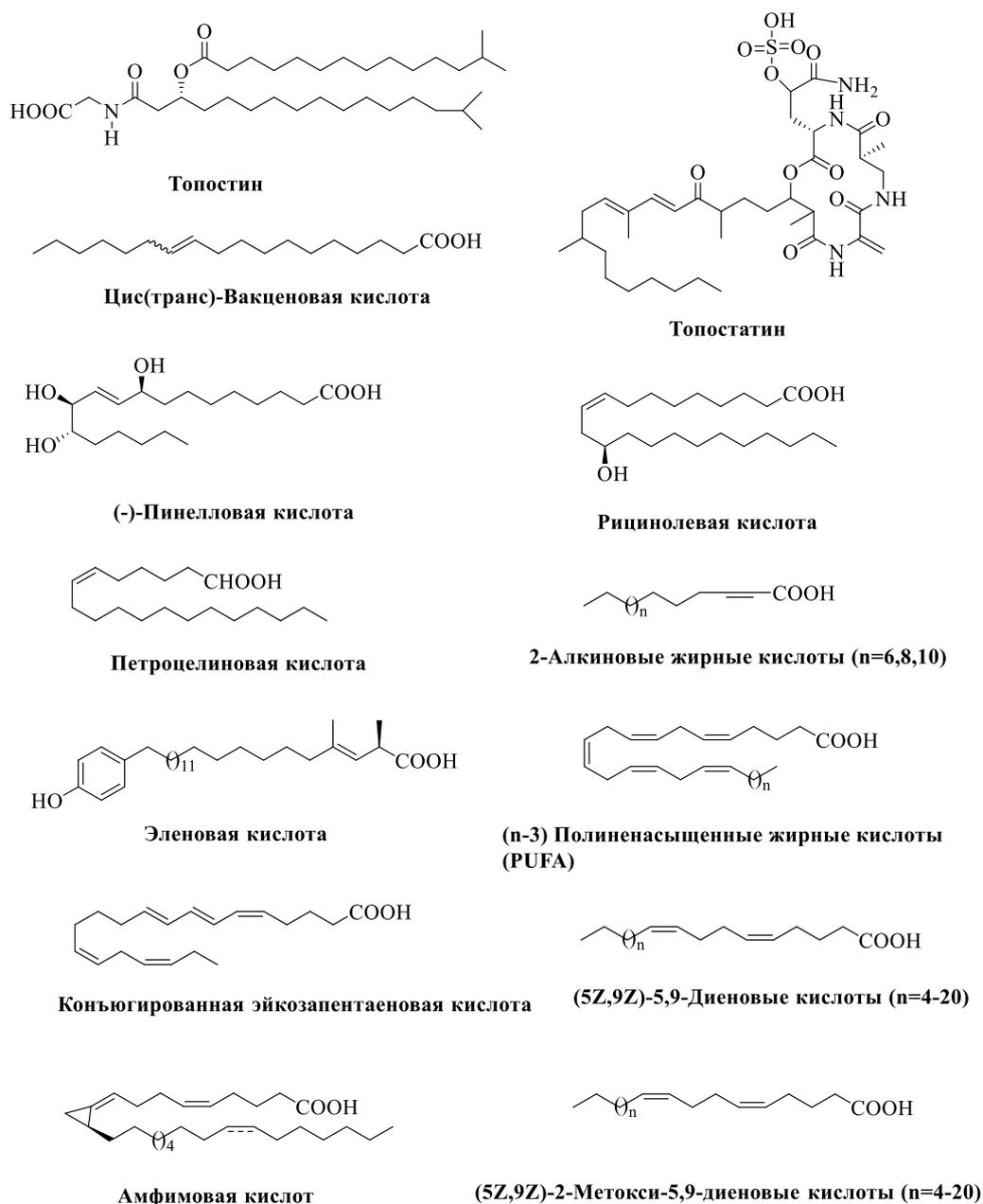


Рисунок 1.12 – Структуры некоторых жирных кислот, проявляющих ингибирующую активность в отношении топоизомераз I/II.

Конъюгированная эйкозапентаеновая кислота (сЕРА) (рисунок 1.12), содержащаяся в красных и зеленых водорослях, селективно ингибирует активность ДНК полимераз млекопитающих и топоизомераз человека [193]. Обнаружено, что сЕРА останавливает пролиферацию клеток линии HL-60 ($LD_{50}=12.5$ мкМ). Кислота индуцирует апоптоз клеток посредством блокирования реакции образования

топоизомеров и не способна стабилизировать активный комплекс ДНК–топоизомераза. Под действием сЕРА происходит арест клеточного цикла в G1/S-фазе, увеличивается уровень циклинов А и Е и блокируется процесс транспорта тимидина в клетки, что указывает на то, что сЕРА останавливает основной первичный этап репликации ДНК *in vivo* посредством дезактивации репликативных полимераз, а не топоизомераза [194].

С привлечением молекулярного докинга с целью изучения механизма взаимодействия молекулы сЕРА с Top1 показано, что карбоксильная группа образует стойкое взаимодействие с положительно заряженными аминокислотными остатками K443 и K587, а липофильная часть молекулы, локализуясь по поверхности белка, располагается во множестве гидрофобных карманах фермента [195]. Также было показано, что сЕРА проявляет антипаразитарную активность в отношении *Leishmania donovani* на стадии промастиготы [196].

Перспективной и чрезвычайно интересной группой липидов, проявляющих ингибирующее влияние на топоизомеразы являются **5Z,9Z-диеновые кислоты**. Эти вещества обнаружены в морских губках и растениях семейства голосеменных. 5Z,9Z-диеновые кислоты проявляют широкий спектр биологической и фармакологической активности, а именно, противовирусную, противомикробную, антипаразитарную и др. Показано, что длинноцепочечные 5Z,9Z-диеновые кислоты (C20-C30) являются ингибиторами человеческой топоизомеразы I [197].

В работе Т.Н. Макариева указано, что смесь (5Z,9Z)-23-метил-5,9-тетракозадиеновой и (5Z,9Z)-22-метил-5,9-тетракозадиеновой кислот проявила цитотоксическую активность в отношении опухолевой клеточной линии карциномы Эрлиха мышей [198].

N.M. Carballeira с соавторами осуществлен 6-ти стадийный синтез природной (5Z,9Z)-5,9-гексадекадиеновой кислоты, которая полностью ингибирует топоизомеразу I человека в концентрации 800 мкМ, тогда как 5,9-гексадекадиеновая и гексадекановая кислоты не проявляют ингибирующую активность по отношению к ферменту (>1000 мкМ). Установлено, что геометрия

цис-двойной связи оказывает влияние на активность ингибирования топоизомеразы I [199].

Короткоцепочечные (C16-C19) 5Z,9Z-диеновые кислоты, в свою очередь, проявляют низкую ингибирующую активность по отношению к топоизомеразе I, но показывают хорошие результаты в качестве антимикробных агентов в отношении грамположительных бактерий. Так, (5Z,9Z)-14-метил-5,9-пентадекадиеновая кислота, впервые выделенная из карибского гаргона *Eunicea succinea*, проявляет антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) (MIC=0,24 ммоль/мл) и фекального стрептококка (*Streptococcus faecalis*) (MIC= 0,16 ммоль/мл), но оказалась неактивной по отношению грамотрицательных бактерий [200].

На основании вышеизложенного, а также учитывая тот факт, что 5Z,9Z-диеновые кислоты проявляют низкий показатель токсичности, данная группа соединений является крайне перспективной для дальнейшего изучения и формирования на их основе новых эффективных лекарственных препаратов [201].

В развитие химических исследований в области разработки методов синтеза, идентификации, изучения активности жирных 5Z,9Z-диеновых кислот значительный вклад внесли группы исследователей под руководством N. Carballeira, Y. Sakagami, C. Djerassi, D. Raederstorff и др [200-205].

Главным сдерживающим фактором для дальнейшего развития исследований в области синтеза и изучения биологической активности отдельных 5Z,9Z-диеновых кислот, является отсутствие универсальных препаративных методов их синтеза. Известные методы многостадийны (6–20 стадий) и, в основном, сопровождаются образованием смеси стереоизомеров, а выход целевого продукта реакции не превышает 0.5–15% [179].

1.9 Заключение по литературному обзору

Анализ литературных данных о природных соединениях (алкалоидах, жирных кислотах, флавоноидах, полифенолах, нафтохинонах и др.) и их полусинтетических аналогах, ингибиторах топоизомераз I и/или II, позволяет

сделать вывод о том, что ДНК-модифицирующие ферменты топоизомеразы являются важными внутриклеточными мишенями при разработке перспективных для медицины противоопухолевых агентов, и понимание механизма их функционирования очень важно как для фундаментальной науки, так и для прикладных практических аспектов использования таких соединений. Глубокое понимание работы ДНК-модифицирующих ферментов с точки зрения соединений, на них влияющих, приближает нас к пониманию механизмов канцерогенеза, а также рождает новые направления исследований, способных дать начало уникальным знаниям в химии, биологии, медицине. Топоизомеразы регулируют основные процессы жизнедеятельности клеток (транскрипция, репликация, митоз, репарация нуклеиновых кислот и т.д.). Данный класс ферментов способен релаксировать суперспирализованные (суперскрученные) молекулы ДНК путём введения одно- или двуцепочечных разрывов с последующим лигированием (восстановлением), то есть контролировать степень суперскрученности ДНК во время различных клеточных процессов. Если этот фермент ингибирован, клетки становятся нежизнеспособными и дальнейшая пролиферация, и рост, становится невозможными.

Селективное регулирование активности фермента топоизомеразы I/II 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.

Ингибиторы топоизомеразы обнаружены среди многочисленных классов природных, полусинтетических и синтетических соединений. В результате проведенного анализа литературы показано, что на протяжении многих лет различными группами исследователей ведется постоянный поиск новых эффективных противоопухолевых соединений, а также осуществляется структурная модификация известных противоопухолевых соединений, проявляющих ингибирующую активность по отношению к топоизомеразе I и II.

Представленные в литературном обзоре сведения о природных ингибиторах топоизомеразы I/II свидетельствуют о том, что жирные 5Z,9Z-диеновые кислоты являются крайне перспективной группой соединений для дальнейшего изучения и формирования на их основе новых эффективных лекарственных препаратов, т.к. они принадлежат к группам неспецифических ингибиторов ферментов, и, как следствие, не приводят к необратимому повреждению ДНК, обладают низкой токсичностью.

Главным сдерживающим фактором для дальнейшего развития исследований в области синтеза и изучения активности 5Z,9Z-диеновых кислот является отсутствие универсальных препаративных методов их синтеза.

Таким образом, на основании вышеизложенного, разработка принципиально нового эффективного метода направленного синтеза непредельных алифатических 5Z,9Z-диеновых карбоновых кислот и их производных с высокой степенью стереочистоты, а также понимание основных закономерностей влияния структуры синтезируемых соединений на проявляемую ими ингибирующую активность по отношению к ферменту топоизомеразе является важнейшей и актуальной задачей органической и медицинской химии и открывает новые перспективы для получения широкого круга соединений, обладающих высоким прикладным значением для фундаментальной науки.

ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

ДНК-зависимые ферменты топоизомеразы, катализирующие топологические преобразования ДНК и играющие ключевую роль во всех аспектах функционирования генома, являются одним из важнейших ферментов, участвующих в клеточном цикле [206]. В настоящее время ведется интенсивный поиск и отбор природных ингибиторов топоизомераз I и II, разрабатываются новые синтетические аналоги и полусинтетические производные известных противоопухолевых соединений, способные изменять каталитическую активность ферментов за счет стабилизации ДНК-белковых комплексов [207].

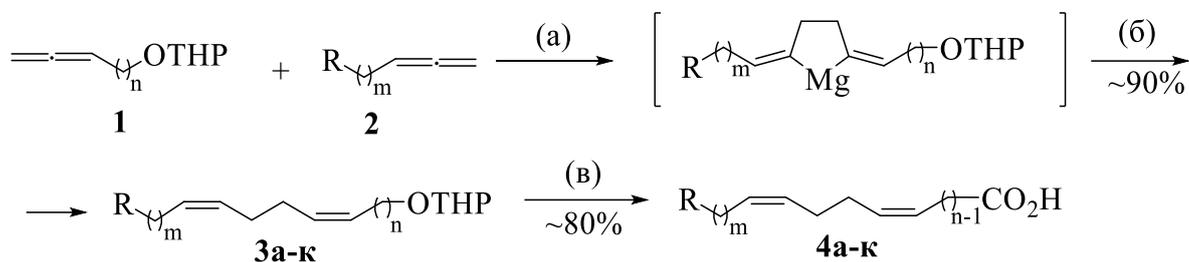
Ранее несколькими исследовательскими группами было показано, что $5Z,9Z$ -диеновые жирные кислоты обладают большим потенциалом для решения указанной проблемы и одновременно проявляют противомаларийную, противотуберкулезную, противомикробную и противовирусную активность, сопровождающуюся низкой токсичностью, что делает этот класс соединений достаточно привлекательной базой для разработки современных фармацевтических препаратов [201, 208-215]. По нашему мнению, дальнейшее изучение и применение $5Z,9Z$ -диеновых кислот с целью создания эффективных лекарственных препаратов сдерживается, в том числе, отсутствием препаративных методов их синтеза; известные методы состоят из множества стадий (4–20 стадий) и дают целевые продукты с выходами 0,5–15 %, чаще всего в виде смесей стереоизомеров [216]. Ранее авторами был разработан стереоселективный метод синтеза природных и синтетических $5Z,9Z$ -диеновых кислот с высокими выходами (61–67%) и высокой селективностью (98%), основанный на новой межмолекулярной каталитической реакции перекрестного цикломагнетирования концевых алифатических и O-содержащих 1,2-диенов реактивами Гриньяра в

присутствии катализатора Cr_2TiCl_2 . Кроме того, установлена высокая активность ингибирования топоизомеразы I человека (5Z,9Z)-5,9-эйкозодиеновой кислотой в концентрациях выше 0,1 мкМ [211-212]. В рамках существующей идеологии исследований ниже представлены результаты, являющиеся логичным продолжением работ по созданию новых эффективных методов синтеза высших диеновых кислот с различным положением 1Z,5Z-диеновой группы по отношению к карбоксильной группе и исследована связь между строением кислоты и активностью в ингибировании топоизомераз hTop1 и hTop2 α .

Опираясь на ранее полученные результаты по перекрестному цикломагнетированию O-содержащих и алифатических 1,2-диенов [208-210, 217-218], 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 Cr_2TiCl_2 -катализируемое кросс-цикломагнетирование тетрагидропирановых эфиров алкадиен-1-олов **1** с терминальными алифатическими алленами **2**, индуцированное EtMgBr в условиях (1:2:EtMgBr:Mg:[Ti] = 10:12:40:32:0.5; Et₂O, 6 ч, 20–22 °C) с образованием 2,5-диалкилиденмагнеза-циклопентанов, 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 **4a–k** с заданным 1Z,5Z-положением диеновой группы по отношению к карбоксильной группе с выходами 61–75 % и стереоселективностью 98 % (схема 2.1).

При изучении каталитического цикломагнетирования 1,2-диенов мы обнаружили, что строение тетрагидропирановых эфиров алкадиен-1-олов **1** и длина концевой 1,2-диена **2** существенно не влияют на выход и селективность образования эфиров тетрагидропирана **3**. Строение соединений **3** и **4** подтверждено данными одномерного (¹H, ¹³C)- и двумерного (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) ЯМР экспериментов и масс-спектрометрии. Стереохимическая чистота и цис-конфигурация двойных связей в полученных 1,5-диенах доказаны на основании

наличия в спектре ЯМР ^{13}C сильнополюсных сигналов внутренних аллильных атомов углерода при ~ 27 ppm, что указывает на наличие цис-диенов – взаимодействие с внешними аллильными атомами углерода [219].



Реагенты и условия: а): EtMgBr, Mg, [Ti]; б): H_3O^+ ; в): реагент Джонса, [Ti] = Cr_2TiCl_2 (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 2.1 – Новый универсальный метод синтеза высших $nZ,(n+4)Z$ -диеновых кислот **4**

Учитывая полученные нами ранее результаты и литературные данные об ингибирующей активности $5Z,9Z$ -диеновых кислот в отношении топоизомеразы I человека и об исключительно высокой ингибирующей активности $(5Z,9Z)$ -5,9-эйкозодиеновой кислоты в отношении hTop1, мы попытались определить влияние положения $1Z,5Z$ -диеновой группы относительно карбоксильной группы в синтезированных кислотах на активность ингибирования топоизомераз I и II человека [200-201, 215-216]. Отметим, что к началу наших исследований данные об ингибировании топоизомеразы II человека диеновыми жирными кислотами отсутствовали. На следующем этапе исследования мы изучили способность диеновых кислот **4** (таблица 2.1) ингибировать ферменты топоизомеразы I и II *in vitro* при релаксации суперспирализованной плазмидной ДНК в стандартных условиях (рисунок 2.1 и 2.2, соответственно).

Проведенное исследование позволило не только найти среди этих соединений активные ингибиторы топоизомераз I и II, но и выяснить связь между их структурой и ингибирующей активностью, что определяет наиболее перспективные пути химической модификации соединений с целью усиления их химиотерапевтических свойств.

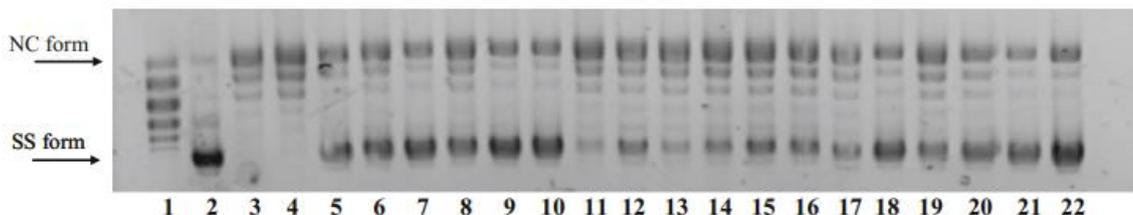


Рисунок 2.1 – Электрофореграмма продуктов релаксации *in vitro* суперспирализованной плазмидной ДНК под действием топоизомеразы I («Тороген», США) в присутствии (3Z,7Z)-эйкоза-3,7-диеновой **4е**, (6Z,10Z)-эйкоза-6,10- диеновой **4ж**, (7Z,11Z)-эйкоза-7,11-диеновой **4з**, (11Z,15Z)-эйкоза-11,15-диеновой **4и** и (11Z,15Z)-октакоза-11,15-диеновой **4к** кислот (соединение вводили до добавления топоизомеразы I). (Дорожка 1) релаксированная плазмидная ДНК (рНОТ1); (дорожка 2) суперспирализованная плазмидная ДНК (рНОТ1); (дорожка 3) суперспирализованная плазмидная ДНК+топоизомераза I (1 ед.); (дорожка 4) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I+ДМСО (1 мкМ); (дорожки 8–10) суперспирализованная плазмидная ДНК+топоизомераза I (1 ед.) + соединение **4е** в концентрации 50, 100, 250 мкМ; (дорожки 11–13) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I (1 ед.) + соединение **4ж** в концентрации 50, 100, 250 мкМ; (дорожки 14–16) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I (1 ед.) + соединение **4з** в концентрации 50, 100, 250 мкМ; (дорожки 17–19) суперспирализованная плазмидная ДНК+топоизомераза I (1 ед.) + соединение **4и** в концентрации 50, 100, 250 мкМ; (дорожки 20–22) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I (1 ед.) + соединение **4к** в концентрации 50, 100, 250 мкМ. (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 2.1, дорожки 3, 4).

В присутствии кислот **4е–к** заметное ингибирование наблюдалось уже при концентрации 50 мкМ, что проявлялось в сохранении остаточных количеств суперспирализованной ДНК по сравнению со суперспирализованной 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 (3Z,7Z)-эйкоза-3,7-диеновая (**4е**), (6Z,10Z)-эйкоза -6,10-диеновая (**4ж**), (7Z,11Z)-эйкоза-7,11-диеновая (**4з**), (11Z,15Z)-эйкоза-11,15-диеновая (**4и**), (11Z,15Z)-октакоза-11,15-диеновая (**4к**) 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).

На рисунке 2.2 представлены результаты электрофореза продуктов релаксации рНОТ1, индуцированной топоизомеразой II, в присутствии кислот **4б**, **4е–к**. 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. 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).

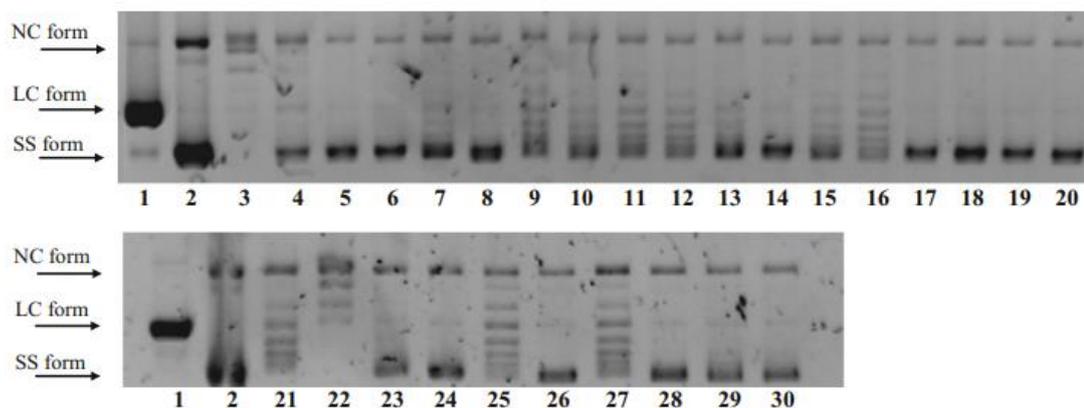


Рисунок 2.2 – Электрофореграмма продуктов релаксации *in vitro* суперспирализованной плазмидной ДНК под действием топоизомеразы IIα («Тороген», США) в присутствии (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой **4б**, (3Z,7Z)-эйкоза-3,7-диеновой **4е**, (6Z,10Z)-эйкоза-6,10- диеновой **4ж**, (7Z,11Z)-эйкоза-7,11-диеновой **4з**, (11Z,15Z)-эйкоза-11,15-диеновой **4и** и (11Z,15Z)-октакоза-11,15-диеновой **4к** кислот. (Дорожка 1) линейная ДНК (рНОТ-1); (дорожка 2) суперспирализованная плазмидная ДНК (рНОТ1); (дорожка 3) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 ед.); (дорожка 4) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза II + этопозид (100 мкМ) – положительный контроль; (дорожки 7–10) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 ед.) + соединение **4е** в концентрации 0,1, 1, 50, 100 мкМ; (дорожки 11–14) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 ед.) + соединение **4ж** в концентрации 0,1, 1, 50, 100 мкМ; (дорожки 15–18) суперспирализованная плазмидная ДНК+топоизомераза II (1 ед.) + соединение **4и** в концентрации 0,1, 1, 50, 100 мкМ; (дорожки 19, 20) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 ед.) + соединение **4з** в концентрации 0,1 и 1 мкМ; (дорожки 23–26) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 ед.) + соединение **4б** в концентрации 0,1, 1, 0,01, 100 мкМ; (дорожки 27–30) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 ед.) + соединение **4к** в концентрации 0,1, 1, 50 и 100 мкМ.

(NC-form – открытая форма плазмиды, NL-form – линейная форма плазмиды, SS-form – суперспирализованная форма плазмиды)

Для выяснения механизма действия полученных соединений было проведено компьютерное молекулярное моделирование с использованием трехмерной модели связывания тестируемого соединения с активными центрами топоизомеразы I, II α и с ДНК, полученной кристаллографическими методами [220-223] (модель основана на данных рентгеновской дифракции, идентификатор PDB: 1Z2B). Осуществлен молекулярный докинг десяти тестируемых соединений в сайты связывания топоизомеразы I, II α и ДНК. Исследование проведено с использованием программы AutoDock Vina (с учетом конформационной подвижности лигандов). Использовали комплексы топоизомераза-лиганд-ДНК с лучшими значениями скоринговых функций, рассчитанных по указанной программе (таблица 2.1). Известно, что при взаимодействии ингибиторов с лабильными комплексами топоизомераза I – ДНК и топоизомераза II – ДНК, камптотecin и этопозид стабилизируют данные комплексы и тем самым предотвращают лигирование одно- или двухцепочечных расщеплений ДНК и, следовательно, специфически ингибируют каталитическую активность топо I и топо II. Между тем низкомолекулярные ДНК-лиганды, изменяющие конформацию ДНК и/или препятствующие связыванию фермента с дуплексом, также способны предотвращать образование топоизомеров ДНК, замедляя каталитический цикл фермента. Ингибиторы активности топо I этого типа, являясь супрессорами работы ферментов, действуют по неспецифическому механизму ингибирования. 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.

Таблица 2.1 – Значения молекулярного докинга исследуемых соединений с топоизомеразы I и II α и малой бороздкой ДНК

№	Соединение	hTop1 актив- ность	Степень связывания, (ДНК), ккал/моль	Степень связывания (hTop1), ккал/моль	hTop2 активность	Степень связывания (hTop II α + ДНК), ккал/моль	Структура
1	(5Z,9Z)-Гексадека-5,9-диеновая кислота (4а)	+	-4.8	-5.8	Нет данных	-4.8	
2	(5Z,9Z)-Эйкоза-5,9-диеновая кислота (4б)	+++	-5.2	-5.9	+	-5.0	
3	(5Z,9Z)-Докоза-5,9-диеновая кислота (4в)	++	-	-	Нет данных	-	
4	(5Z,9Z)-Гептакоза-5,9-диеновая кислота (4г)	++	-5.4	-5.8	Нет данных	-4.8	
5	(5Z,9Z)-Октакоза-5,9-диеновая кислота (4д)	++	-	-	Нет данных	-	
6	(3Z,7Z)-Эйкоза-3,7-диеновая кислота (4е)	+	-5.4	-6.0	+	-4.8	
7	(6Z,10Z)-Эйкоза-6,10-диеновая кислота (4ж)	+	-5.1	-6.2	+	-5.0	
8	(7Z,11Z)-Эйкоза-7,11-диеновая кислота (4з)	+	-5.1	-5.9	+	-5.3	
9	(11Z,15Z)-Эйкоза-11,15-диеновая кислота (4и)	+	-5.0	-5.8	+	-5.0	
10	(11Z,15Z)-Октакоза-11,15-диеновая кислота (4к)	+	-4.1	-5.8	+	-4.5	

+++ – сильное ингибирование активности топоизомеразы (>75%); ++ – среднее ингибирование (25-); + – слабое ингибирование (<25%).

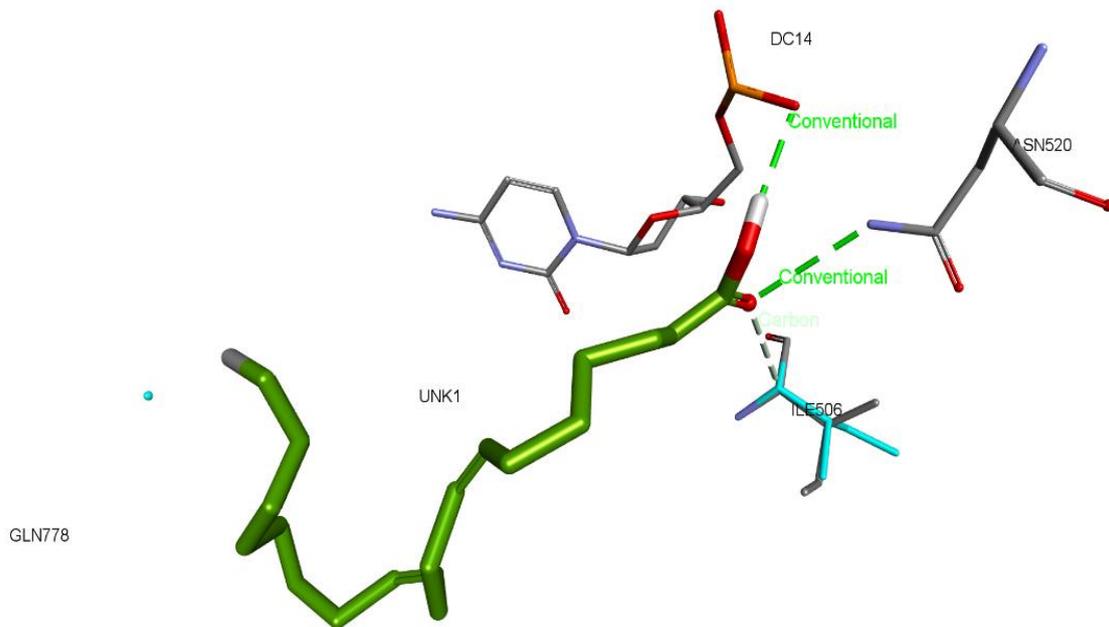


Рисунок 2.3 – Докинг (7Z,11Z)-эйкоза-7,11-диеновой кислоты в сайт связывания ДНК (N-ворота) с топоизомеразой II α (большинство атомов водорода не показано)

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.

2.2 Стереоселективный синтез (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты и исследование ее ингибирующей активности в отношении топоизомеразы I и II α человека

В развитие проводимых исследований нами была выдвинута идея о необходимости введения в молекулы 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

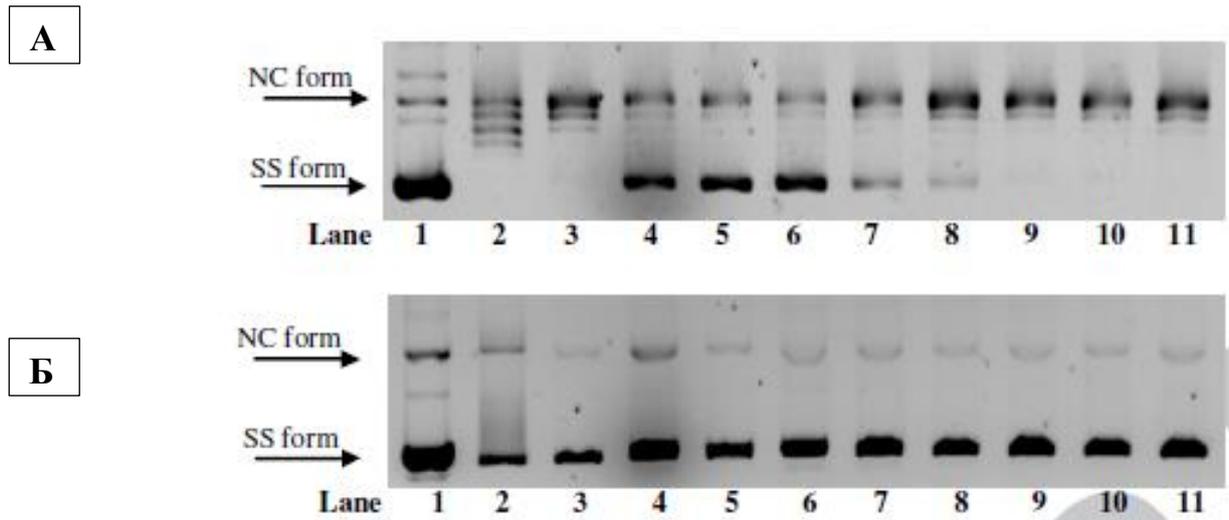


Рисунок 2.4. – Электрофореграмма продуктов релаксации 250 нг плазмидной ДНК (pHOT1) *in vitro* под действием топоизомеразы I (набор Topoisomerase I Drug Screening Kit TG-1018-2, Topogen, USA) в присутствии (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты **7** (вещество внесено перед добавлением фермента топоизомеразы I). **А)** Показаны фотографии без окраски бромидом этидия. (Дорожка 1) релаксированная плазмидная ДНК (pHOT-1); (дорожка 2) суперспирализованная плазмидная ДНК (pHOT1); (дорожка 3) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I (4 единицы); (дорожка 4) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I + камптотецин (100 мкМ) – положительный контроль; (дорожки 5-11) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I (4 единицы) + соединение **7** при концентрации 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.08, 0.06 мкМ. **Б)** Гель, окрашенный бромистым этидием. (Дорожка 1) релаксированная плазмидная ДНК (pHOT-1); (дорожка 2) суперспирализованная плазмидная ДНК (pHOT1); (дорожка 3) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I (4 единицы); (дорожка 4) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I + камптотецин (100 мкМ) – положительный контроль; (дорожки 5-11) суперспирализованная плазмидная ДНК + топоизомераза I (4 единицы) + соединение **7** при концентрации 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.08, 0.06 мкМ (NC-form – открытая форма плазмиды, SS-form – суперспирализованная форма плазмиды)

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 может быть связано с прямым взаимодействием соединения **7** с молекулой ДНК, изменяющим ее молекулярную форму (конформацию), в отличие от механизма действия камптотецина. Поскольку известно, что некоторые вещества взаимодействуют с ДНК, 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 (**4б** 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 рНОТ1 (рисунок 2.5). Как общепринято, расщепление ДНК контролируется релаксацией суперспирализованной кольцевой конформационной формы (SS-формы) ДНК плазмиды рНОТ1 до разорванной кольцевой формы (NC-формы) и линейной конформационной формы (LC-формы). В экспериментах по гель-электрофорезам, воздействующим на суперспирализованную кольцевую конформацию, наиболее быстрая миграция будет наблюдаться для ДНК формы SS. После расщепления одной нити суперспираль расслабляется, образуя более медленно движущуюся конформацию с надрезом. Если обе цепи расщеплены, будет создана линейная конформация, которая мигрирует между ними.

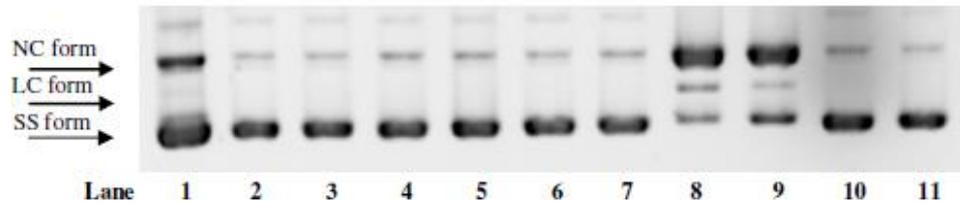


Рисунок 2.5 – Модификация электрофоретической подвижности суперспиральной плазмидной ДНК рНОТ1 при инкубации (30 мин, 37 °С) с различными концентрациями соединений **46**, **7**, камптотецина (СРТ) и этопозида (VP16).

Концентрации (в мкМ): (*дорожка 1*) необработанная суперспиральная плазмидная ДНК рНОТ1; (*дорожки 2-5*, инкубированные с соединением **46**): 5, 50, 250, 500; (*дорожки 6-9*, инкубированные с соединением **7**): 5, 50, 250, 500; (*дорожка 10*, инкубированная с камптотецином) 50; (*дорожка 11*, инкубация с этопозидом) 50 (NC-form – открытая кольцевая форма плазмиды, NL-form – линейная конформационная форма плазмиды, SS-form – ковалентно закрытая форма плазмиды)

На рисунке 2.5 показано, что соединение **7** способно достаточно эффективно релаксировать ДНК плазмиды рНОТ1 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 рНОТ1, 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 2.5, *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 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 2.6) [220]. 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 2.6).

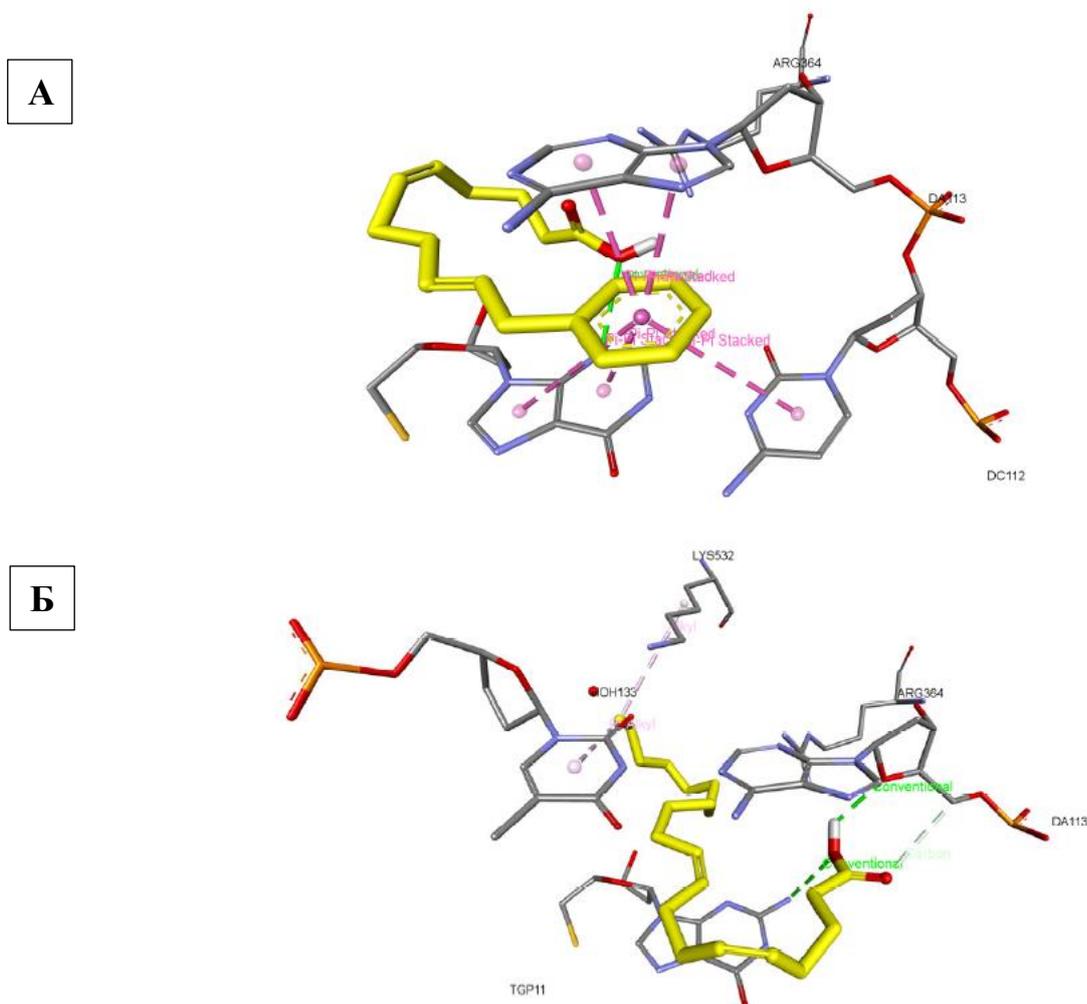


Рисунок 2.6 – Докинг (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты **7** (А) и (5Z,9Z)-5,9-эйкозадиеновой кислоты **46** (Б) в активном центре топоизомеразы I (водородные связи показаны пунктирными линиями, желтым – структура лиганда)

Сравнение расположения кислоты **7** и (5Z,9Z)-5,9-эйкозадиеновой кислоты **46**, синтезированной нами ранее [205], 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 2.6). 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. Молекулярный докинг (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты **7** и (5Z,9Z)-5,9-эйкозадиеновой кислоты **46** и некоторых связывающих лигандов с малой бороздкой ДНК (дистамицин, нетропсин и DAPI) проведенный на соответствующей компьютерной модели взаимодействия с ДНК [224] показал, что молекулы как дистамицина, так и нетропсина взаимодействуют с пуринами молекулы ДНК, прежде всего, через атомы азота, расположенные между имидазольными группами. Гидрофобное взаимодействие DAPI с пуриновыми группами ДНК происходит, по нашим данным, несколько иным путем, а именно, между пуринами и бензимидазольной группой образуются водородные связи. При взаимодействии кислот **46** и **7** с ДНК водородные связи образуются только через карбоксильные группы (рисунок 2.7). Пространственные гидрофобные взаимодействия кислот **46** и **7**, по нашему мнению, развиты недостаточно, поскольку длинные цепи диеновых кислот не стремятся располагаться вдоль малых борозд ДНК, а сворачиваются, образуя компактные структуры, как показано на рисунке 2.7.

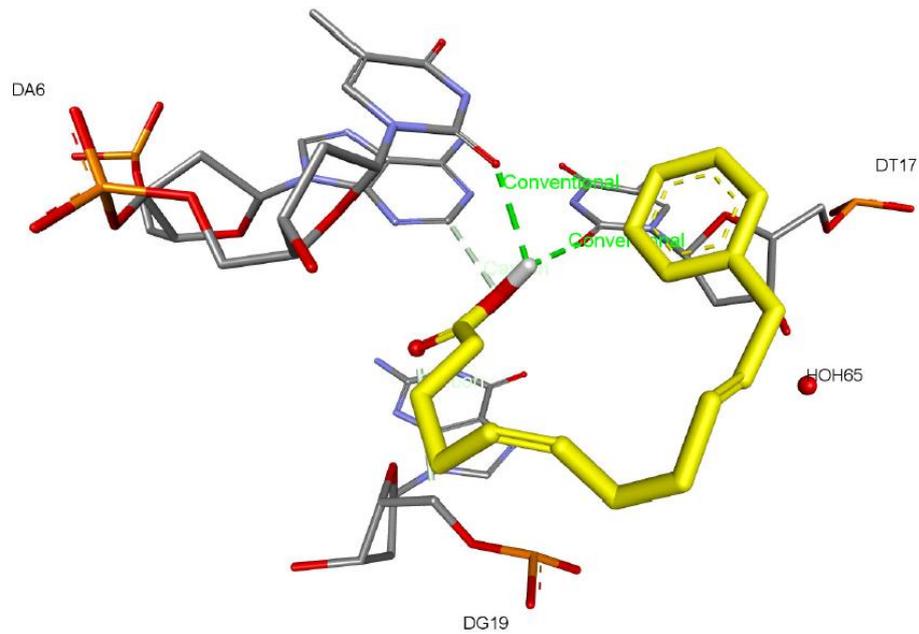


Рисунок 2.7 – Докинг кислоты **7** в малой бороздке ДНК (некоторые водородные связи показаны пунктирными линиями, желтым – структура лиганда)

Значение IC_{50} , которое представляет собой концентрацию ингибитора, предотвращающую релаксацию 50% количества суперспирализованной ДНК, использовалось для сравнения ингибирующего действия кислот **46** и **7**, на активность топоизомеразы I [225]. Значение IC_{50} кислоты **46** составляет 0,81 мкМ, а значение IC_{50} кислоты **7** составляет 0,67 мкМ, что согласуется с литературными данными об ингибирующей активности природных 5Z,9Z-диеновых кислот [203]. 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 2.8).

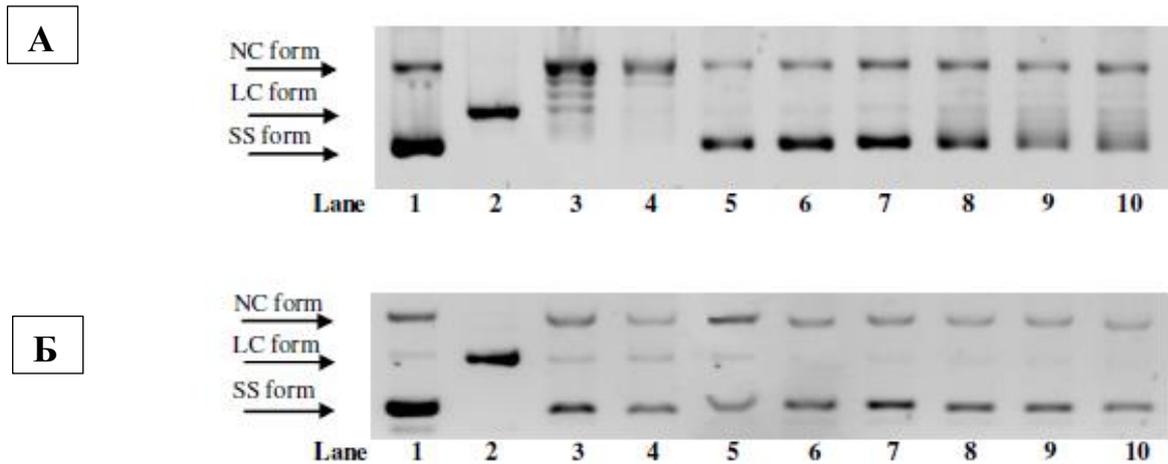


Рисунок 2.8. – Электрофореграмма продуктов релаксации 250 нг плазмидной ДНК (pHOT1) *in vitro* под действием топоизомеразы II, (ToroGen, USA) в присутствии (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты **7** (вещество внесено перед добавлением фермента топоизомеразы II). А) Гель, окрашенный бромистым этидием после электрофоретического разделения суперспирализованной, релаксированной, открытой кольцевой и линейной формы плазмиды. (Дорожка 1) суперспирализованная плазмидная ДНК (pHOT1); (дорожка 2) линейная ДНК (pHOT-1); (дорожка 3) суперколизованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 единица); (дорожка 4) суперспиральная плазмидная ДНК + топоизомераза II + этопозид (100 мкМ) – положительный контроль; (дорожки 5-10) суперколизованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 единица) + соединение **7** в концентрации 5, 1, 0,5, 0,1, 0,08, 0,06 мкМ. Б) Гель, содержащий бромистый этидий. (Дорожка 1) суперколиевая плазмидная ДНК (pHOT1); (дорожка 2) релаксированная плазмидная ДНК (pHOT-1); (дорожка 3) суперколизованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 единица); (дорожка 4) суперколизованная плазмидная ДНК + топоизомераза II + этопозид (100 мкМ) – положительный контроль; (дорожки 5-10) суперколизованная плазмидная ДНК + топоизомераза II (1 единица) + соединение **7** в концентрации 5, 1, 0,5, 0,1, 0,08, 0,06 мкМ. (NC-form – открытая форма плазмиды, NL-form – линейная форма плазмиды, SS-form – суперспирализованная форма плазмиды)

Результаты, представленные на рисунке 2.8 (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 2.8, дорожки 5-10, гель с содержанием этидия бромида при электрофоретическом разделении конформеров плазмиды). При разделении продуктов этой реакции методом гель-электрофореза с бромидом этидия (рисунок 2.8, гель с содержанием этидия бромида 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 (рисунок 2.9, результаты молекулярного докинга), так и более активным действием кислоты **7** на топоизомеразу II, а именно, взаимодействием 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 (таблица 2.2) [220].

Таблица 2.2. – Значения минимальной энергии связи исследуемых соединений с топоизомеразой I, II и малой бороздкой ДНК

Соединение	Предсказанная энергия связи (h_{Top1}), ккал/моль	Предсказанная энергия связи (малая бороздка ДНК) ккал/моль	Предсказанная энергия связи ($h_{Top II} + ДНК$), ккал/моль
Кислота 46	5.9	5.4	5
Кислота 7	7	5.4	5.4

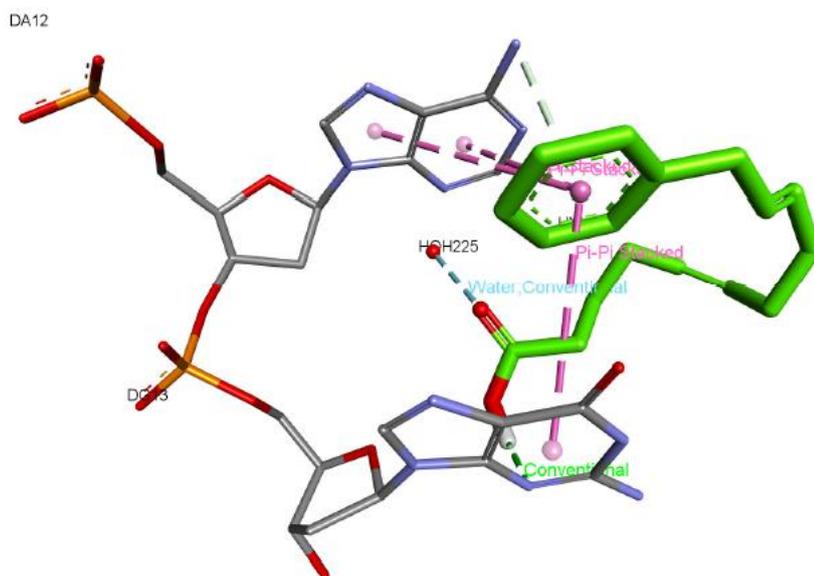


Рисунок 2.9. – Докинг кислоты **7** в сайте связывания ДНК (N-ворот) с топоизомеразой II (большая часть атомов водорода не показана)

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 (рисунок 2.9). Из литературы известно, что механизм действия митоксантрона аналогичен механизму действия антрациклинов: они повышают концентрацию ковалентного интермедиата (ДНК-топоизомеразы II) в клетке и таким образом блокируют топоизомеразу II как ковалентный аддукт и оставляют ДНК в состоянии двухцепочечного расщепления, скрытое молекулой фермента [226]. Сравнение положений (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты и митоксантрона в активном центре топоизомеразы II и модели ДНК показывает, что в кислоте **7** присутствует липофильная ароматическая группа, как и антрахиноновый фрагмент митоксантрона, взаимодействует с пуринами и пиримидинами ДНК посредством дополнительных взаимодействий. Митоксантрон также образует благоприятные

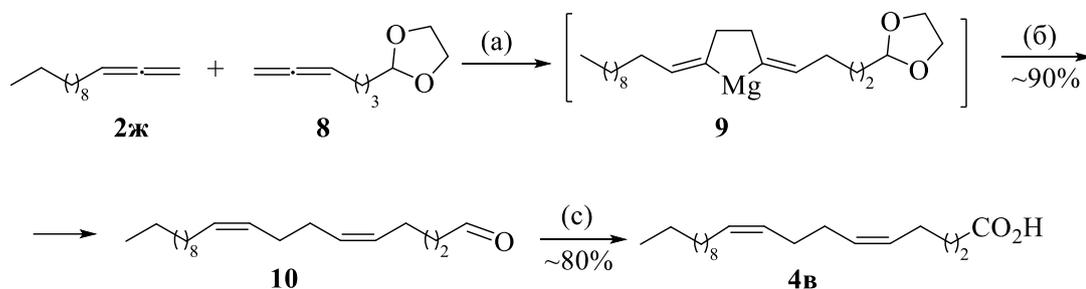
гидрофобные контакты с Asn520, Glu522, Gln778 и Arg503 в активном центре топоизомеразы по данным компьютерного докинга.

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.

2.3 Альтернативные методы синтеза природных 5Z,9Z-диеновых кислот

В продолжение исследований нами разработан новый подход к стереоселективному синтезу диеновых кислот с заданным расположением 1Z,5Z-диеновой группировки относительно карбоксильной группы и позволяющий синтезировать диеновые альдегиды **10** в одну препаративную стадию с выходами ~80-90%. При взаимодействии алифатических 1,2-диенов с алленами, содержащими терминальный 1,3-диоксолановый фрагмент **8** в реакции кросс-цикломагнитирования с использованием активированного металлического Mg (акцептор ионов галогена) и этилмагнийбромида, под действием катализатора

Cr_2TiCl_2 (5 моль%) и дальнейшего кислотного гидролиза магнезациклопентана **9**, образующегося *in situ*, образуется альдегид **10**. В результате окисления **10** реактивом Джонса ($\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$) с выходом от ~70-80% селективно образуется карбоновая кислота **4в** (схема 2.3).

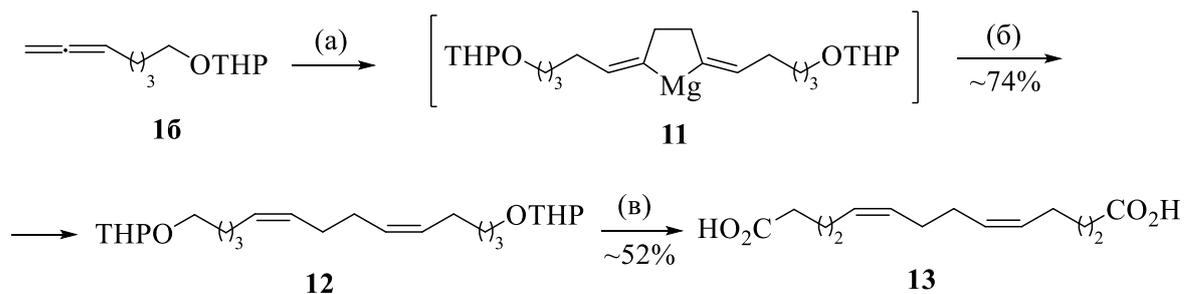


Реагенты и условия: (а): EtMgBr , Mg , Cr_2TiCl_2 (5 mol%), Et_2O ; (б): 1) $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{H}_2\text{O}$; 2) $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}(\text{H}_3\text{O}^+)$; (в): $\text{H}_2\text{CrO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$, ацетон, CH_2Cl_2 .

Схема 2.3 – Альтернативный подход синтеза диеновых кислот с заданным расположением 1Z,5Z-диеновой группировки

Разработанный и описанный подход позволил увеличить выход целевых кислот, а также синтезировать в одну препаративную стадию диеновый альдегид.

На следующем этапе исследования в целях реализации альтернативного подхода получения производных 5Z,9Z-диеновых кислот нами разработан метод синтеза (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диовой кислоты кислоты **13**, включающий в себя две стадии (схема 2.4). Первая стадия реакции основана на проведении реакции гомо-циклометаллирования тетрагидропиранового эфира 5,6-гепта-5,6-диен-1-ола **16** с использованием активированного металлического Mg порошка в качестве акцепторов галогенид-ионов, этилмагнийбромид, катализируемой Cr_2TiCl_2 (5 моль%). Дальнейший кислотный гидролиз магнезациклопентана **11**, образующегося *in situ*, приводит к образованию 1,14-бис-тетрагидропиранил-5Z,9Z-диен-1,14-диола 15,20-[(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диилбис(окси)] бистетрагидро-2H-пирана **12** с выходом 74%. Вторая стадия реакции основана на окислении соединения **12** реактивом Джонса ($\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$), что приводит к образованию целевой (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диовой кислоты **13**. Выход целевого продукта реакции составляет не более 52% (схема 2.4).



Реагенты и условия: (а): EtMgBr, Mg, Cp₂TiCl₂ (5 mol%), Et₂O; (б): H₃O⁺; (в): H₂CrO₄/H₂SO₄, ацетон, CH₂Cl₂.

Схема 2.4 – Двухстадийный метод синтеза (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диовой кислоты

Опираясь на полученные результаты, разработанный нами подход к получению 5Z,9Z-дикарбоновых кислот, через стадию образования сложных эфиров, в последующем был успешно применен при осуществлении синтеза ряда 5Z,9Z-диеновых кислот, содержащих в своей структуре алифатический и ароматический фрагменты.

Таким образом, нами разработан альтернативный способ стереоселективного синтеза 5Z,9Z-диеновых кислот, основанный на применении на ключевой стадии новых реакций Ti-катализируемого гомо- и кросс-цикломагнирования.

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

В развитие проводимых исследований, основываясь на разработанной авторами ранее оригинального каталитического метода синтеза диеновых кислот, был осуществлен синтез библиотек 5Z,9Z-диеновых кислот с целью изучения полученных образцов *in vivo* на проявляемую ими противоопухолевую активность.

Ранее, 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 (hTop2α) *in vitro*. Более того, исследования активности полученных образцов 5Z,9Z-диеновых кислот *in silico*, показали, что замена алкильной цепочки в молекуле 5Z,9Z-диеновой кислоты на фенильный радикал приводит к тому, что процесс

ингибирования носит двойственный характер, и происходит как по специфическому механизму за счет стабилизации ковалентных комплексов ДНК-Тор^oI, так и по неспецифическому механизму по пути конкурентных реакций между кислотой и топоизомеразой I за сайты связывания с ДНК.

5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновая кислота, как наиболее эффективный ингибитор топоизомеразы I/II, была протестирована на клеточных линиях HL-60 (повышенная чувствительность к ингибиторам топоизомеразы II) и K562 (резистентность к ингибиторам топоизомеразы II) (таблица 2.3).

Таблица 2.3 – Ингибирование жизнеспособности опухолевых клеток

5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновой кислоты, IC₅₀ (мкМ)±SE*

Соединение	IC ₅₀ (мкМ) HL-60	IC ₅₀ (мкМ) K562	IC ₅₀ (мкМ) Нормальные лимфоциты	IC ₅₀ (мкМ) Фибробласты
5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновая кислота	0.10±0.020	0.27±0.015	6.24±0.015	58.78±0.019
Камптотецин	23.16±0.82	33.6±2.3	60.9±1.6	82.9±1.3
Этопозид	10.45±0.8	34.7±1.5	74.5±1.8	68.5±1.4

*Эксперимент проводился в трех независимых повторностях, уровень значимости был достоверен при $p > 0,05$.

Из литературы известно, что в клетках линии K562 зарегистрирована низкая экспрессия гена TOP2A (ген топоизомеразы II), а в клетках HL-60, напротив, регистрируется достаточно высокий уровень экспрессии данного гена. Также известно, что клетки линии K562 практически нечувствительны к этопозиду. При определении IC₅₀ 5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновой кислоты на данных клеточных линиях было показано, что указанное соединение эффективно подавляет рост клеток линии K562 в сравнении с этопозидом и камптотецином (IC₅₀=0.27±0.015 мкМ) (таблица 2.3).

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 внутривенном способе введения в ранние сроки после

перевивки солидной злокачественной мышшиной 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. Злокачественная карцинома легких Льюис (LLC), растущая в виде солидного узла, метастазирующая гематогенно в легкие, не подвергающаяся спонтанной регрессии, была перевита мышам-самкам линии C57Bl/6j массой 18-22 г., содержащимся в условиях обычного вивария при естественном световом режиме, получавших стандартный корм и воду, путем внутримышечного введения суспензии опухолевых клеток в 0,1 мл физиологического раствора в количестве 10^6 кл. на мышь. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о гуманном обращении с лабораторными животными. Эксперименты на животных проводили в соответствии с методическими рекомендациями [227]. Перевивочный материал взят из банка опухолевых штаммов Института цитологии и генетики СО РАН.

Исследования проводили с использованием двух групп мышей с солидной злокачественной мышшиной лимфомой (RLS). В каждой группе было не менее 10 животных. Тестируемые соединения вводились внутривентриально 3 раза в день через день в виде раствора в подсолнечном масле, что обусловлено более легким прохождением подобных растворов через гистогематические барьеры (первый раз – через 2 дня после перевивки опухолевых клеток) в дозах 100 и 30 мг/кг (суммарные дозы, соответственно, 300 и 90 мг/кг). Группа мышей с опухолью, получавшая внутривентриально 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). Измерение каждого

опухолевого узла проводили штангенциркулем в трех взаимно перпендикулярных направлениях.

Средняя продолжительность жизни на протяжении всего времени исследования рассчитанная на одно животное и изменение массы тела в период введения тестируемого образца являлись показателями характеризующими состояние животного. Каждая группа содержала не менее 10 животных.

При злокачественной карциноме легких Льюис (LLC) изучение противоопухолевой активности тестируемых 5Z,9Z-диеновых кислот проводили при различных режимах введения: 1) в ранние сроки после перевивки опухоли (со 2-х по 9-е сутки); 2) во время ее прогрессивного роста (с 11-х по 18-е сутки).

Оценивалась также зависимость эффекта агента от дозы (30 и 100 мг/кг), способа введения (внутрибрюшинно, перитонеально), в комбинации с противоопухолевым препаратом циклофосфаном.

Перед введением (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты (B2) готовили эмульсию вещества 125 мкл B2 + 8 мл воды с твином (из расчета 10 мкл = 8 мг). Готовую эмульсию вводили мышам по 0,2 мл/10 г массы тела. Референсным препаратом служил доксорубин (0,01 г во флаконе, «Лэнс», Москва). Содержимое флакона с доксорубином растворяли в 14 мл физиологического раствора и вводили по 0,1 мл/10 г веса. Измерение опухолевых узлов проводили с помощью штангенциркуля с момента визуализации опухоли до начала гибели мышей в группах (на 10-й, 13-й, 15-й и 18-й дни после перевивки). Далее животных этих групп оставляли без введения агентов до естественной гибели. Фиксировали случаи гибели и на основании этих данных рассчитывали выживаемость мышей в динамике до конца опыта.

Наблюдение животных до гибели (оценка эффекта) осуществлялась оценкой следующих показателей: торможение роста опухоли (ТРО, % = $(V_k - V_o) / V_{kx} \cdot 100\%$); увеличение продолжительности жизни (УПЖ, % = $(СПЖ_o - СПЖ_k) / СПЖ_{kx} \cdot 100\%$).

Статистическая обработка для всех данных проводилась методами вариационного анализа с использованием программного продукта «STATISTICA7».

Анализ динамики роста трансплантатов опухоли лимфомы в период с 11-го по 18-й день после перевивки показал, что имело место постепенное усиление противоопухолевого эффекта у паклитаксела и у (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты (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 2.10).

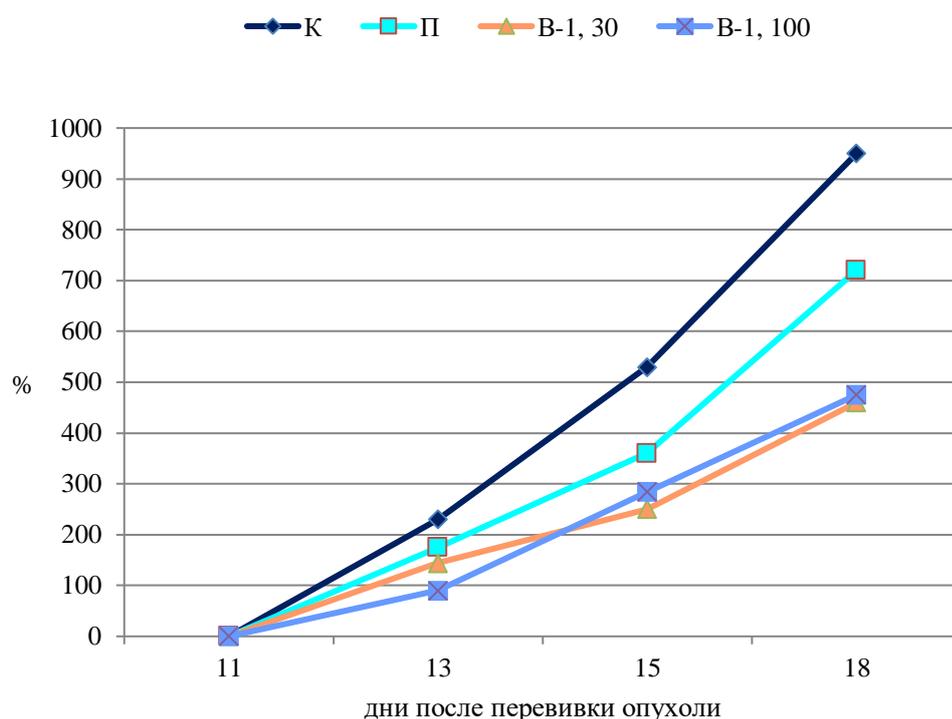


Рисунок 2.10 – Относительная скорость роста опухолевых узлов в период после отмены агентов (в % относительно размеров на 11-й день после перевивки),

К – контроль; П – паклитаксел

Эти данные коррелируют с отмеченной выше тенденцией уменьшения размеров трансплантатов в этих же группах относительно таковых у контрольных животных (рисунок 2.11).

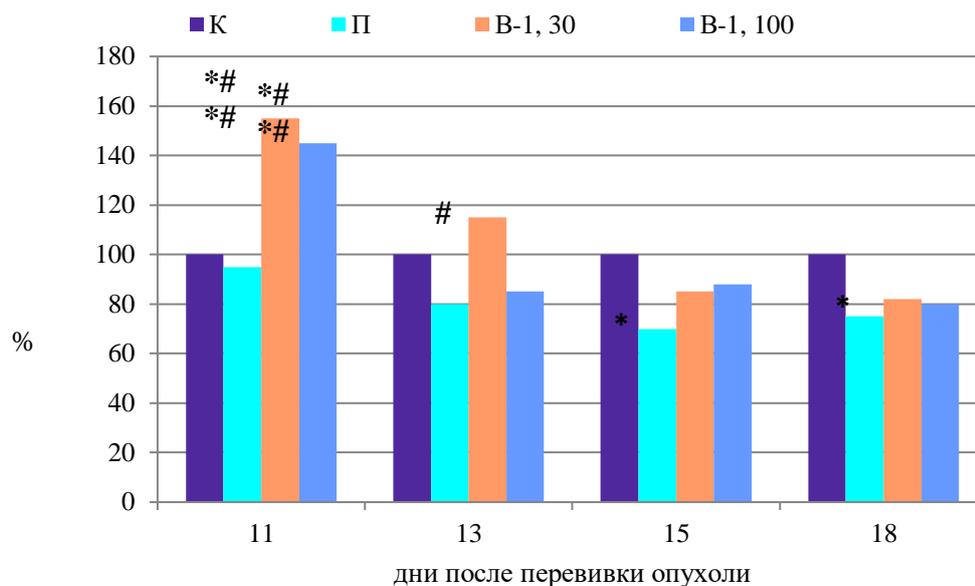


Рисунок 2.11 – Изменение размеров опухолевых трансплантатов после отмены агентов в опытных группах (в % относительно контрольной группы), К – контроль; П – паклитаксел, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – различия с контролем достоверны, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ – различия с паклитакселем достоверны

Основываясь на данные полученные в результате экспериментов *in vivo* на группах мышей с RLS при изучении противоопухолевой активности 5Z,9Z-диеновых кислот установлено, что (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновая кислота 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 внутрибрюшинно в эффективной дозе 30 мг/кг, оказывает достоверный противоопухолевый эффект 25-30%. Выявлено, что (5Z,9Z)-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 в ранние сроки после перевивки опухолевых клеток 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.

Из двух референсных препаратов достоверный противоопухолевый эффект проявил лишь паклитаксел, снизивший размеры опухолевых узлов в 1,4 раза относительно контроля. Циклофосфан в изученной дозе не оказал противоопухолевого действия. 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 2.12).

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.

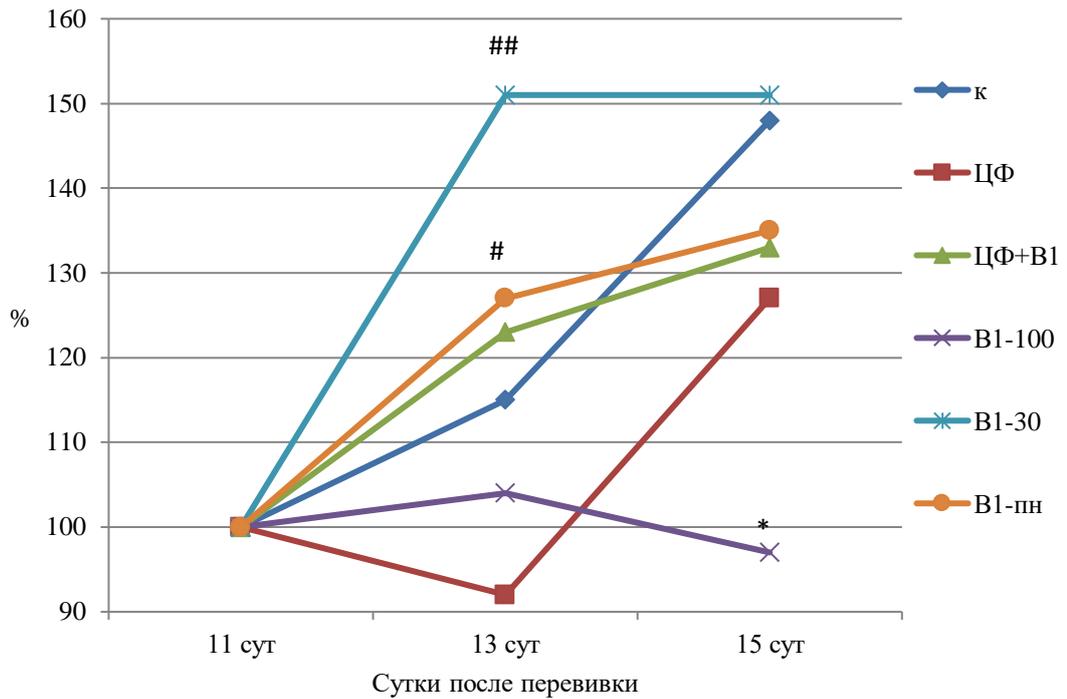


Рисунок 2.12 – Динамика роста трансплантатов LLC под влиянием различных режимов введения (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты, К- контроль; ЦФ – циклофосфан (50 мг/кг); B1 – (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновая кислота; ЦФ+B1 – циклофосфан (50 мг/кг)+ B1 (100 мг/кг); B1-100 (100 мг/кг); B1-30 (30 мг/кг); B1-пн (30 мг/кг перинодально), * $p > 0.05$ достоверные различия с контрольной группы; # $p > 0.05$ достоверные различия с введением циклофосфана

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

Согласно данным, полученным нами при изучении мышей с перевиваемой злокачественной лимфомой RLS, внутрибрюшинное введение мышам (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты 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 2.13).

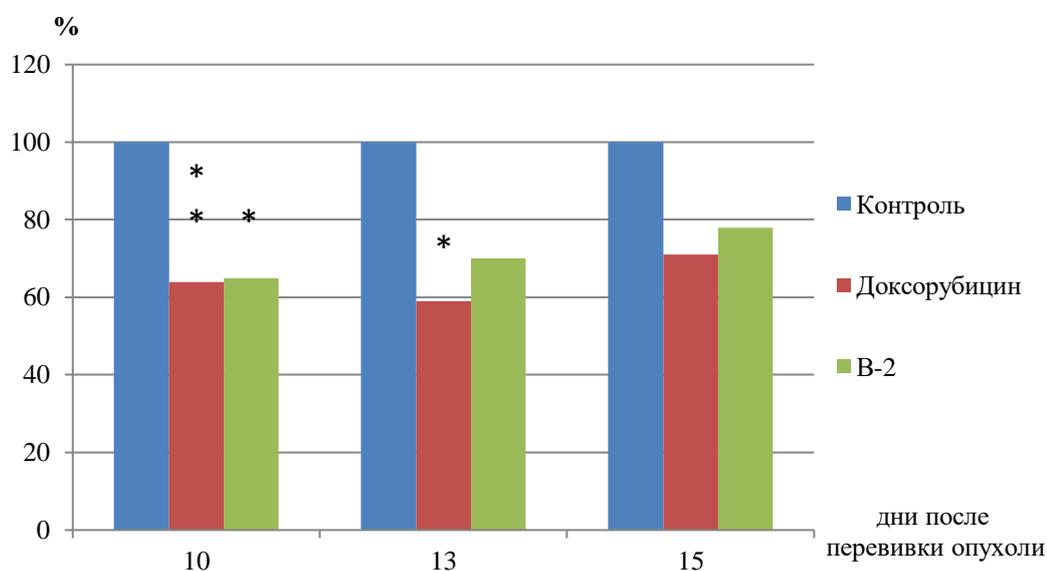


Рисунок 2.13 – Изменение размеров трансплантатов лимфомы RLS под действием (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты и доксорубина относительно контроля (в %), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ различия с контролем достоверны

Повторное введение (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты через 12 дней после перевивки способствовало дальнейшему поддержанию его ингибирующего действия на опухолевые клетки, хотя достоверность эффекта снизилась. В эти сроки у (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты наблюдалось небольшое отставание от эффекта доксорубина (на 10%), хотя достоверных различий между размерами трансплантатов в опытной и референсной группой не было (рисунок 2.13).

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 доксорубина, при этом кислота оказывает менее выраженное токсическое действие на организм животных.

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

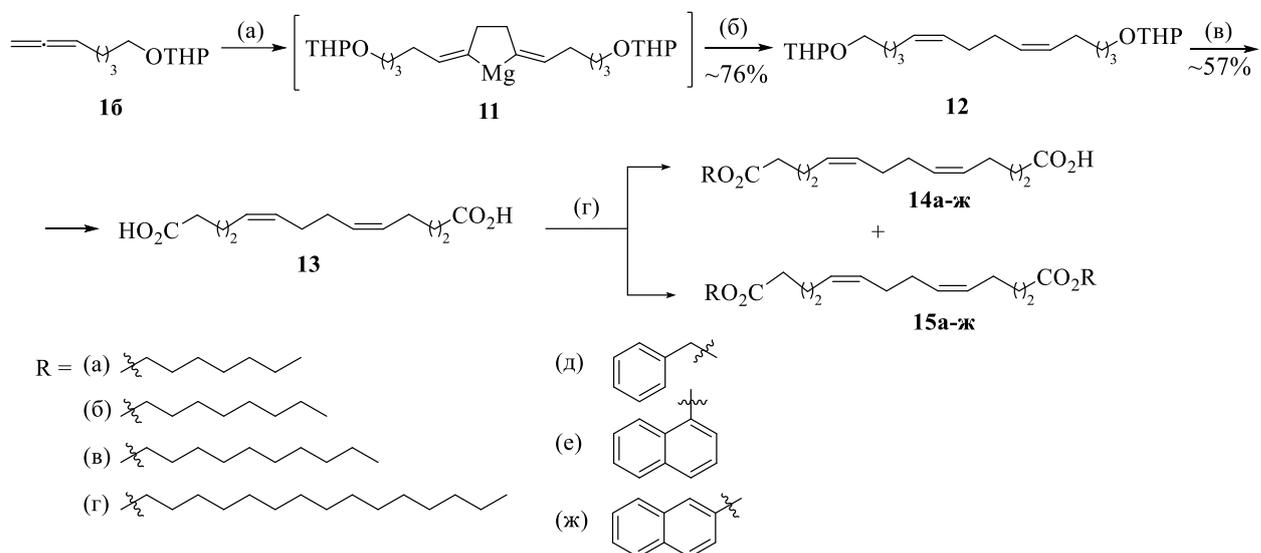
На следующем этапе выполнения исследований, в рамках диссертационной работы, основываясь на полученные нами ранее экспериментальные результаты и на разработанный нами подход к получению 5Z,9Z-дикарбоновых кислот, осуществлен стереоселективный синтез синтетических аналогов природных 5Z,9Z-диеновых кислот,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

Как было известно ранее из литературы, содержание и сложность выделения одиночных 5Z,9Z-диеновых кислот, а также отсутствие эффективных методов их синтеза сильно затрудняли исследования по выяснению взаимосвязи структура-биологическая активность. В наших работах, используя новую каталитическую реакцию перекрестного цикломагнезии алифатических и кислородсодержащих 1,2-диенов в качестве ключевой стадии, мы разработали оригинальный стереоселективный метод синтеза жирных кислот, содержащих 1Z,5Z-диеновую группу в определенном положении относительно карбоксильной группы [228].

Основываясь 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 Cr_2TiCl_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-диендиовой кислоты **13** (схема 2.5). При последующей каталитической этерификации алифатических и ароматических спиртов с (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диендиовой кислотой **13** с помощью DCC/DMAP

с выходом от ~69-81% образуются целевые 5*Z*,9*Z*-диеновые кислоты **14а-ж**, наряду с симметричными диэфирами **15а-ж**, выход которых не превышает 15% (схема 2.5).

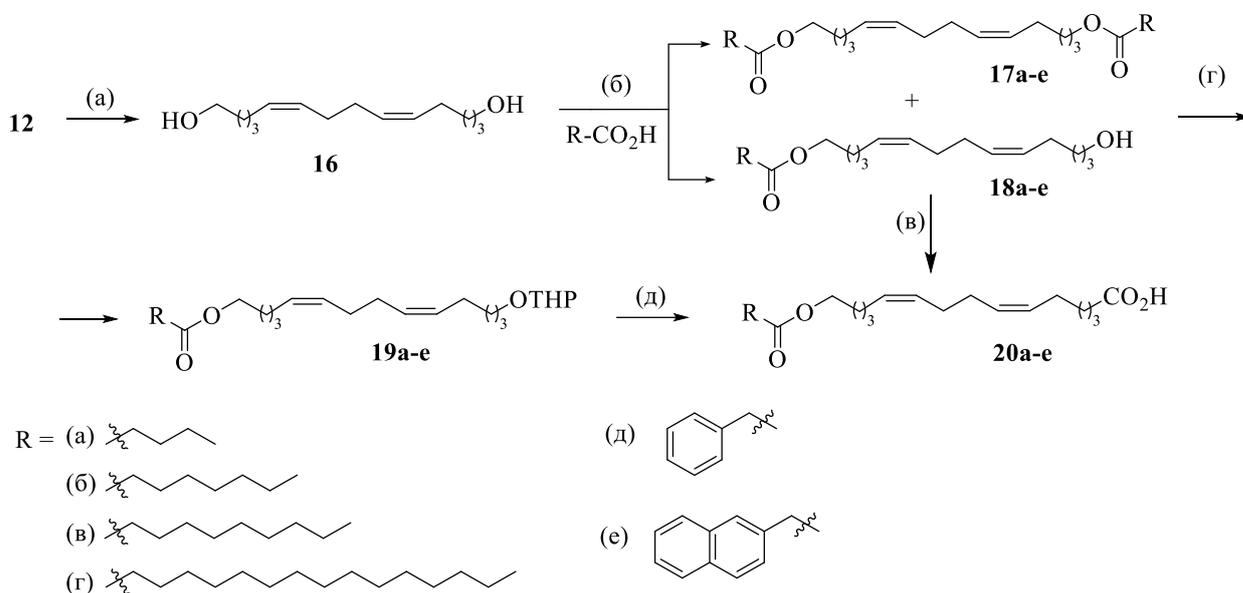


Реагенты и условия: (а): EtMgBr, Mg, Cp₂TiCl₂ (5 mol%), Et₂O; (б): H₃O⁺; (в): H₂CrO₄/H₂SO₄, ацетон, CH₂Cl₂; (г): DCC/DMAP.

Схема 2.5 – Ti-катализируемое гомоцикломагнетирование оксигенированных 1,2-диенов в синтезе 5*Z*,9*Z*-диеновых кислот

Для реализации поставленных целей и продолжая исследования в выбранном направлении мы задались вопросом изучения влияние ориентации сложноэфирной группировки в ряду полученных аналогов 5*Z*,9*Z*-диеновых кислот природного происхождения на проявляемую ими цитотоксичность в отношении опухолевых клеточных линий. Поэтому 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, CHCl₃/CH₃OH, с получением моно- **17а-е** и диэфиров **18а-е** диола **16** (схема 2.6). 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 2.6). Показано, что несмотря на введение дополнительной стадии второй путь является более

предпочтительным, так как позволяет синтезировать кислоты **20a-e** с конечным выходом 69%, образование кислот по первому пути идет не селективно с выходом порядка 40%.



Реагенты и условия: (а): p-TSA, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$; (б): DCC/DMAP; (в): PDC; (г): 3,4-дигидро-2Н-пиран, HCl; (д): $\text{H}_2\text{CrO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$, ацетон, CH_2Cl_2 .

Схема 2.6 – Ti-катализируемое гомоцикломагнесирование оксигенированных 1,2-диенов в синтезе 5Z,9Z-диеновых кислот

Разработанный подход позволил синтезировать ряд 5Z,9Z-диеновых кислот – аналогов ранее синтезированных кислот, отличающихся ориентацией карбоксильной группы. В результате было показано, что длина цепи, природа заместителя и положение 1Z,5Z-диеновой группы оказывают существенное влияние на ингибирующую активность в отношении топоизомераз. Среди кислот были обнаружены селективные ингибиторы топоизомеразы I или топоизомеразы IIa, а также соединения, обладающие двойной ингибирующей активностью в отношении обеих топоизомераз [228].

В продолжение данного исследования мы разработали путь создания синтетических аналогов 5Z,9Z-диеновых кислот на основе стероидов и (5Z,9Z)-1,14-тетрадека-5,9-диендиовой кислоты и включающих гомоцикломагнесирование гепта-эфир 5,6-диен-1-ола тетрагидропирана; продукты также показали высокую

ингибирующую активность в отношении топоизомеразы I и цитотоксичность *in vitro* в отношении некоторых линий раковых клеток [229].

С целью пролить свет на взаимосвязь между структурой 5Z,9Z-диеновой кислоты и противоопухолевой активностью мы, помимо разработанных препаративных методов получения новых синтетических аналогов природных 5Z,9Z-диеновых кислот путем этерификации алифатических и ароматических спиртов и карбоновых кислот с (5Z,9Z)-1,14-тетрадека-5,9-диендиовой кислотой и (5Z,9Z)-1,14-тетрадека-5,9-диендиолом, провели анализ противораковых свойств *in vitro* в отношении линейных культур клеток различных видов лейкемии (Jurkat, HL-60, K562, U937) и нормальных фибробластах. Были изучены апоптозиндуцирующая активность и влияние на клеточный цикл с помощью проточной цитометрии. Ингибирование топоизомеразы I человека и сигнальные пути изучали с помощью мультиплексного анализа белков основных сигнальных путей роста и пролиферации клетки.

Первоначально на клеточных линиях Jurkat, K562, HL-60 и U937 и фибробластах оценивали противораковую активность *in vitro* кислот **14a-ж**, **15a-ж**, **20a-e** (таблица 2.4). Исследование включало определение IC₅₀ с использованием проточной цитофлуориметрии и наборов реагентов Guava ViaCount (Millipore).

Результаты изучения цитотоксичности, представленные в таблице 2.4 свидетельствуют о том, что 5Z,9Z-диеновые кислоты, полученные этерификацией (5Z,9Z)-1,14-тетрадека-5,9-диендиовой кислоты с алифатическими и ароматическими спиртами, проявляют высокую цитотоксичность *in vitro* в отношении практически всех наиболее частых видов лейкемий (Jurkat, HL-60, K562, U937). Активность эфиров ненасыщенных кислот заметно снижается при замене ароматических групп алифатическими, что может быть связано с дополнительными эффектами, обусловленными p-p-взаимодействием ароматического радикала с молекулярной мишенью (топоизомеразой), обнаруженными нами ранее для (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты [213]. Также было показано, что увеличение количества метиленовых звеньев в

алифатических спиртах приводит к стерическим затруднениям внедрения сложных эфиров в полость фермента.

Таблица 2.4 – Цитотоксическая активность *in vitro* соединений **14а-ж**, **15а-ж**, **17а-г**, **20а-е**, измеренная на культурах раковых клеток (Jurkat, K562, U937, HL-60) и нормальных фибробластах (мкМ), 48 часов*

Соединения	Jurkat (IC ₅₀ , μМ)	K562 (IC ₅₀ , μМ)	U937 (IC ₅₀ , μМ)	HL-60 (IC ₅₀ , μМ)	Фибропласты (IC ₅₀ , μМ)
14а	0.124±0.011	0.491±0.027	0.107±0.009	0.118±0.008	0.764±0.038
14б	0.181±0.014	0.573±0.031	0.158±0.012	0.172±0.007	0.806±0.044
14в	0.245±0.021	0.473±0.016	0.196±0.024	0.210±0.035	0.823±0.029
14г	0.636±0.047	0.917±0.057	0.598±0.036	0.602±0.038	2.194±0.117
14д	0.089±0.005	0.364±0.021	0.094±0.007	0.084±0.004	0.615±0.037
14е	0.121±0.017	0.426±0.035	0.115±0.011	0.103±0.015	0.784±0.041
14ж	0.129±0.014	0.457±0.029	0.124±0.014	0.111±0.009	0.791±0.033
15а	0.317±0.026	0.857±0.051	0.345±0.029	0.305±0.041	1.415±0.081
15б	0.439±0.054	0.914±0.049	0.406±0.034	0.411±0.017	2.618±0.087
15в	0.489±0.045	1.102±0.074	0.447±0.029	0.476±0.038	2.697±0.064
15г	0.719±0.037	1.234±0.062	0.679±0.054	0.681±0.032	2.918±0.149
15д	0.145±0.023	0.368±0.034	0.137±0.026	0.154±0.041	0.759±0.042
15е	0.218±0.041	0.417±0.044	0.204±0.017	0.224±0.038	0.817±0.036
15ж	0.231±0.037	0.409±0.028	0.211±0.024	0.241±0.019	0.821±0.041
17а	0.196±0.033	0.512±0.058	0.205±0.029	0.191±0.034	0.784±0.067
17б	0.291±0.025	0.716±0.034	0.315±0.031	0.287±0.046	0.776±0.054
17в	0.327±0.041	1.117±0.063	0.311±0.043	0.341±0.025	1.417±0.105
17г	0.129±0.034	0.311±0.044	0.138±0.031	0.124±0.054	0.797±0.046
20а	0.091±0.001	0.386±0.028	0.086±0.009	0.081±0.007	1.211±0.112
20б	0.104±0.012	0.427±0.031	0.096±0.007	0.092±0.011	0.784±0.071
20в	0.122±0.025	0.489±0.045	0.117±0.011	0.106±0.014	0.805±0.054
20г	0.517±0.031	0.847±0.044	0.486±0.037	0.459±0.042	1.986±0.114
20д	0.044±0.004	0.286±0.023	0.039±0.004	0.046±0.002	0.911±0.059
20е	0.087±0.012	0.393±0.036	0.078±0.009	0.081±0.010	0.688±0.054
СРТ	0.487±0.039	0.964±0.041	0.462±0.028	0.511±0.037	2.872±0.147

*Эксперимент проводился в трех независимых повторностях, уровень значимости был достоверен при $p > 0,05$.

Исследование цитотоксических свойств показало, что кислоты, синтезированные по схеме, представленной выше (схема 2.6), обладают более высоким цитотоксическим действием, чем аналоги, однако, установленные ранее

тенденции сохраняются. Например, 5Z,9Z-кислота **20e** на основе бензойной кислоты показала наибольшую цитотоксичность в отношении всех использованных опухолевых культур. Кроме того, с увеличением длины углеводородной цепи цитотоксическая активность кислот снижается.

Из опубликованных данных и наших, более ранних, исследований 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 топоизомеразы I человека *in vitro* (рисунок 2.14).

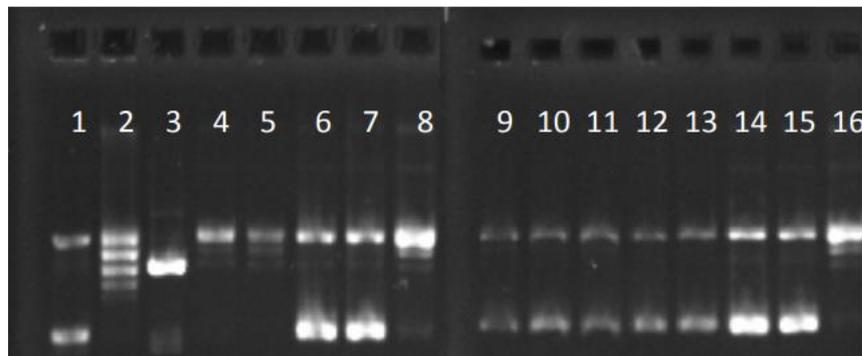


Рисунок 2.14 – Электрофореграмма продуктов релаксации 250 нг плазмидной ДНК (pHOT1) *in vitro* под действием топоизомеразы I в присутствии **20a** и **20d** (вещество внесено перед добавлением фермента топоизомеразы I) и анализ влияния изучаемых соединений на подвижность плазмиды pHOT1. (Дорожки 9-13): исследование подвижности плазмидной ДНК (pHOT1) под действием тестируемых соединений в отсутствие Торо I, (9) плазмидная ДНК (pHOT1), (10) pHOT1+23a (0,5 мкМ), (11) pHOT1+23a (1 мкМ), (12) pHOT1+23d (0,5 мкМ), (13) pHOT1+23d (1 мкМ); (Дорожки 1-8, 14-16): продукты релаксации ДНК (pHOT1) под действием топоизомеразы I, (1) плазмидная ДНК (pHOT1), (2) релаксированная плазмидная pHOT1 (контроль), (3) линейная ДНК, (4) pHOT1 + камптотецин (2,5 мкМ), (5) pHOT1 + топоизомераза, 4 ЕД, (6-8) pHOT1 + 23a (0,125, 0,05 и 0,025 мкМ) + топоизомераза I, 4 ЕД, (14-16) pHOT1 + 23d (0,07, 0,025 и 0,01 мкМ) + топоизомераза I, 4 ЕД.

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 (рисунок 2.14, дорожки 9-13); другими словами, соединения не влияют на подвижность ДНК в агарозном геле. В присутствии тестируемых соединений в той же реакции наблюдалось выраженное ингибирование уже при концентрациях, начиная с 0,025 мкМ (**20a**) и 0,01 мкМ (**20д**), что проявлялось в сохранении остаточного количества суперспирализованной ДНК по сравнению с отрицательным контролем. Все соединения в интересующем диапазоне концентраций вели себя практически одинаково, ингибирование топоизомеразы I начиналось с концентраций выше 0,01 мкМ (**20д**). Результаты наших более ранних экспериментов показывают, что 5Z,9Z-диеновые кислоты даже в микромолярных концентрациях способны подавлять каталитическую активность топоизомеразы I. Как мы сообщали ранее [230], активность топоизомеразы снижается в присутствии 5Z,9Z-диеновой кислоты различного строения (исследовался диапазон концентраций от 0,01 мкМ до 100 мкМ).

Механизм взаимодействия 5Z,9Z-диеновых кислот с топоизомеразой до сих пор вызывает большое количество вопросов. Ранее молекулярно-динамические исследования механизма ингибирования топоизомеразы I эйкозапентаеновой кислотой показали, что предпочтительными сайтами связывания являются остатки K443, K587 и N722 [231]. Аналогичные результаты были получены при молекулярном докинге механизма ингибирования топоизомеразы I ненасыщенными холестеринсодержащими кислотами [229,232]. Предположительно, взаимодействие карбоксилатной группы ненасыщенных карбоновых кислот с указанными выше сайтами Торо I дает устойчивый комплекс,

который не позволяет каталитическому центру Y723 осуществить нуклеофильную атаку на фосфат ДНК. По нашему мнению, эйкозапентаеновая кислота, холестеринсодержащие кислоты и синтетические 5Z,9Z-диеновые кислоты должны ингибировать Торо I человека по сходным механизмам. Это предположение было проверено путем молекулярного моделирования взаимодействия Топо I с несколькими 5Z,9Z-диеновыми кислотами и их эфирами. Исходной моделью молекулярного докинга служила укороченная форма hTopI (70 кДа), образующая комплекс с 22-парным дуплексным олигонуклеотидом (PDBID 1A36), из которого были удалены фрагмент дуплексного олигонуклеотида и молекулы воды. Взаимодействие производных конъюгата с фрагментом 1A36 анализировали методом OPLS3 (Glide XP). Мы обнаружили, что в случае производных ненасыщенных дикарбоновых кислот **14д**, **14е**, **20а** и **20д** предпочтительными сайтами связывания являются остатки R488, K532 и R590. В случае производных **14в** и **20б** карбоксилатная группа в наиболее устойчивых комплексах связана с остатками K443, K587 и N722 (рисунок 2.15).

Таким образом, для синтезированных кислот можно предположить существование двух конкурирующих механизмов взаимодействия с Торо I: (а) взаимодействие через сайты R488, K532 и R590 и (б) взаимодействие через сайты K443, K587 и N722. Анализ наиболее устойчивых конформаций показывает, что различные типы связывания в ряду синтетических 5Z,9Z-диеновых кислот определяются наличием сложноэфирной группы и объемом заместителя у карбоксильной группы. По результатам молекулярного докинга эфирная группа, присутствующая в ненасыщенной карбоновой кислоте, стабилизирует положение, в котором карбоксилатная группа взаимодействует с остатками R488, K532 и R590, а сложноэфирная группа взаимодействует с G490 и N491. Такому типу связывания способствует также относительно компактный бензильный, нафтильный или пропильный заместитель при атоме кислорода сложного эфира, который хорошо соответствует форме и объему полости в районе G490 и N491. По-видимому, плохое согласование этой полости с объемными алкильными заместителями препятствует взаимодействию сложноэфирной группы в соединениях **14в** и **20б** с

остатками G490 и N491, что заставляет их связываться преимущественно с K443, K587 и N722. Показатель стыковки, рассчитанный методом OPLS3 (Glide XP), увеличивается в следующем ряду соединений: **20д** (-10.2) < **20а** (-9.8) < **14д** (-9.2) < **14е** (-9.2) < **14ж** (-8.5) < **14г** (-6.5) < **20б** (-6.2) < **20в** (-5.9) < **15д** (-3.8) < **15а** (-2.3) < **15в** (-1.5), что в целом хорошо коррелирует с экспериментально наблюдаемой активностью синтетических 5Z,9Z-диеновых кислот.

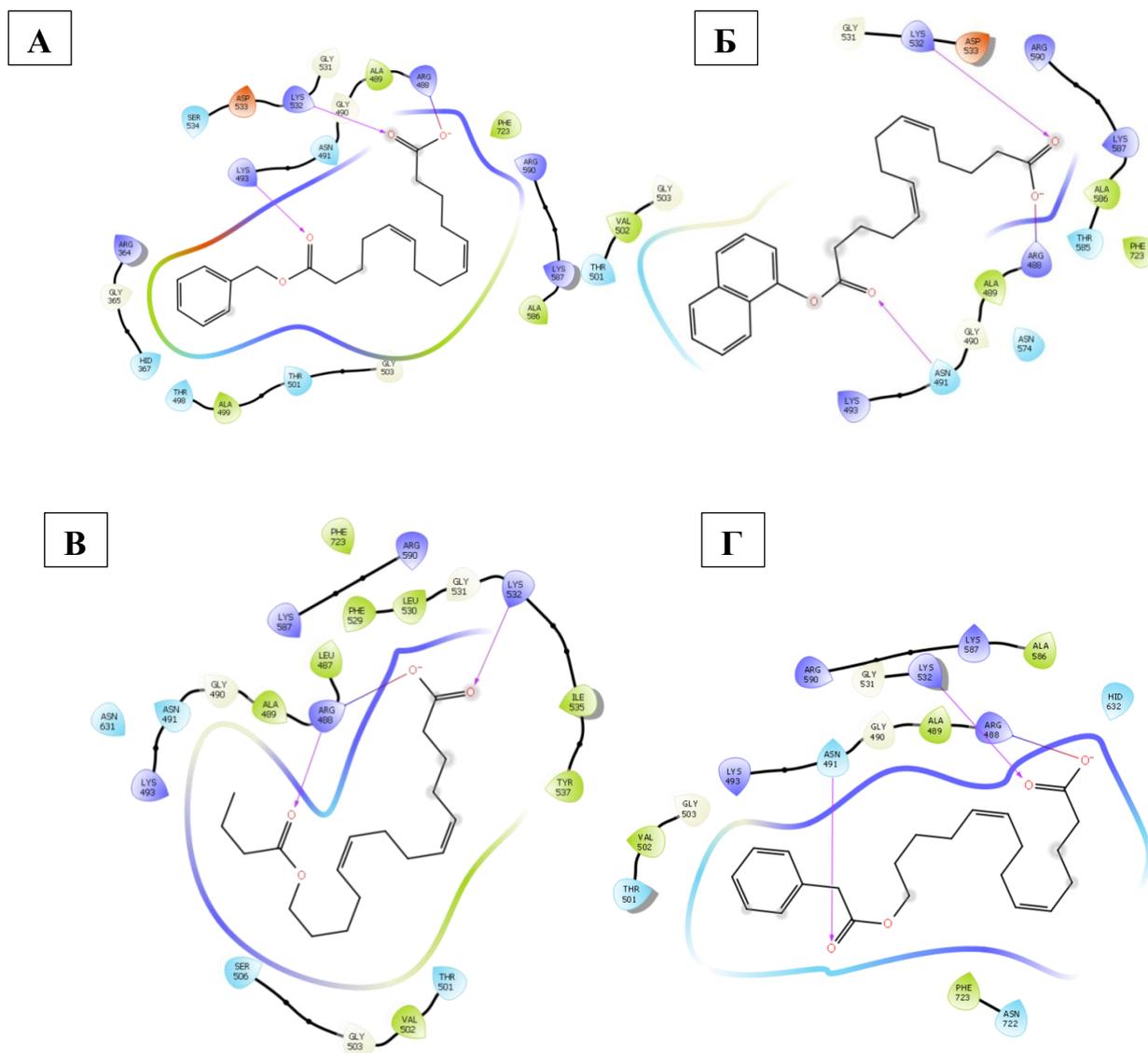


Рисунок 2.15 – Диаграмма взаимодействия лигандов для кислот **14д** (А), **14е** (Б), **20а** (В) и **20д** (Г)

Таким образом, можно сделать вывод, что (а) активность синтетических 5Z,9Z-диеновых кислот **14** и **20** обусловлена их способностью связываться со свободной топоизомеразой I; (б) Торо I имеет две триады сайтов (R488/K532/R590

и K443/K587/N722) преимущественного связывания карбоксилатных групп соединений **14** и **20**; (в) эфирная группа, присутствующая в соединениях **14** и **20**, приводит к эффективному связыванию синтетических 5Z,9Z-диеновых кислот через сайты R488/K532/R590 и G490/N491 и полость вблизи G490 и N491; г) объем и форма полости обеспечивают лучшее связывание и более высокую активность соединений свинца **20a** и **20e**.

Учитывая способность синтезированных нами соединений стимулировать гибель клеток, на начальном этапе исследований мы использовали два ведущих соединения (**20a** и **20д**) для изучения апоптоза 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 2.16, гистограммы А3 и А4, Б). Соединение **20д** в концентрации 0,2 мкМ было несколько менее активным в отношении индукции апоптоза: процент позднего апоптоза клеток Jurkat составил около 76% (рисунок 2.16, гистограммы А5 и Б), что сопоставимо с действием камптотецина (рисунок 2.16, гистограммы А2 и Б).

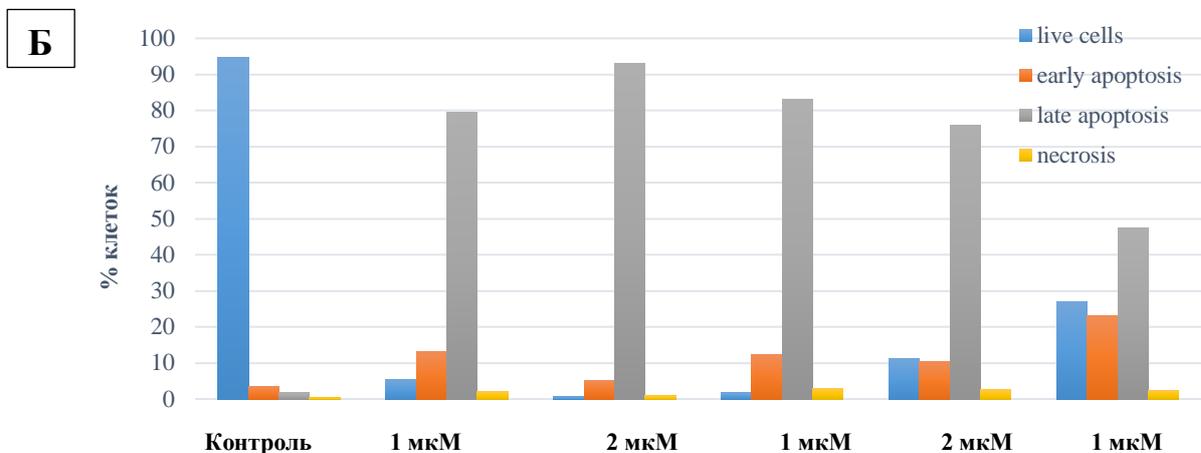
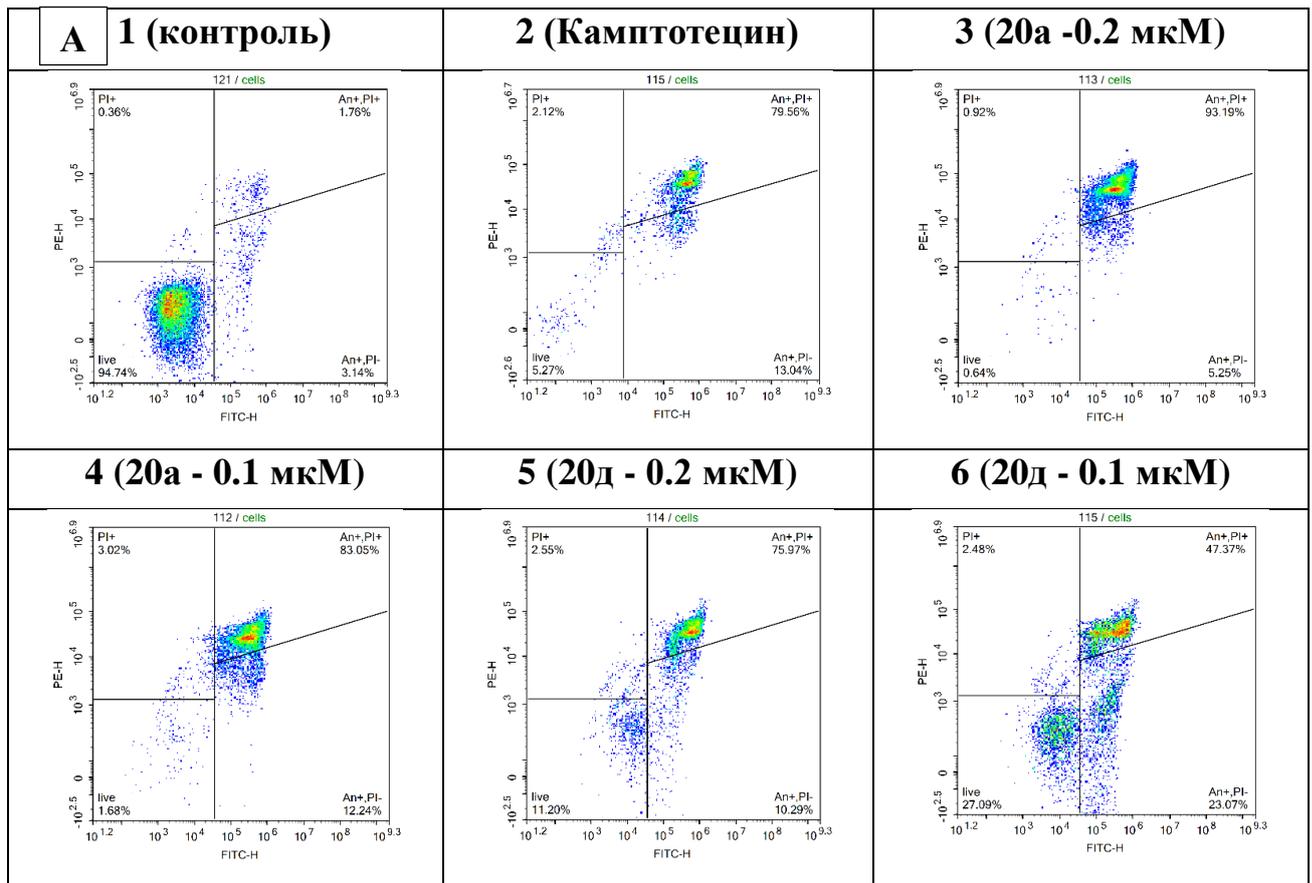


Рисунок 2.16 – (А) Клеточная линия Jurkat, обработанная различными концентрациями соединений **20a**, **20д** и камптотецином. Клетки окрашены с помощью annexineV/7AAD и проанализированы с применением проточной цитофлуориметрии. (Б) Гистограмма, иллюстрирующая сравнительный анализ опухолевых клеток линии Jurkat, находящихся на разных стадиях апоптоза после обработки их синтезированными соединениями **20a**, **20д** и камптотецином. Результаты представлены как среднее \pm SEM, вычисленное из результатов не менее четырех независимых опытов. 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. В частности, камптотецин, цитотоксический хинолиновый алкалоид, который, как известно, повреждает ДНК посредством необратимого ингибирования топоизомеразы I, блокирует клеточный цикл многих линий раковых клеток. Исследование продемонстрировало наличие пика гиподиплоидной ДНК, наблюдаемого методом проточной цитометрии в клетках Jurkat, инкубированных с соединениями **20a** и **20d** (рисунок 2.17, 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 **20d** на клетки Jurkat отличается от действия камптотецина более выраженной блокировкой S-фазы (рисунок 2.17, гистограммы 3, 4, 5 и 6). Таким образом, соединения **20a** и **20d** останавливают клеточный цикл в S-фазе.

Соединения **20a** и **20d** значительно снижают пролиферативную активность и жизнеспособность опухолевых клеток линии A549, как было показано выше при исследовании цитотоксичности исследуемых соединений на различных линейных культурах лейкемии (таблица 2.4). По данным RTCA, **20a** и **20d** являются веществами, которое проявляют выраженное ингибирующее действие даже в самой минимальной концентрации на опухолевые клетки карциномы легкого (рисунок 2.17).

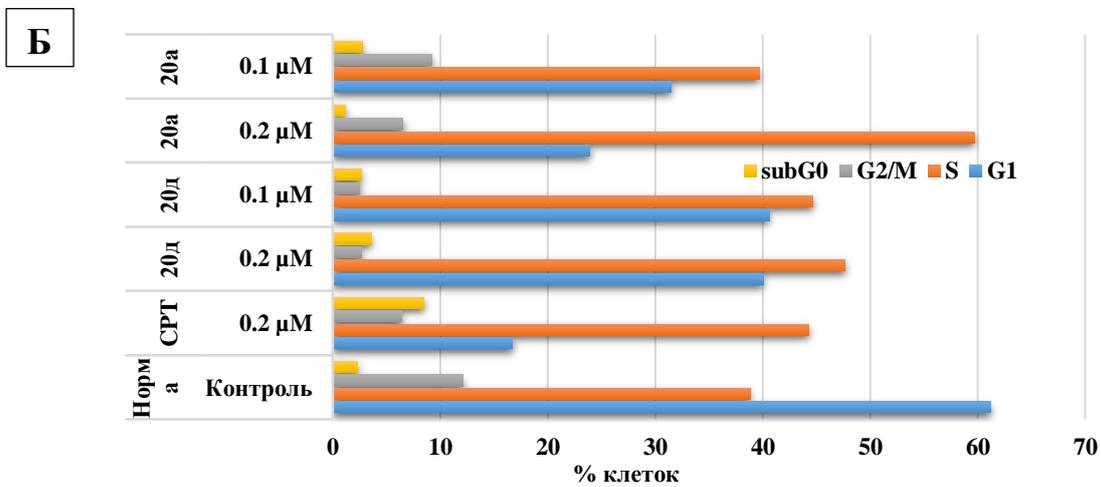
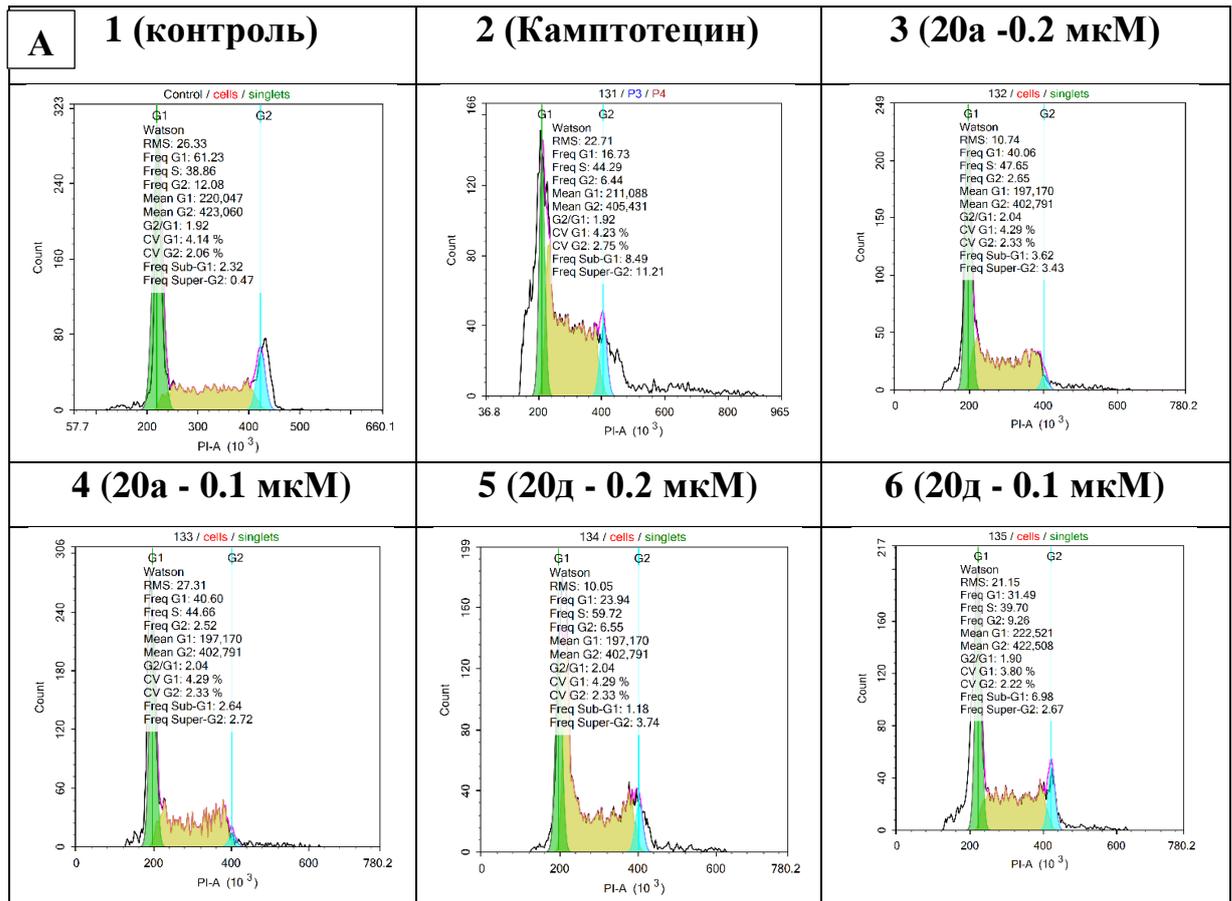


Рисунок 2.17 – (А) Клеточный цикл в клетках Jurkat под воздействием соединений **20a**, **20d** в сравнении с камптототецином. Клетки проанализированы с применением проточной цитофлуориметрии. (Б) Гистограмма, иллюстрирующая сравнительный анализ фаз клеточного цикла в клетках Jurkat после обработки их соединениями **20a**, **20d** и камптототецином. Результаты представлены как среднее ± SEM, вычисленное из результатов не менее четырех независимых опытов. Статистически значимые отличия от значений в контроле показаны ***($p < 0.001$).

При этом камптотецин снижает пролиферативную способность линии A549 в первые двое суток инкубации, что сопоставимо с действием исследуемых соединений и подтверждается увеличением CI (cell index) в контрольном необработанном образце и снижением данного показателя в лунках с изучаемыми диеновыми кислотами (рисунок 2.18). Таким образом, можно утверждать, что введение исследуемых **20a** и **20д** в культивационную среду уменьшало пролиферацию и жизнеспособность клеток карциномы легкого A549 в течение трех суток.

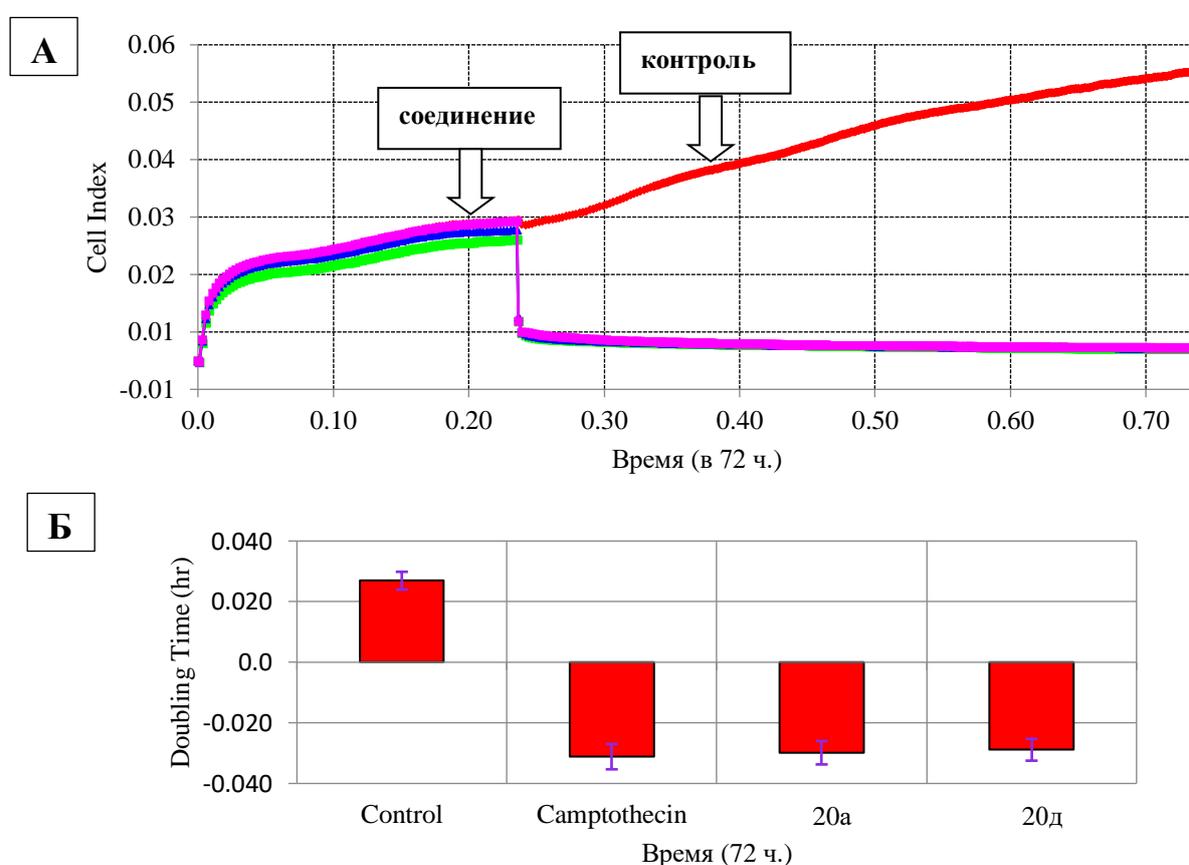


Рисунок 2.18 – (А) Влияние соединений **20a** и **20д** на опухолевую линию A549 в сравнении с действием камптотецина на кривые анализа жизнеспособности клеток в реальном времени (система xCELLigence RTCA). Контроль (необработанные клетки) – красная линия, Камптотецин 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (пурпурная линия), **20a** - 0.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (синяя линия), **20д** – 0.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (зеленая линия). (Б) Оценка клеточного индекса опухолевой культуры A549 под влиянием исследуемых соединений **20a** и **20д** в сравнении с камптотецином.

В развитие наших исследований также была изучена активация и ингибирование наиболее универсальных внутриклеточных сигнальных путей, отвечающих за пролиферацию клеток, а также за инициацию апоптоза в опухолевых клетках Jurkat после обработки соответствующими синтезированными диеновыми кислотами посредством мультиплексного анализа по технологии Luminex xMAP. Определение белков в клетке по технологии Luminex xMAP отличается наличием мультиплексного многопараметрического анализа с использованием нескольких антител, что, в конечном итоге приводит к повышению чувствительности метода и расширению динамического диапазона, а также выраженному снижению себестоимости анализа. Метод мультиплексного анализа Luminex xMAP основан на проточной флуориметрии специальных микросфер из полистирола, маркированных специфическими флуорофорами с последующей лазерной детекцией и цифровой обработки сигнала. В данной работе были проанализированы два вида белковых аналитов, 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. Исследование было проведено с использованием технологии Luminex (MILLIPLEX® MAP 9-Plex Multi-Pathway 9-plex Magnetic Bead Kit).

В целом, 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 (рисунок 2.19). Сигналинг через RTKs (рецептор тирозинкиназ) часто вызывает повышение метаболизма и клеточного роста. ERK/MAP киназы и Akt – два ключевых семейства Ser/Thr киназ, активируемых через RTK-сигналинг, вызывающих повышение активности p70S6 киназ, Msk1, STAT3 (Ser727), CREB, повышающих активацию также других интермедиатов. Другие сигнальные пути,

индуцируемые стрессом или рецепторами смерти вызывают активацию p38, JNK, и NF-κB.

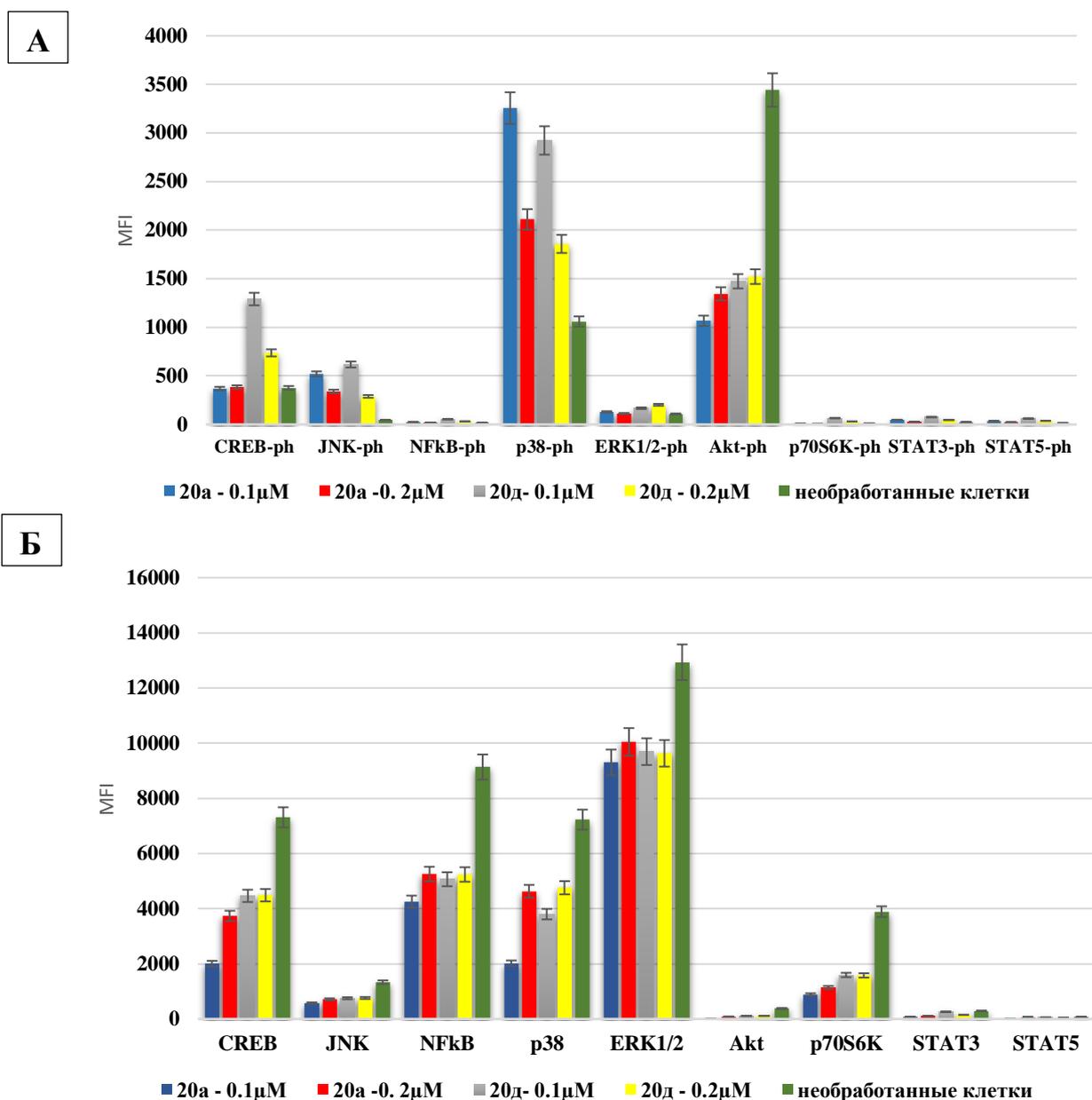


Рисунок 2.19 – Гистограммы основных сигнальных путей в клетках опухолевой линии Jurkat, обработанных диеновыми кислотами **20a** и **20д** (концентрация каждого соединения в культуральной среде составила 0,5 и 1 μM на 200 тыс клеток, соответственно). Проанализировано содержание фосфорилированной (**А**) и общей (**Б**) фракции белков CREB, JNK, NFκB, p38, ERK1/2, Akt, p70S6K, STAT3, STAT5. Эксперимент проводился в трех независимых повторностях, уровень значимости был достоверен при $p > 0,05$.

Как видно из рисунка 2.19 (А), соединения **20a** и **20д** действуют схоже и наиболее выражено 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 выражено подавлена выработка p38, Akt и CREB. Akt (англ. RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha) – внутриклеточный фермент, один из трёх представителей семейства протеинкиназ B. Киназа Akt является ключевым ферментом сигнального пути PI3K/Akt и вовлечена в регуляцию пролиферации, роста и выживания клеток[233]. Исследованию функций этого фермента уделяется большое внимание из-за того, что он выступает в роли онкогена при многих злокачественных опухолях [234]. P38 является MAPK киназой (mitogen-activated protein kinases), и активируется в ответ на многочисленные внешние воздействия посредством передачи сигналов к усилению клеточного роста и дифференцировки. P38 наравне с другими MAPK киназами является одним из центральных компонентом сигнального каскада Ras/ERK/MAPK. [235]. 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.

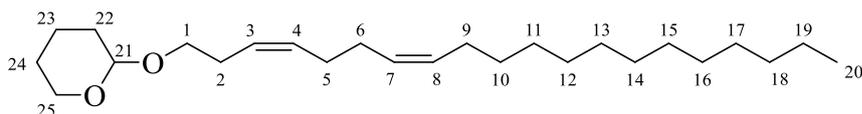
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хроматографический анализ проводили на приборе Shimadzu GC-9A, колонка 2000×2 мм, неподвижная фаза – силикон SE-30 (5%) на Chromaton N-AW-HMDS (0.125–0.160 мм), газ-носитель – гелий (30 мл/мин), при программировании температуры от 50 до 300 °C со скоростью 8 °C/мин. ИК-спектры получали на спектрометре «SpecordIR-75» в тонком слое или в растворе CHCl₃. Спектры ЯМР ¹H и ¹³C регистрировали на приборе «Bruker AVANCE-500» (рабочая частота для ¹H 500.13 МГц; для ¹³C 100.62 МГц), внутренний стандарт Me₄Si, растворитель CDCl₃, химические сдвиги даны относительно TMS. Хромато-масс-спектральный анализ соединений проводили на приборе Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (стеклянная капиллярная колонка SLB-5ms 60000×0.25мм×0.25μm (Supelco, США), газ-носитель – гелий, программирование температуры от 40 до 280 °C со скоростью 5 град/мин, температура испарителя 280°C, температура источника ионов 200°C, 70эВ). Масс-спектры записывали на спектрометре «Bruker–AutoflexIII» в режиме MALDI TOF с регистрацией положительных ионов и использованием в качестве матриц 2.5-дигидроксибензойной и α-циан-4-гидроксициннамовой кислот. Элементный анализ выполнен на элементном анализаторе фирмы Karlo Erba 1106. Выходы продуктов определяли с помощью ГЖХ-анализа. Растворители сушили и использовали свежеперегнанными. Эфирные растворители выдерживали над NaOH, пропускали через Al₂O₃, кипятили над натриевой стружкой, перегоняли в токе аргона над LiAlH₄. Галогенсодержащие соединения сушили с помощью P₂O₅. Реакции с металлоорганическими соединениями проводили в токе сухого аргона. Использовали аргон марки “чистый” (ГОСТ 10157-73), дополнительно очищенный от следов влаги и кислорода пропусканием через колонку, содержащую 30% раствор диизобутилалюминийгидрида в декалине. В работе использовали мономеры чистотой не менее 99%. Исходные аллены получали по известным методикам [236–242]. Использовали коммерчески доступный Cr₂TiCl₂ «Acrous Chem».

**Общая методика гомо-цикломагнирования с помощью EtMgBr
в присутствии Mg, катализируемая Cr₂TiCl₂**

В стеклянный реактор загружали Et₂O (10 мл), тетрагидропирановый эфир алкадиен-1-ола (10 ммоль), 1,2-диен (12 ммоль), этилмагнийбромид (40 ммоль) (в виде 1,5 М раствора в Et₂O), Mg металлический порошок (32 ммоль) и Cr₂TiCl₂ (0,5 ммоль). Исходные вещества добавляли при температуре 0 °С. Реакция проводилась в атмосфере сухого аргона. Реактор нагревали до комнатной температуры (20-22 °С) при перемешивании реакционной смеси и поддерживали указанную температуру в течение 6-8 часов. Далее реакционную смесь обработали 5%-ным раствором HCl в H₂O. Эфиры тетрагидропирана алкадиенолов экстрагировали диэтиловым эфиром. Органические экстракты высушивали над безводным MgSO₄. Осадок удалили фильтрованием, фильтрат концентрировали под вакуумом в ротационном испарителе. Диэтиловый эфир, используемый в реакции, был высушен над Na и свежеперегнан. Продукт реакции хроматографировали на колонке SiO₂ (силикагель фирмы Acrus (0.060–0.200 мм), элюент – петролейный эфир-этилацетат (50:1)).

2 -(эйкоза-3Z,7Z-диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пиран (3a)

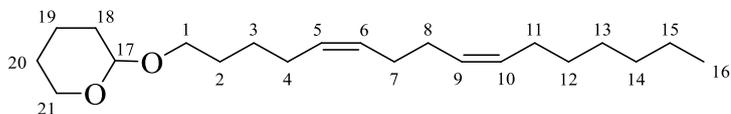


Выход 81%. $R_f = 0.45$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, ν /см⁻¹: 669, 769, 1033, 1137, 1200, 1260, 1364, 1380, 1455, 1730, 2856, 2927, 3007. Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 0.89 (т, 3H, CH₃, J = 7.2 Гц), 1.27–1.30 (м, 20H, CH₂), 1.49–1.86 (м, 6H, CH₂), 1.94–2.13 (м, 8H, CH₂), 3.38–3.87 (м, 4H, CH₂), 4.59 (т, 1H, CH, J = 3.6 Гц), 5.35–5.46 (м, 4H, CH=).

Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 14.1 C(20), 19.5 C(23), 22.6 C(19), 25.5 C(24), 27.2 C(5,6), 27.5 C(2), 28.0 C(9), 29.0 C(10), 29.3 C(12), 29.4 C(13), 29.5 C(14,15), 29.6 C(16,17), 29.7 C(11), 30.7 C(22), 31.8 C(18), 62.2 C(25), 67.0 C(1), 98.6 C(21), 278 125.9 C(3), 128.9 C(7), 130.4 C(4), 131.2 C(8). Масс-спектр MALDI TOF: найдено

m/z 378.64; $C_{25}H_{46}O_2$; вычислено $M = 378.71$. Найдено, %: C 79.30; H 12.25.
Вычислено, %: C 79.28; H 12.26.

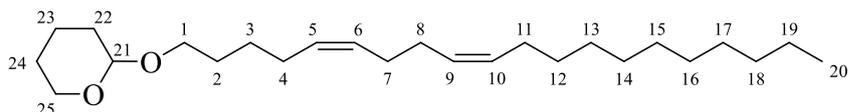
2-(гексадека-5Z,9Z-диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пиран (3б)



Выход 86%. $R_f = 0.41$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 815, 869, 905, 971, 992, 1034, 1078, 1121, 1137, 1159, 1182, 1200, 1353, 1380, 1441, 2853, 2924, 3005. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.87 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.26–1.85 (м, 18H, CH_2), 2.00–2.07 (м, 8H, CH_2), 3.38–3.87 (м, 4H, CH_2), 4.56 (т, 1H, CH , $J = 3.2$ Гц), 5.34–5.38 (м, 4H, $\text{CH}=\text{}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.0 C(16), 19.6 C(19), 22.6 C(15), 25.5 C(20), 26.4 C(3), 27.0 C(4), 27.2 C(2), 27.3 C(7), 27.4 C(8), 29.4 C(11), 29.7 C(13), 30.7 C(18), 31.8 C(14), 62.1 C(21), 67.4 C(1), 98.7 C(17), 129.0 C(9), 129.4 C(6), 129.9 C(5), 130.3 C(10). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 322.54; $C_{21}H_{38}O_2$; вычислено $M = 322.59$. Найдено, %: C 78.20; H 11.88. Вычислено, %: C 78.18; H 11.90.

2-(эйкоза-5Z,9Z-диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пиран (3в)

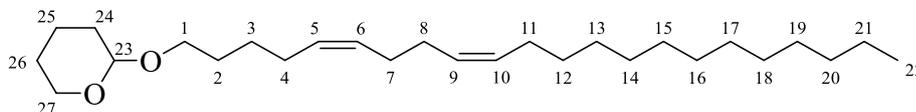


Выход 88%. $R_f = 0.46$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 676, 769, 1034, 1078, 1125, 1159, 1180, 1200, 1382, 1354, 1441, 1660, 2853, 2926. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.25–1.80 (м, 26H, CH_2), 2.01–2.06 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 3.41–3.89 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.61 (м, 1H, O-CH-O), 5.37–5.48 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(20), 19.5 C(23), 22.7 C(19), 25.5 C(24), 27.2 C(3), 27.5 C(4), 27.9 C(2), 29.3 C(11), 29.4 C(7), C(8), 29.5 C(17), 29.6 C(16), 29.4 C(13), 29.5 C(12), 29.6 C(15), 29.7 C(14), 30.7 C(22), 31.9 C(18), 62.1 C(25), 67.0 C(1), 98.6 C(21), 125.9 C(9), 128.9 C(6), 130.4 C(5), 131.2 C(10).

Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 378.64; $C_{25}H_{46}O_2$; вычислено $M = 378.70$.
Найдено, %: C 79.30; H 12.25. Вычислено, %: C 79.28; H 12.27.

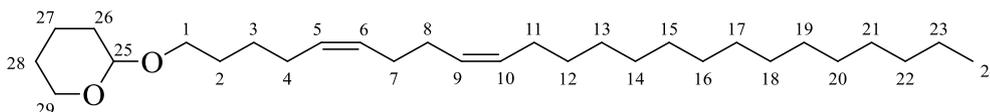
2-(докоза-5Z,9Z-диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пиран(3г)



Выход 90%. $R_f = 0.44$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 662, 767, 1034, 1078, 1121, 1135, 1159, 1180, 1200, 1352, 1380, 1445, 1654, 2851, 2925. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.26–1.82 (м, 30H, CH_2), 2.01–2.17 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 3.39–3.90 (м, 4H, CH_2O), 4.59 (т, 1H, OCH_2O , $J = 4$ Гц), 5.36–5.48 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.0 C(22), 19.6 C(25), 22.6 C(21), 25.5 C(26), 25.8 C(3), 26.2 C(4), 26.4 C(2), 27.0 C(11), 27.2 C(7), 27.4 C(8), 29.3 C(19), 29.4 C(18), 29.5 C(16), 29.6 C(17,19), 29.7 C(12,13,14,15), 30.7 C(24), 31.9 C(20), 62.1 C(27), 67.5 C(1), 98.7 C(23), 129.0 C(9), 129.4 C(6), 129.9 C(5), 130.3 C(10). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 406.70; $C_{27}H_{50}O_2$; вычислено $M = 406.77$. Найдено, %: C 79.74; H 12.39. Вычислено, %: C 79.72; H 12.41.

2-(тетракоза-5Z,9Z-диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пиран (3д)

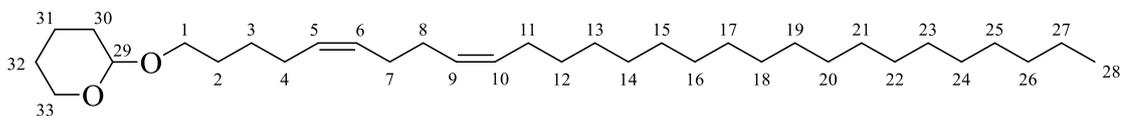


Выход 92%. $R_f = 0.43$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 812, 867, 905, 970, 992, 1034, 1078, 1121, 1135, 1159, 1180, 1200, 1352, 1380, 1445, 2851, 2925, 3005. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.87 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.26–1.84 (м, 34H, CH_2), 2.00–2.07 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 3.37–3.88 (м, 4H, CH_2O), 4.57 (т, 1H, OCH_2O , $J = 4$ Гц), 5.36–5.40 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(24), 19.5 C(27), 22.6 C(23), 25.5 C(28), 25.8 C(3), 26.2 C(4), 26.3 C(2), 27.0 C(11), 27.2 C(7), 27.3 C(8), 29.3 C(21), 29.4 C(20), 29.5 C(16), 29.6 C(17,19), 29.7 C(12,13,19), 29.7 C(14,15,18), 30.7 C(26), 31.9 C(22), 62.1 C(29), 67.4 C(1), 98.7 C(25), 129.0 C(9), 129.4 C(6), 129.8 C(5),

130.3 С (10). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 434.75; $C_{29}H_{54}O_2$; вычислено $M = 434.83$. Найдено, %: С 80.12; Н 12.52. Вычислено, %: С 80.10; Н 12.54.

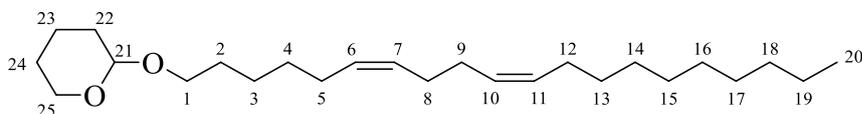
2-(октакоза-5Z,9Z-диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пиран (3е)



Выход 92%. $R_f = 0.43$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 812, 867, 905, 970, 992, 1034, 1078, 1121, 1135, 1159, 1180, 1200, 1352, 1380, 1445, 2851, 2925, 3005. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.87 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.26–1.84 (м, 42H, CH_2), 2.00–2.07 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 3.37–3.88 (м, 4H, CH_2O), 4.57 (т, 1H, OCH_2O , $J = 4$ Гц), 5.36–5.40 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.0 С(28), 19.6 С (31), 22.7 С(27), 25.5 С (32), 25.8 С(3), 26.2 355 С (4), 26.4 С(2), 27.0 С (11), 27.2 С(7), 27.4 С(8), 29.3 С(21), 29.4 С(20), 29.5 С(16,22-24), 29.6 С(17,19,25), 29.66 С(12,13,19), 29.69 С (14,15,18), 30.7 С (30), 31.9 С (26), 62.1 С (33), 67.4 С(1), 98.8 С (29), 129.0 С(9), 129.4 С(6), 129.9 С(5), 130.3 С(10). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 490.86; $C_{33}H_{62}O_2$; вычислено $M = 490.95$. Найдено, %: С 80.75; Н 12.73. Вычислено, %: С 80.73; Н 12.75.

2-(эйкоза-6Z,10Z-диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пиран (3ж)

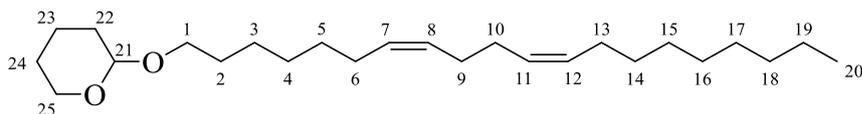


Выход 91%. $R_f = 0.37$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 664, 729, 1034, 1078, 1121, 1136, 1159, 1182, 1200, 1353, 1380, 1441, 2853, 2925, 3005. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.26–1.34 (м, 20H, CH_2), 1.51–1.66 (м, 6H, CH_2), 2.01–2.16 (м, 8H, CH_2), 3.38–3.86 (м, 4H, CH_2), 4.56 (т, 1H, CH , $J = 4$ Гц), 5.33–5.41 (м, 4H, CH).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 С(20), 19.6 С(23), 22.6 С(19), 25.5 С(24), 26.3 С(3), 27.2 С(12), 27.3 С(5) 27.4 С(8,9), 29.1 С(13), 29.5 С(14-17), 29.6 С(4), 29.7

C(2), 30.8 C(22), 31.1 C(5), 31.6 C(18), 62.2 C(25), 67.5 C(1), 98.8 C(21), 129.1 C(10), 129.2 C(6), 130.2 C(11), 130.3 C(7). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 378.64; $C_{25}H_{46}O_2$; вычислено $M = 378.71$. Найдено, %: C 79.30; H 12.25. Вычислено, %: C 79.28; H 12.27.

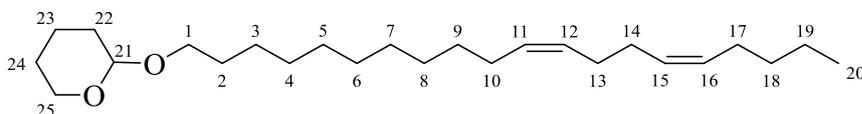
2-(эйкоза-7Z,11Z-диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пиран (3з)



Выход 93%. $R_f = 0.38$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 664, 729, 1034, 1078, 1121, 1136, 1159, 1182, 1200, 1353, 1380, 1441, 2853, 2925, 3005. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.26–1.34 (м, 20H, CH_2), 1.50–1.65 (м, 6H, CH_2), 2.02–2.16 (м, 8H, CH_2), 3.38–3.88 (м, 4H, CH_2), 4.57 (т, 1H, CH , $J = 4$ Гц), 5.35–5.40 (м, 4H, CH).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(20), 19.6 C(23), 22.6 C(19), 25.5 C(24), 26.2 C(3), 27.2 C(13), 27.3 C(6) 27.4 C(9,10), 29.1 C(14), 29.5 C(15-17), 29.6 C(4), 29.7 C(2), 30.8 C(22), 31.2 C(5), 31.9 C(18), 62.2 C(25), 67.5 C(1), 98.8 C(21), 129.0 C(11), 129.1 C(7), 130.2 C(12), 130.2 C(8). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 378.5; $C_{25}H_{46}O_2$; вычислено $M = 378.71$. Найдено, %: C 79.30; H 12.25. Вычислено, %: C 79.28; H 12.27.

2-(эйкоза-11Z,15Z-диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пиран (3и)

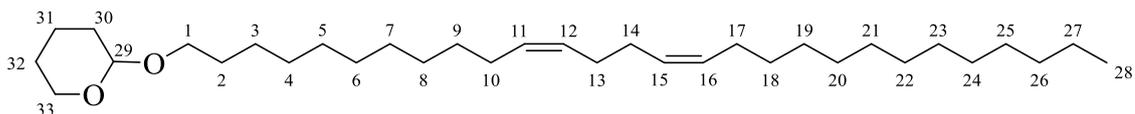


Выход 90 %. $R_f = 0.44$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 670, 765, 1033, 1078, 1125, 1159, 1181, 1202, 1354, 1381, 1441, 1662, 2853, 2925. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.0$ Гц), 1.25–1.82 (м, 26H, CH_2), 2.02–2.06 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 3.41–3.88 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{—O}$), 4.62 (м, 1H, O—CH—O), 5.38–5.46 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(20), 19.5 C(23), 22.6 C(19), 26.8 C(24), 27.2 C(17), 27.5 C(10), 27.8 C(14), 27.9 C(13), 29.3 C(8), 29.4 C(4,5), 29.5 C(7), 29.5

C(3), 29.6 C(6), 29.7 C(2), 30.6 C(22), 30.9 C (9), 31.2 C(18), 62.2 C(25), 67.2 C(1), 98.6 C(21), 129.6 C(11), 129.9 C(16), 130.4 C(12), 130.3 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 378.5; C₂₅H₄₆O₂; вычислено M = 378.71. Найдено, %: C 79.30; H 12.25. Вычислено, %: C 79.28; H 12.27.

2-(октакоза-11Z,15Z -диен-1-илокси)тетрагидро-2H-пуран (3к)



Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 0.90 (т, 3H, CH₃, J = 7.0 Гц), 1.20–1.81 (м, 42H, CH₂), 2.02–2.06 (м, 8H, CH₂CH=), 3.41–3.88 (м, 4H, CH₂–O), 4.62 (м, 1H, O–CH–O), 5.38–5.46 (м, 4H, CH=CH).

Спектр ЯМР ¹³C, δ, м.д.: 14.1 C(28), 19.5 C(31), 22.6 C(27), 25.5 C(32), 26.6 C(3), 27.2 C(17), 27.5 C(10), 27.8 C(14), 27.9 C(13), 29.3 C(8,19,25), 29.4 C(21), 29.5 C(6, 24), 29.5 C(5, 23), 29.6 C(9, 18), 29.7 C(22), 29.9 C(7, 20), 30.6 C(4), 30.7 C (2, 30), 31.6 C(26), 62.1 C(33), 67.2 C(1), 98.7 C(29), 129.8 C(11), 130.0 C(16), 130.3 C(12), 130.6 C(15).

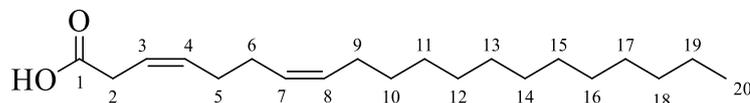
Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 490.86; C₃₃H₆₂O₂; вычислено M = 490.95. Найдено, %: C 80.75; H 12.73. Вычислено, %: C 80.73; H 12.75.

Общая методика синтеза синтеза диеновых кислот окислением эфиров тетрагидропирана алкадиенолов реагентом Джонса

В стеклянный реактор загружали тетрагидропираный эфир алкадиенола (0.5 ммоль) в ацетоне (12 мл), метилен хлористый (2 мл) и по каплям реагент Джонса (CrO₃-H₂SO₄) (1 мл). Исходные вещества добавляли при комнатной температуре (20-22 °С) и поддерживали указанную температуру при перемешивании реакционной массы в течение 1 часа. Далее состав обработали водой (5 мл), избыток растворителей упарили в ротационном испарителе под вакуумом (ацетон, CH₂Cl₂). Водный слой экстрагировали диэтиловым эфиром. Органические экстракты высушивали над безводным MgSO₄. После фильтрации сушильного агента растворитель удаляли в ротационном

испарителе. Продукт реакции хроматографировали на колонке SiO₂ (силикагель фирмы Acrus (0.060–0.200 мм), элюент – петролейный эфир-этилацетат (5/1)) [242].

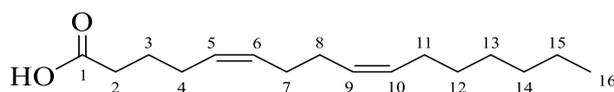
(3Z,7Z) -эйкоза-3,7-диеновая кислота (4а)



Выход 61%. $R_f = 0.56$ (гексан-EtOAc—5:1). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 735, 1035, 1240, 1365, 1385, 1465, 1660, 1740, 2855, 2920, 3010. Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH₃, J = 7.2 Гц), 1.23-1.31 (м, 20H, CH₂), 2.02–2.12 (м, 6H, CH₂CH=), 3.16 (д, 2H, CH₂–COOH, J = 6 Гц), 5.37–5.63 (м, 4H, CH=).

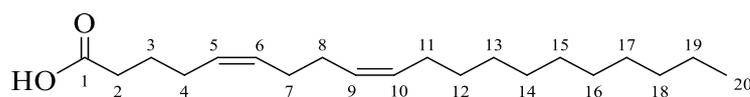
Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 14.1 C(20), 22.7 C(19), 26.9 C(5), 27.3 C(6), 27.9 C(9), 29.0 C(10), 29.2 C(12), 29.3 C(13), 29.4 C(14,15), 29.7 C(16,17), 29.8 C(11), 31.9 C(18), 34.1 C(2), 120.4 C(3), 128.4 C(7), 130.9 C(4), 133.3 C(8), 178.5 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 308.51; C₂₀H₃₆O₂; вычислено M = 308.56. Найдено, %: C 77.87; H 11.76. Вычислено, %: C 77.84; H 11.78.

(5Z,9Z) -гексадека-5,9-диеновая кислота (4б)



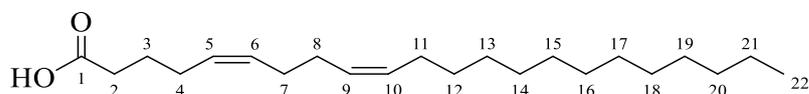
Выход 69%. $R_f = 0.49$ (гексан-EtOAc—5:1). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 3006, 2928, 2856, 1743, 1655, 1464, 1385, 1238, 1038, 969, 727. Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH₃, J = 7.2 Гц); 1.30–1.32 (м, 8H, CH₂); 1.70 (кв, 2H, CH₂, J = 7.6 Гц); 2.01–2.14 (м, 8H, =CH–CH₂); 2.37 (т, 2H, CH₂, J = 7.2 Гц); 5.33–5.46 (м, 4H, CH=).

Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 14.1 C(16), 22.6 C(15), 24.6 C(3), 26.5 C(11), 27.3 C(7,8), 27.4 C(4), 28.9 C(12), 29.7 C(13), 31.8 C(14), 33.6 C(2), 128.6 C(10), 128.9 C(9), 130.5 C(5), 130.6 C(6), 180.3 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 252.40; C₁₆H₂₈O₂; вычислено M = 252.44. Найдено, %: C 76.14; H 11.18. Вычислено, %: C 76.12; H 11.20.

(5Z,9Z) -эйкоза-5,9-диеновая кислота (4в)

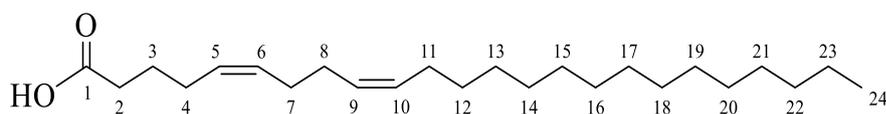
Выход 73%. $R_f = 0.55$ (гексан-EtOAc—5:1). ИК-спектр, ν / см^{-1} : 735, 1035, 1240, 1365, 1385, 1465, 1660, 1740, 2855, 2920, 3010. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.28–1.32 (м, 16H, CH_2), 1.72 (кв, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 2.01–2.15 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.38 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.6$ Гц), 5.35–5.46 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.2 C (20), 22.7 C (19), 24.6 C (3), 26.5 C (11), 27.3 C(7,8), 27.4 C(4), 29.3 C(17), 29.4 C(16), 29.6 C(13), 29.7 C(15), 29.7 C(14), 31.9 C(18), 33.5 C(2), 128.6 C(10), 128.9 C(9), 130.5 C(6), 130.6 C(5), 180.1 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 308.51; $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$; вычислено $M = 308.56$. Найдено, %: C 77.87; H 11.76. Вычислено, %: C 77.84; H 11.78.

(5Z,9Z) -докоза-5,9-диеновая кислота (4г)

Выход 74 %. $R_f = 0.51$ (гексан-EtOAc—5:1). ИК-спектр, ν / см^{-1} : 724, 1035, 1238, 1365, 1385, 1466, 1655, 1741, 2856, 2925, 3010. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.91 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.28–1.33 (м, 20H, CH_2), 1.72 (кв, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 2.03–2.15 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.38 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.2$ Гц), 5.38–5.44 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

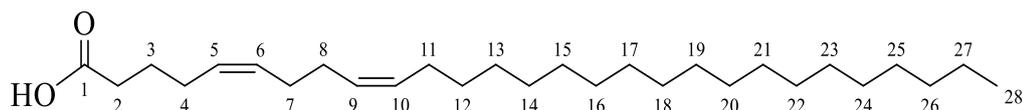
Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(22), 22.7 C(21), 24.6 C(3), 26.5 C(11), 27.3 C(7,8), 27.4 C(4), 29.3 C(13,19), 29.4 C(15), 29.5 C(18), 29.6 C(12,16,17), 29.8 C(14), 31.9 C(20), 33.4 C(2), 128.6 C(10), 128.9 C(9), 130.5 C(6), 130.6 C(5), 180.1 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 336.56; $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_2$; вычислено $M = 336.62$. Найдено, %: C 78.51; H 11.98. Вычислено, %: C 78.49; H 12.00.

(5Z, 9Z)-тетракоза-5,9-диеновая кислота (4д)

Выход 72%. $R_f = 0.51$ (гексан- EtOAc —5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 734, 1035, 1238, 1365, 1385, 1466, 1657, 1741, 2856, 2925, 3010. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.28–1.35 (м, 24H, CH_2), 1.72 (кв, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 2.02–2.13 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.37 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.2$ Гц), 5.37–5.43 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(24), 22.7 C(23), 24.6 C(3), 26.5 C(11), 27.3 C(7,8), 27.4 C(4), 29.3 C(21), 29.4 C(20), 29.4 C(16), 29.6 C(17,19), 29.7 C(12,13,19), 29.7 C(14,15,18), 31.9 C(22), 33.4 C(2), 128.6 C(10), 128.9 C(9), 130.6 C(6), 130.6 C(5), 179.7 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 364.62; $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_2$; вычислено $M = 364.68$. Найдено, %: C 79.06; H 12.16. Вычислено, %: C 79.04; H 12.19.

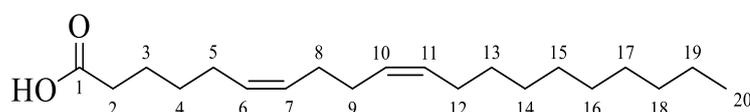
(5Z,9Z)-октакоза-5,9-диеновая кислота (4е)



Выход 74%. $R_f = 0.52$ (гексан- EtOAc —5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 735, 1030, 1238, 1365, 1380, 1466, 1659, 1741, 2856, 2925, 3011. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.91 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.28–1.33 (м, 32H, 500 CH_2), 1.72 (к, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 2.02–2.14 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.37 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.2$ Гц), 5.37–5.44 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(28), 22.7 C(27), 24.6 C(3), 26.5 C(11), 27.3 C(7,8), 27.4 C(4), 29.3 C(21), 29.4 C(20), 29.4 C(16), 29.6 C(17,19), 29.7 C(12,13,19,23), 29.7 C(14,15,18,24,25), 31.9 C(26), 33.4 C(2), 128.6 C(10), 128.9 C(9), 130.6 C(6), 130.6 C(5), 179.7 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 420.73; $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{O}_2$; вычислено $M = 420.80$. Найдено, %: C 79.94; H 12.46. Вычислено, %: C 79.91; H 12.48.

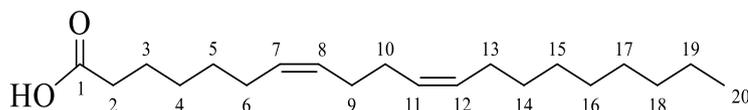
(6Z,10Z)-эйкоза-6,10-диеновая кислота (4ж)



Выход 73%. $R_f = 0.53$ (гексан- EtOAc —5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 735, 1035, 1240, 1365, 1385, 1465, 1660, 1740, 2855, 2920, 3010. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.25–1.71 (м, 18H, CH_2), 2.02–2.11 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH=}$), 2.37 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.6$ Гц), 5.35–5.44 (м, 4H, CH=CH).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(20), 22.7 C(19), 26.8 C(3), 27.2 C(12), 27.3 C(5) 27.4 C(8, 9), 29.1 C(13), 29.2 C(14), 29.4 C(16), C(15,17), 29.6 C(4), 29.7 C(2), 31.9 C(18), 33.9 C(18), 129.0 C(10), 129.4 C(6), 129.8 C(11), 130.5 C(7), 179.5 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 308.51; $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$; вычислено $M = 308.56$. Найдено, %: C 77.87; H 11.76. Вычислено, %: C 77.84; H 11.78.

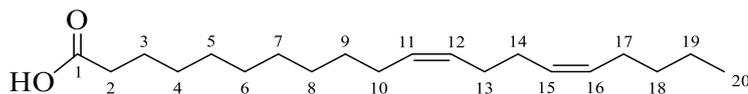
(7Z,11Z)-эйкоза-7,11-диеновая кислота (4з)



Выход 72 %. $R_f = 0.53$ (гексан- EtOAc —5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 735, 1035, 1240, 1365, 1385, 1465, 1660, 1740, 2855, 2920, 3010. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.91 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.21–1.32 (м, 16H, CH_2), 1.72 (к, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 2.01–2.15 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH=}$), 2.37 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.6$ Гц), 5.31–5.59 (м, 4H, CH=CH).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(20), 22.7 C(19), 24.6 C(3), 27.0 C(13), 27.2 C(6), 27.3 C(9), 27.4 C(10), 29.3 C(14), 29.4 C(16,17), 29.6 C(15), 29.7 C(2), 29.7 C(5), 31.9 C(18), 34.2 C(4), 129.1 C(11), 129.5 C(7), 130.2 C(12), 130.4 C(8), 180.5 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 308.51; $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$; вычислено $M = 308.56$. Найдено, %: C 77.87; H 11.76. Вычислено, %: C 77.84; H 11.78.

(11Z,15Z)-эйкоза-11,15-диеновая кислота (4и)

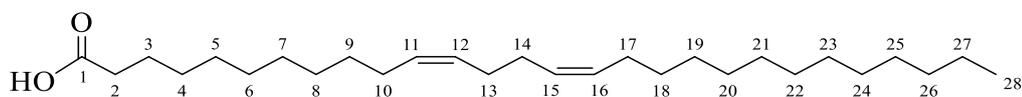


Выход 73 %. $R_f = 0.55$ (гексан- EtOAc —5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 737, 1035, 1241, 1365, 1385, 1465, 1662, 1740, 2854, 2920, 3015. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.:

0.91 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.29–1.35 (м, 16H, CH_2), 1.65 (м, 2H, CH_2), 2.03–2.10 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.37 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.6$ Гц), 5.39–5.40 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.0 C(20), 22.4 C(19), 24.7 C(2), 26.7 C(17), 27.3 C(10), 27.4 C(13,14), 29.1 C(8), 29.3 C(3), 29.4 C(4,5), 29.5 C(7), 29.7 C(6), 31.9 C(18), 33.9 C(9), 129.1 C(11), 129.2 C(16), 130.3 C(12,15), 179.8 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 308.51; $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$; вычислено $M = 308.56$. Найдено, %: C 77.87; H 11.76. Вычислено, %: C 77.84; H 11.78.

(11Z,15Z) -октакоза-11,15-диеновая кислота (4к)



Выход 71 %. $R_f = 0.54$ (гексан-EtOAc—5:1). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 735, 1035, 1240, 1365, 1385, 1465, 1660, 1740, 2855, 2920, 3010. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.91 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.21–1.32 (м, 32H, CH_2), 1.72 (к, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 2.01–2.14 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.34 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.6$ Гц), 5.31–5.59 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.91 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.29–1.35 (м, 16H, CH_2), 1.65 (м, 2H, CH_2), 2.03–2.10 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.37 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.6$ Гц), 5.39–5.40 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

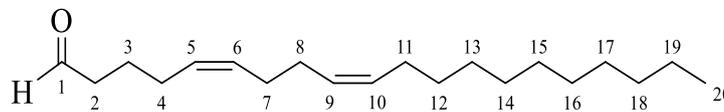
Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(28), 22.7 C(27), 24.7 C(2), 27.3 C(17,10), 27.4 C(13,14), 29.1 C(25), 29.2 C(3), 29.3 C(24), 29.1 C(4), 29.3 C(5,8,19), 29.4 C(6,21,25), 29.5 C(24), 29.6 C(9,18,22,23), 29.7 C(20), 30.2 C(7), 31.2 C(26), 129.1 C(11), 129.2 C(16), 130.3 C(12), 130.4 C(15), 178.8 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 420.73; $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{O}_2$; вычислено $M = 420.80$. Найдено, %: C 79.94; H 12.46. Вычислено, %: C 79.91; H 12.48.

Общая методика синтеза диеновых альдегидов

В стеклянный реактор при перемешивании в атмосфере аргона ($\sim 0^\circ\text{C}$) загружали диэтиловый эфир (30 мл), тридека-1,2-диен (0,86 г, 4,8 ммоль), 2-(гекса-4,5-диен-1-ил)-1,3-диоксолан (0,62 г, 4,0 ммоль), EtMgBr (8 мл 1,5 М раствора в Et₂O), порошок Mg (0,19 г, 8 ммоль) и Cr_2TiCl_2 (0,10 г, 0,40 ммоль).

Реакционную смесь доводили до комнатной температуры (20–22 °С) и перемешивали в течение 7 часов. Затем смесь обрабатывали насыщенным водным раствором NH_4Cl (20 мл) и далее 10%-ным водным раствором HCl (20 мл) с получением альдегида. Продукт экстрагировали диэтиловым эфиром (2×100 мл). Органическую фазу отделяли от воды, сушили над безводным MgSO_4 и фильтровали. Эфир отгоняли в вакууме и остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (силикагель фирмы Acrus (0.060–0.200 мм), элюент – гексан-этилацетат (30/1)).

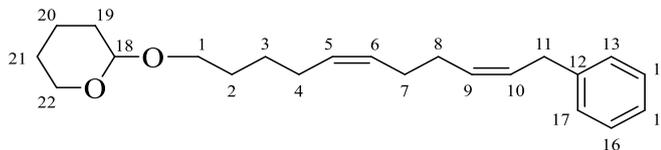
(5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеналь (10)



Выход 85%. $R_f = 0.51$ (гексан- EtOAc —5:1). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 735, 1025, 1232, 1366, 1380, 1455, 1657, 1741, 2858, 2915, 3010. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.88 (т, 3H, CH_3 , $J = 7$ Гц), 1.24–1.48 (m, 16H, CH_2), 1.68–1.72 (m, 2H, CH_2), 2.04–2.10 (м, 8H, $=\text{CH}-\text{CH}_2$), 2.42–2.45 (м, 2H, $\text{O}=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5.33–5.42 (м, 4H, $=\text{CH}$), 9.76 (м, 1H, $\text{O}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C (20), 22.6 C(19), 22.7 C(3), 26.5 C(11), 27.2 C(7,8), 27.4 C(4), 29.3 C(17), 29.3 C(16), 29.6 C(13), 29.6 C(15), 29.7 C(14), 31.9 C(18), 43.3 C(2), 128.6 C(10), 128.8 C(9), 130.5 C(6), 130.6 C(5), 202.3 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 292,50; $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}$; вычислено $M = 292.49$. Найдено, %: C 81.99; H 12.34. Вычислено, %: C 82.12; H 12.41.

2-[(11-фенилундека-5Z,9Z-диен-1-ил)окси]тетрагидро-2H-пиран (6)

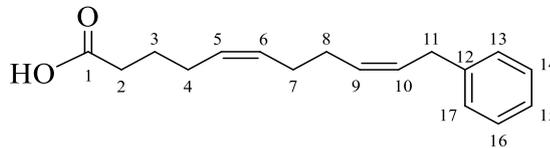


Выход 86%. $R_f = 0.45$ (гексан- EtOAc – 5:1). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 699, 747, 1032, 1075, 1120, 1200, 1261, 1352, 1453, 1661, 1762, 2870, 2938, 3390. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.27–1.89 (м, 10H, CH_2), 2.08–2.26 (м, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 3.48 (d, 2H,

$\text{CH}_2\text{-Ph}$, $J = 6.8$ Гц), 3.52–3.92 (м, 4Н, $\text{CH}_2\text{-O}$, $J = 6.8$ Гц), 4.58 (т, 1Н, $J = 3.6$ Гц), 5.41–5.65 (м, 4Н, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.22–7.36 (м, 5Н, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 19.8 C(20), 25.5 C(21), 27.2 C(4), 27.3 C(2), 27.4 C(7), 27.5 C(8), 30.8 C(19), 33.6 C(11), 62.3 C(22), 67.5 C(1), 98.8 C(18), 125.9 C(15), 128.2 C(13,17), 128.4 C(14,16), 128.5 C(9), 129.2 C(6), 129.6 C(5), 130.3 C(10), 141.1 C(12). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 328.50; $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$; вычислено $M = 328.54$. Найдено, %: C 80.44; H 9.82. Вычислено, %: C 80.42; H 9.83.

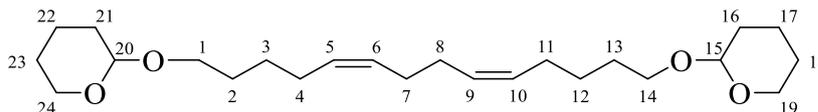
(5Z,9Z) -11-фенилундека-5,9-диеновая кислота (7)



Выход 75 %. $R_f = 0.52$ (гексан-EtOAc—5:1). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 734, 1035, 1238, 1365, 1385, 1466, 1657, 1741, 2856, 2925, 3010, 3395. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.70–1.76 (м, 2Н), 2.13–2.40 (м, 8Н, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 3.43 (d, 2Н, $\text{CH}_2\text{-Ph}$, $J = 7.5$ Гц), 5.39–5.63 (м, 4Н, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.20–7.33 (м, 5Н, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 24.7 C(2), 26.5 C(4), 27.3 C(7), 33.4 C(8), 33.6 C(11), 125.9 C(15), 128.3 C(13,17), 128.4 C(14,16), 128.5 C(9), 128.6 C(6), 130.1 C(5), 130.4 C(10), 141.1 C(12), 179.8 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 258.36; $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_2$; вычислено $M = 258.16$. Найдено, %: C 78.84; H 8.60. Вычислено, %: C 79.04; H 8.58.

15,20-[(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диилбис(окси)]бистетрагидро-2H-пиран (12)

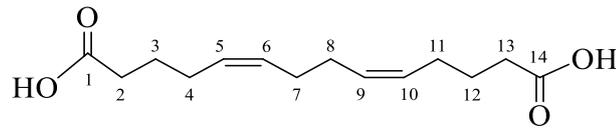


Выход 78%. $R_f = 0.56$. ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 647, 733, 908, 981, 1030, 1078, 1136, 1323, 1440, 2245, 2871, 2948. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.34–1.81 (м, 20Н, CH_2), 1.99–2.11 (м, 8Н, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 3.30–3.84 (м, 8Н, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.52 (т, 2Н, O-CH

O, $J = 3.6$ Гц), 5.29-5.36 (м, 4H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 19.56 C(17,22), 25.47 C(18,23), 26.33 C(3,12), 26.99 C(7,8), 27.32 C(4,11), 29.31 C(2,13), 30.70 C(16,21), 62.09 C(19,24), 67.34 C(1,14), 98.66 C(15,20), 129.34 C(6,9), 129.90 C(5,10). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 394.6; $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_4$; вычислено $M = 394.8$. Найдено, %: C 72.91; H 10.15. Вычислено, %: C 73.05; H 10.73.

(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диовая кислота (13)



Выход: 52%. Белое тв. в-во. R_f (гексан-EtOAc – 3:1): 0.36. ИК-спектр $\nu/\text{см}^{-1}$: 651, 734, 912, 981, 1030, 1078, 1136, 1247, 1323, 1440, 1745, 2871, 2949. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 5.44 (м, 2H, $\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}=\underline{\text{H}}$), 5.36 (м, 2H, $\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}=\underline{\text{H}}$), 2.39 (м, 4H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{COOH}$), 2.12 (м, 4H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}=\underline{\text{C}}$), 2.08 (м, 4H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}=\underline{\text{C}}$), 1.73 (м, 4H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$).

Спектр ЯМР ^{13}C (d, м.д.): 180.0 (C(1), C(14)), 130.5 (C(6), C(9)), 128.8 (C(5), C(10)), 33.21 (C(2), C(13)), 27.4 (C(7), C(8)), 26.2 (C(4), C(11)), 24.5 (C(3), C(12)).

Вычислено (%): C 66.12; H 8.72. $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_4$. Найдено (%): C 66.21; H 8.65.

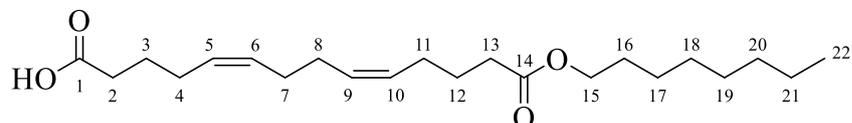
Методика этерификации алифатических и ароматических спиртов

(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диовой кислотой

В стеклянный реактор при перемешивании к раствору смеси спирта (R-OH, R= C_8H_{17} , C_9H_{19} , $\text{C}_{11}\text{H}_{23}$, $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$, о-нафтил, п-нафтил, бензил) (40 ммоль), (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диовой кислоты (30 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (4 ммоль) в CH_2Cl_2 (150 мл) добавляли по каплям раствор дициклогексилкарбодиимида (40 ммоль) в CH_2Cl_2 (120 мл). Смешение реагентов осуществляли при комнатной температуре (20-22 °C) в течение 3 часов. Осадок удалили фильтрованием, фильтрат концентрировали под вакуумом в ротационном испарителе. Целевые сложные эфиры

хроматографировали на колонке SiO₂ (силикагель фирмы Acus (0.060–0.200 мм), элюент – петролейный эфир-этилацетат (20:1, 5:1)) [243].

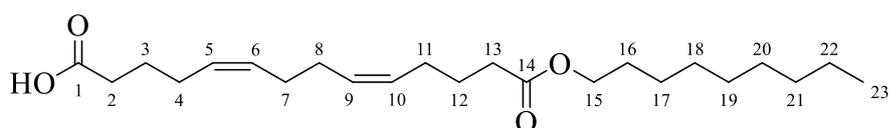
(5Z,9Z)-14-(октилокси)-14-оксотетрадека-5,9-диеновая кислота (14a)



Выход 69 %. $R_f = 0.54$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 736, 1034, 1241, 1250, 1365, 1385, 1463, 1665, 1722, 1740, 2865, 2900, 3525. Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.6$ Гц), 1.31 (д, 12H, CH_2 , $J = 12.0$ Гц), 1.59-1.76 (м, 4H, CH_2), 1.99-2.16 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.35 (т, 4H, CH_2COOH , $J = 7.5$ Гц), 4.08 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.7$ Гц), 5.42-5.34 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 14.1 C(22), 22.6 C(21), 24.6 C(4), 24.9 C(12), 25.9 C(17), 26.5 C(11), 26.6 C(3), 27.3 C(7,8), 28.6 C(16), 29.2 C(18,19), 31.8 C(20), 33.3 C(2), 33.8 C(13), 64.6 C(15), 128.8 C(9), 129.1 C(6), 130.1 C(5), 130.4 C(10), 174.0 C(14), 179.4 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 366.55; C₂₂H₃₈O₄; вычислено $M = 366.50$. Найдено, %: C 72.10; H 10.45. Вычислено, %: C 72.09; H 10.44.

(5Z,9Z)-14-(нонилокси)-14-оксотетрадека-5,9-диеновая кислота (14b)



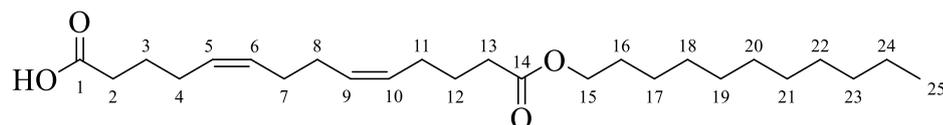
Выход 71%. $R_f = 0.54$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 748, 1130, 1242, 1367, 1465, 1651, 1740, 1780, 2838, 2930, 3045, 3378.

Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 0.89 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.28-1.32 (м, 12H, CH_2), 1.67-1.73 (м, 4H, CH_2), 1.61-1.64 (м, 2H, CH_2), 2.06-2.09 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.38 (т, 2H, CH_2COOH , $J = 7.6$ Гц), 2.31 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 4.07 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.0$ Гц), 5.38-5.39 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 14.1 C(23), 22.7 C(22), 24.8 C(12), 24.9 C(3), 25.9 C(17), 26.6 C(11), 26.8 C(4), 27.3 C(7,8), 28.2 C(16), 28.6 C(19), 29.2 C(20), 29.5

C(18), 31.8 C(21), 33.4 C(2), 33.8 C(13), 64.6 C(15), 129.0 C(10), 129.6 C(5), 129.7 C(9), 130.2 C(6), 173.0 C(14), 178.1 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 380.57; C₂₃H₄₀O₄. Вычислено $M = 380.56$. Найдено, %: C 72.60; H 10.58. Вычислено, %: C 72.60; H 10.59.

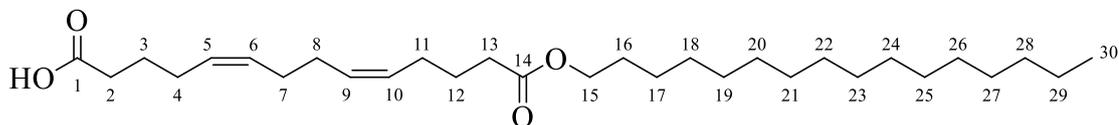
(5Z,9Z)-14-(оксо)-14-(ундецилокси)тетрадека-5,9-диеновая кислота (14в)



Выход 73%. $R_f = 0.55$ (гексан- $\text{EtOAc} - 20:1$). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 752, 1030, 1168, 1253, 1358, 1390, 1463, 1670, 1735, 1748, 2865, 2918, 3520. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.88 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.28-1.32 (м, 16H, CH_2), 1.67-1.73 (м, 4H, CH_2), 1.61-1.64 (м, 2H, CH_2), 2.06-2.09 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.38 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J = 7.6$ Гц), 2.31 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 4.08 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.0$ Гц), 5.42-5.33 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(25), 22.7 C(24), 24.6 C(4), 24.9 C(12), 25.9 C(17), 26.5 C(11), 26.6 C(3), 27.3 C(7,8), 28.6 C(16), 29.3 C(18,22), 29.5 C(21), 29.6 C(19,20), 31.9 C(23), 33.8 C(2,13), 64.6 C(15), 128.3 C(9), 129.1 C(6), 130.2 C(5), 130.4 C(10), 174.0 C(14), 179.1 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 408.32; C₂₅H₄₄O₄; вычислено $M = 408.61$. Найдено, %: C 73.48; H 10.85. Вычислено, %: C 73.49; H 10.84.

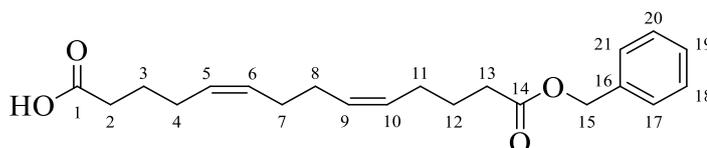
(5Z,9Z)-14-(гексадецилокси)-14-оксотетрадека-5,9-диеновая кислота (14г)



Выход 75%. $R_f = 0.54$ (гексан- $\text{EtOAc} - 10:1$). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 736, 1025, 1158, 1248, 1330, 1378, 1463, 1670, 1730, 2865, 2920, 3520. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.28-1.32 (м, 28H, CH_2), 1.68-1.76 (м, 4H, CH_2), 2.06-2.15 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.33 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 2.379 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 4.08 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.8$ Гц), 5.34-5.44 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(30), 22.7 C(29), 24.6 C(4), 24.9 C(12), 25.9 C(17), 26.5 C(11), 26.6 C(3), 27.3 C(7,8), 28.6 C(16), 29.3 C(18), 29.4 C(27), 29.5 C(19), 29.7 C(20-26), 31.9 C(28), 33.3 C(2), 33.8 C(13), 64.6 C(15), 128.8 C(9), 129.1 C(6), 130.4 C(5), 130.2 C(10), 174.0 C(14), 179.1 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 478.40; $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_4$; вычислено $M = 478.75$. Найдено, %: C 75.26; H 11.37. Вычислено, %: C 75.27; H 11.36.

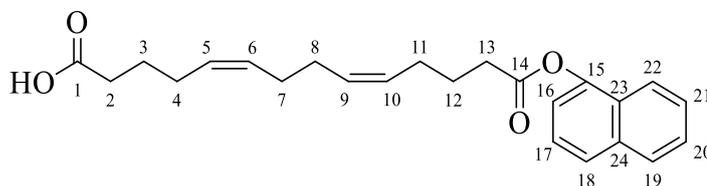
(5Z,9Z)-14-(бензилокси)-14-оксотетрадека-5,9-диеновая кислота (14д)



Выход 75%. $R_f = 0.52$ (гексан-EtOAc – 3:1). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 735, 1018, 1265, 1360, 1478, 1564, 1640, 1718, 1854, 3035, 3360. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.69-1.76 (м, 4H, CH_2), 2.08-2.13 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.36-2.41 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{-C}=\text{O}$), 5.14 (с, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-Ph}$), 5.34-5.43 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.33-7.40 (м, 5H, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 24.6 C(12), 24.9 C(3), 26.5 C(11), 26.6 C(4), 27.2 C(8), 27.3 C(7), 33.3 C(2), 33.7 C(13), 66.2 C(15), 128.2 C(17,19,21), 128.6 C(18,20), 128.8 C(10), 128.9 C(5), 130.2 C(9), 130.3 C(6), 136.0 C(16), 173.7 C(14), 179.1 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 344.48; $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$; вычислено $M = 344.42$. Найдено, %: C 73.23; H 8.19. Вычислено, %: C 73.23; H 8.18.

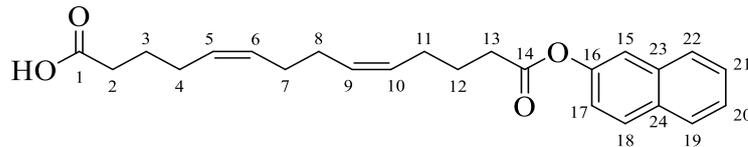
(5Z,9Z)-14-(15-нафтилокси)-14-оксотетрадека-5,9-диеновая кислота (14е)



Выход 78%. $R_f = 0.53$ (гексан-EtOAc – 3:1). ИК-спектр, ν / cm^{-1} : 742, 1020, 1263, 1365, 1470, 1642, 1718, 1850, 3030, 3360. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.68-1.75 (м, 4H, CH_2), 2.04-2.18 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.37 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J = 6$ Гц), 2.78 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 5.35-5.54 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.26-7.91 (м, 7H, NPh).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 24.5 C(4), 25.0 C(12), 26.5 C(11), 26.7 C(3), 27.3 C(7,8), 33.3 C(2), 33.8 C(13), 118.1 C(16), 121.1 C(22), 125.4 C(17), 125.9 C(18), 126.4 C(20,21), 126.9 C(23), 128.1 C(19), 128.8 C(9), 128.9 C(6), 130.4 C(5), 130.6 C(10), 134.7 C(24), 146.6 (15), 172.3 C(14), 179.5 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 380.49; $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$; вычислено $M = 380.44$. Найдено, %: C 75.76; H 7.42. Вычислено, %: C 75.77; H 7.41.

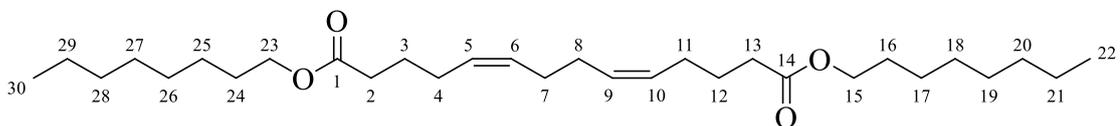
(5Z,9Z)-14-(16-нафтилокси)-14-оксотетрадека-5,9-диеновая кислота (14ж)



Выход 81%. $R_f = 0.54$ (гексан-EtOAc – 3:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 741, 1020, 1265, 1360, 1474, 1646, 1720, 1852, 3030, 3360. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.69-1.75 (м, 4H, CH_2), 2.12-2.17 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.37 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J = 6$ Гц), 2.66 (т, 2H, CH_2 , $J = 6$ Гц), 5.36-5.51 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.24-7.88 (м, 7H, NPh).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 24.6 C(4), 24.9 C(12), 26.5 C(11), 26.6 C(3), 27.3 C(7,8), 33.3 C(2), 33.9 C(13), 118.5 C(15), 121.1 C(17), 125.7 C(20), 126.5 C(21), 127.6 C(22), 127.8 C(19), 128.8 C(5), 128.9 C(10), 129.4 C(18), 130.4 C(6,9), 131.4 C(24), 133.8 C(23), 148.4 C(16), 172.4 C(14), 179.6 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 380.49; $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$; вычислено $M = 380.44$. Найдено, %: C 75.76; H 7.42. Вычислено, %: C 75.77; H 7.41.

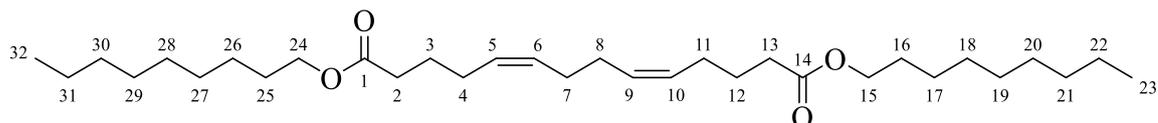
(5Z,9Z)-диоктил тетрадека-5,9-диендиоат (15а)



Выход 12%, $R_f = 0.56$ (гексан-EtOAc – 80:1). ИК-спектр $\nu / \text{см}^{-1}$: 732, 1035, 1205, 1365, 1390, 1466, 1657, 1740, 2856, 3020. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.29-1.32 (м, 22H, CH_2), 1.60-1.66 (м, 4H, CH_2), 1.68-1.74 (м, 4H, CH_2), 2.01-2.12 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.32 (т, 4H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 4.07 (т, 4H, CH_2 , $J = 6.8$ Гц), 5.34-5.43 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(22,30), 22.6 C(21,29), 24.9 C(3,12), 25.9 C(17,25), 26.6 C(4,11), 27.3 C(7,8), 28.6 C(16,24), 29.2, C(18,19,26,27), 31.8 C(20,28), 33.8 C(2,13), 64.5 C(15,23), 129.0 C(5,10), 130.2 C(6,9), 173.7 C(1,14).
 Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 478.76; $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_4$; вычислено $M = 478.70$.
 Найдено, %: C 75.26; H 11.37. Вычислено, %: C 75.27; H 11.36.

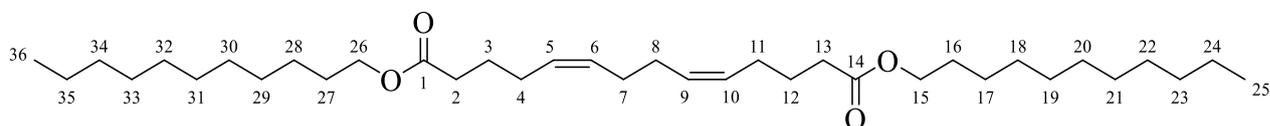
(5Z,9Z)-динонил тетрадека-5,9-диендиоат (15б)



Выход 8%. $R_f = 0.56$ (гексан-EtOAc – 80:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 740, 1030, 1200, 1333, 1385, 1462, 1654, 1840, 2848, 3025. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 6H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.28-1.32 (м, 28H, CH_2), 1.59-1.73 (м, 4H, CH_2), 2.06-2.13 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 2.29-2.35 (м, 4H, CH_2), 4.07 (т, 4H, CH_2 , $J = 6.8$ Гц), 5.33-5.42 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(23,32), 22.6 C(22,31), 24.9 C(3,12), 25.9 C(17,26), 26.6 C(14,4), 27.3 C(7,8), 28.6 C(16,25), 29.2 C(19,28), 29.3 C(20,29), 29.5 C(18,27), 31.8 C(21,30), 33.8 C(2,13), 64.5 C(15,24), 129.0 C(5,10), 130.2 C(6,9), 173.7 C(1,14). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 506.82; $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_4$; вычислено $M = 506.75$. Найдено, %: C 75.84; H 11.54. Вычислено, %: C 75.85; H 11.52.

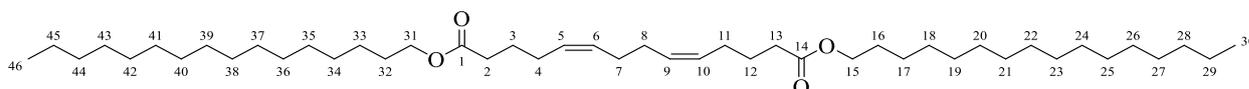
(5Z,9Z)-диундецил тетрадека-5,9-диендиоат (15в)



Выход 14%. $R_f = 0.58$ (гексан-EtOAc – 80:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 750, 1027, 1210, 1362, 1386, 1460, 1655, 1735, 2847, 3020. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.88 (т, 6H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.27-1.30 (м, 32H, CH_2), 1.58-1.65 (м, 4H, CH_2), 1.67-1.72 (м, 4H, CH_2), 2.05-2.10 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 2.30 (т, 4H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 4.06 (т, 4H, CH_2 , $J = 6.8$ Гц), 5.32-5.41 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(25,36), 22.7 C(24,35), 24.9 C(3,12), 25.9 C(17,28), 26.6 C(4,11), 27.2 C(7,8), 28.7 C(16,27), 29.2 C(18,22,29,33), 29.3 C(21,32), 29.5 C(19,30), 29.6 C(20,31), 31.9 C(23,34), 33.7 C(2,13), 64.4 C(15,26), 128.9 C(5,10), 130.1 C(6,9), 173.7 C(1,14). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 562.93; $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{O}_4$; вычислено $M = 562.85$. Найдено, %: C 76.81; H 11.82. Вычислено, %: C 76.82; H 11.81.

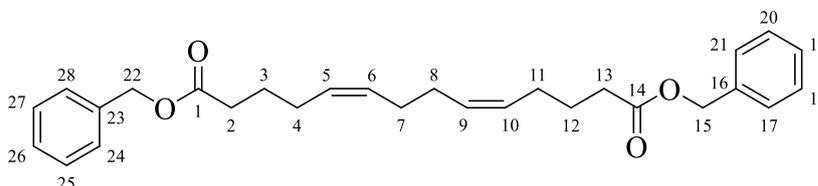
(5Z,9Z)-дигексадецил тетрадека-5,9-диендиоат (15г)



Выход 12%. $R_f = 0.58$ (гексан-EtOAc – 60:1). ИК-спектр $\nu/\text{см}^{-1}$: 740, 1032, 1205, 1330, 1386, 1464, 1740, 1845, 2850, 3025. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 6H, CH_3 , $J = 6.0$ Гц), 1.27-1.32 (м, 56H, CH_2), 1.59-1.65 (м, 4H, CH_2), 2.06-2.11 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 2.31 (т, 4H, CH_2 , $J = 6.0$ Гц), 4.06 (т, 4H, CH_2 , $J = 5.6$ Гц), 5.33-5.43 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(30,46), 22.7 C(29,45), 24.9 C(3,12), 25.9 C(17,33), 26.6 C(4,11), 27.3 C(7,8), 28.7 C(16,32), 29.3 C(18,34), 29.4 C(27,43), 29.5 C(19,35), 29.7 C(20-26,36-39,49,41,42), 31.9 C(28,44), 33.7 C(2,13), 64.4 C(15,31), 129.0 C(5,10), 130.1 C(6,9), 173.7 C(1,14). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 702.65; $\text{C}_{46}\text{H}_{86}\text{O}_4$; вычислено $M = 703.17$. Найдено, %: C 78.57; H 12.33. Вычислено, %: C 78.58; H 12.31.

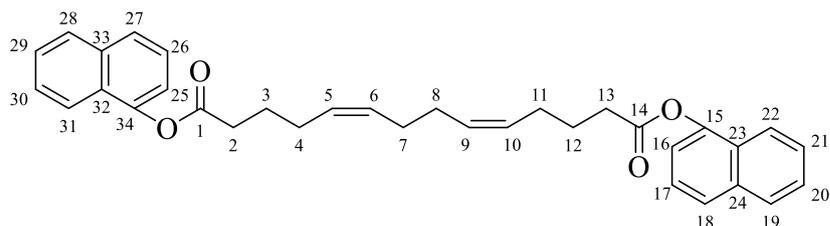
(5Z,9Z)-дибензил тетрадека-5,9-диендиоат (15д)



Выход 13%. $R_f = 0.57$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 735, 1022, 1260, 1370, 1475, 1562, 1645, 1720, 1855, 3030, 3360. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.69-1.78 (м, 4H, CH_2), 2.06-2.12 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 2.39 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{-C}=\text{O}$, $J = 7.6$ Гц), 5.14 (с, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-Ph}$), 5.33-5.42 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.33-7.38 (м, 10H, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 24.8 C(3,12), 26.6 C(11,2), 27.2 C(7,8), 33.7 C(2,13), 66.1 C(15,22), 128.2 C(17,19,21,24,26,28), 128.6 C(5,10), 128.9 C(18,20,25,27), 130.3 C(6,9), 136.1 C(16,23), 173.5 C(1,14). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 434.58; $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_4$; вычислено $M = 434.54$. Найдено, %: C 77.39; H 7.89. Вычислено, %: C 77.39; H 7.88.

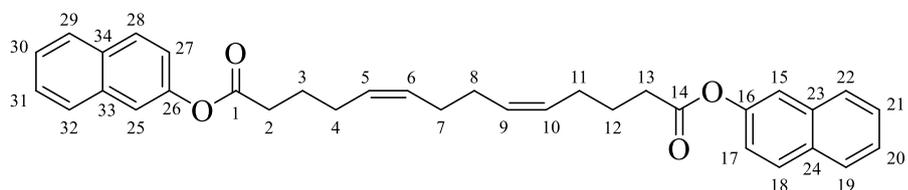
(5Z,9Z)-ди-15,25-нафтил тетрадека-5,9-диендиоат (15e)



Выход 11%. $R_f = 0.58$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 740, 1025, 1265, 1375, 1467, 1645, 1720, 1850, 3030. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.92-1.99 (м, 4H, CH_2), 2.13-2.31 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.77 (т, 4H, CH_2 , $J = 7.2\text{Гц}$), 5.46-5.59 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.26-7.91 (м, 14H, NPh).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 24.9 C(3,12), 26.7 C(4,11), 27.4 C(7,8), 33.8 C(2,13), 118.1 C (16,26), 121.1 C(22,32), 125.4 C(17,27), 125.9 C(18,28), 126.4 C(20,21,30,31), 126.9 C(23,33), 128.1 C(19,29), 128.9 C(5,10), 130.6 C(6,9), 134.7 C(24,34), 146.6 C(15,25), 172.1 C(1,14). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 506.65; $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_4$; вычислено $M = 506.60$. Найдено, %: C 80.60; H 6.76. Вычислено, %: C 80.61; H 6.76.

(5Z,9Z)-ди-16,26-нафтил тетрадека-5,9-диендиоат (15ж)



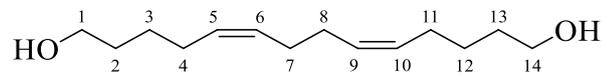
Выход 9%. $R_f = 0.58$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 740, 1022, 127, 1378, 1467, 1640, 1725, 1852, 3035. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.87-1.94 (м, 4H, CH_2), 2.17-2.28 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.66 (т, 4H, CH_2 , $J = 7.2\text{Гц}$), 5.45-5.58 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.24-7.89 (м, 14H, NPh).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 24.9 C(3,12), 26.6 C(4,11), 27.4 C(7,8), 33.8 C(2,13), 118.5 C(15,25), 121.2 C(17,27), 125.7 C(20,30), 126.6 C(21,31), 127.6 C(22,32), 127.8 C(19,29), 128.9 C(5,10), 129.4 C(18,28), 130.6 C(6,9), 131.5 C(34,24), 133.8 C(23,33), 148.4 C(16,26), 172.3 C(1,14). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 506.65; $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_4$; вычислено $M = 506.61$. Найдено, %: C 80.60; H 6.76. Вычислено, %: C 80.61; H 6.75.

Методика этерификации алифатических и ароматических карбоновых кислот (5Z,9Z)-1,14-ундека-5,9-диендиолом

К раствору смеси (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диола (40 ммоль), карбоновой кислоты ($\text{R}-\text{COOH}$, $\text{R}=\text{C}_4\text{H}_9$, C_7H_{15} , C_9H_{19} , бензил, нафтил) (30 ммоль или 85 ммоль для прямого синтеза) и 4-диметиламинопиридина (4 ммоль) в CH_2Cl_2 (150 мл) при комнатной температуре (20-22 °C) добавляли по каплям раствор дициклогексилкарбодиимида (40 ммоль) в CH_2Cl_2 (120 мл). Смешение реагентов осуществляли при комнатной температуре (20-22 °C) в течение 3 часов. Осадок удалили фильтрованием, фильтрат концентрировали под вакуумом в ротационном испарителе. Целевые эфиры хроматографировали на колонке SiO_2 (силикагель фирмы Acrus (0.060–0.200 мм), элюент – петролейный эфир-этилацетат (20:1, 5:1)) [243].

(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диол (16)

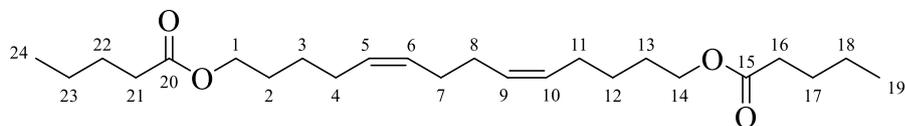


Выход 78%. $R_f = 0.52$ (гексан-EtOAc – 1:1). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 816, 907, 991, 1078, 1121, 1136, 1182, 1201, 1380, 1441, 2853, 2927, 3403. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.40-1.63 (м, 8H, CH_2), 2.06-2.09 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 3.65 (т, 4H, CH_2-OH , $J = 6.8$ Гц), 5.36-5.47 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 25.8 C(3,12), 26.9 C(7,8), 27.4 C(4,11), 32.3 C(2,13), 62.8 C(1,14), 129.6 C(6,9), 129.9 C(5,10). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z

226.36; $C_{14}H_{26}O_2$; вычислено $M = 226.33$. Найдено, %: С 74.29; Н 11.58.
Вычислено, %: С 74.29; Н 11.57.

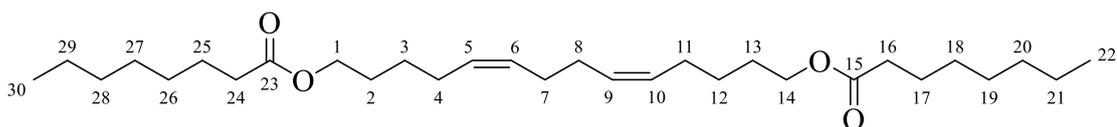
(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диил дипентаноат (17a)



Выход 89%. $R_f = 0.34$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 730, 1020, 1215, 1330, 1378, 1460, 1652, 1840, 2850, 3022. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 6H, CH_3 , $J = 7.6$ Гц), 1.23-1.42 (м, 4H, CH_2), 1.54-1.64 (м, 12H, CH_2), 2.01-2.06 (м, 8H, $CH_2CH=$), 2.27 (т, 4H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 4.04 (т, 4H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 5.29-5.42 (м, 4H, $CH=CH$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 13.7 C(19,24), 22.2 C(18,23), 25.9 C(3,12), 26.7 C(7,8), 27.1 C(17,22), 27.3 C(4,11), 28.2 C(2,13), 34.1 C(16,21), 64.1 C(1,14), 129.5 C(6,9), 129.6 C(5,10), 173.8 C(15,20). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 394.60; $C_{24}H_{42}O_4$; вычислено $M = 394.55$. Найдено, %: С 73.05; Н 10.73.
Вычислено, %: С 73.06; Н 10.72.

(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диил диоктаноат (17b)

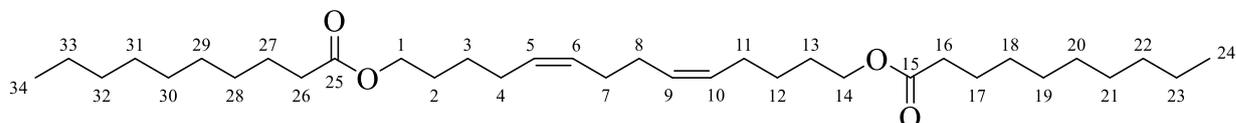


Выход 87%. $R_f = 0.37$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 730, 1035, 1210, 1328, 1375, 1470, 1648, 1840, 2865, 3023. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 0.90 (т, 6H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.28-1.30 (м, 16H, CH_2), 1.62-1.69 (м, 12H, CH_2), 2.02-2.10 (м, 8H, $CH_2CH=$), 2.31 (т, 4H, $CH_2-C=O$, $J = 7.6$ Гц), 4.08 (т, 4H, CH_2-O , $J = 6.8$ Гц), 5.34-5.45 (м, 4H, $CH=CH$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(22,30), 22.6 C(21,29), 25.0 C(17,25), 26.0 C(3,12), 26.8 C(4,11), 27.3 C(7,8), 28.3 C(2,13), 28.9 C(18,26), 29.1 C(19,27), 31.7 C(20,28), 34.4 C(16,24), 64.2 C(1,14), 129.6 C(6,9), 129.7 C(5,10), 173.9 C(15,23).

Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 478,76; $C_{30}H_{54}O_4$; вычислено $M = 478.70$.
 Найдено, %: C 75.26; H 11.37. Вычислено, %: C 75.27; H 11.36.

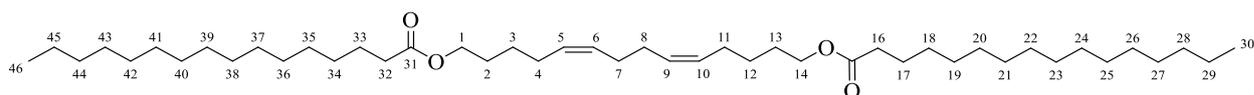
(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диил дидеканоат (17в)



Выход 88%. $R_f = 0.35$ (гексан-EtOAc 20:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 742, 1030, 1200, 1332, 1385, 1460, 1656, 1845, 2850, 3032. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 6H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.28-1.30 (м, 24H, CH_2), 1.61-1.69 (м, 12H, CH_2), 2.05-2.10 (м, 8H, $CH_2CH=$), 2.30 (т, 4H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 4.08 (т, 4H, CH_2-O , $J = 6.8$ Гц), 5.34-5.42 (м, 4H, $CH=CH$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(24,34). 22.7 C(23,33), 25.0 C(17,27), 26.0 C(3,12), 27.3 C(2,4,11,13), 28.3 C(7,8), 29.2 C(19,29), 29.3 C(20,21,30,31), 29.4 C(18,28), 31.9 C(22,32), 34.4 C(16,26), 64.2 C(1,14), 129.6 C(5,10), 129.7 C(6,9), 173.9 C(15,25). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 534.87; $C_{34}H_{62}O_4$; вычислено $M = 534.80$. Найдено, %: C 76.35; H 11.68. Вычислено, %: C 76.36; H 11.67.

(5Z,9Z)-14-(тетрадеканоиокси)тетрадека-5,9-диен-1-ил палмитат (17г)

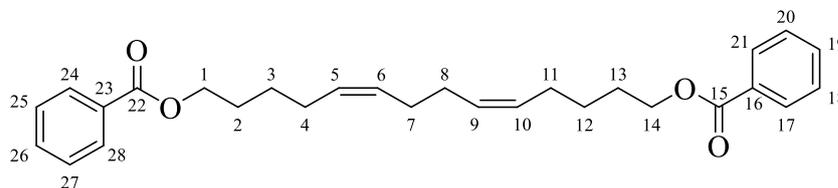


Выход 89%. $R_f = 0.34$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 735, 1020, 1215, 1322, 1370, 1480, 1652, 1840, 2860, 3030. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 6H, $2CH_3$, $J = 7.2$ Гц), 1.27-1.29 (м, 48H, $24CH_2$), 1.61-1.69 (м, 12H, $6CH_2$), 2.02-2.10 (м, 8H, $4CH_2CH=$), 2.30 (т, 4H, $CH_2-CO-O-$, $J = 7.6$ Гц), 4.08 (т, 4H, $CH_2-O-CO-$, $J = 6.4$ Гц), 5.34-5.42 (м, 4H, $4CH=$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(20,46), 22.7 C(29,45), 25.0 C(17,33), 26.0 C(3,12), 26.8 C(7,8), 27.3 C(4,11), 29.2 C(18,34), 29.3 C(19,35), 29.4 C(2,13,27,43), 29.5 C(20,36), 29.6 C(22-24,38-40), 29.7 C(21,25,26,37,41,42), 31.9 C(28,44), 34.4 C(16,32), 64.2 C(1,14), 129.6 C(6,9), 129.7 C(5,10), 173.9 C(15,31). Масс-спектр

MALDI TOF: найдено m/z 703.20; $C_{46}H_{86}O_4$; вычислено $M = 703.32$. Найдено, %: С 78.57; Н 12.33. Вычислено, %: С 78.55; Н 12.35.

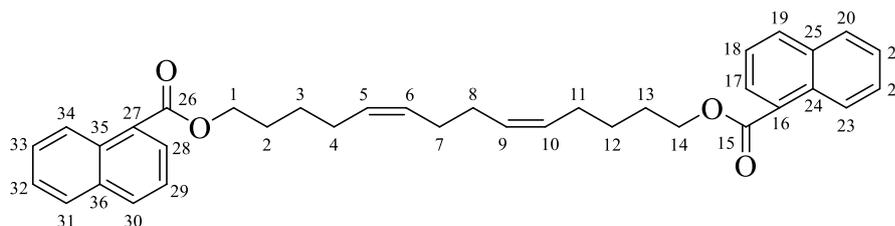
(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диил дибензоат (17д)



Выход 87%. $R_f = 0.37$ (гексан- $EtOAc$ – 10:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 730, 1032, 1240, 1365, 1386, 1471, 1655, 1740, 2850, 2927, 3015. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 1.49-1.57 (м, 4H, \underline{CH}_2), 1.77-1.84 (м, 4H, \underline{CH}_2), 2.08-2.16 (м, 8H, $\underline{CH}_2CH=$), 4.34 (т, 4H, \underline{CH}_2-O , $J = 6.8$ Гц), 5.37-5.45 (м, 4H, $\underline{CH}=\underline{CH}$), 7.45 (т, 4H, Ph, $J = 7.6$ Гц), 7.57 (т, 2H, Ph, $J = 7.2$ Гц), 8.06 (д, 4H, Ph, $J = 7.6$ Гц).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 24.8 C(4,11), 26.8 C(7,8), 27.4 C(3,12), 28.3 C(2,13), 64.9 C(1,14), 128.3 C(18,20,25,27), 129.5 C(17,21,24,28), 129.6 C(5,10), 129.8 C(6,9), 130.5 C(16,23), 132.8 C(19,26), 166.6 C(15,22). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 434.58; $C_{28}H_{34}O_4$; вычислено $M = 434.54$. Найдено, %: С 77.39; Н 7.89. Вычислено, %: С 77.39; Н 7.88.

(5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-диил ди(1,14-нафтоат) (17е)

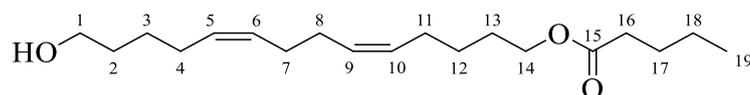


Выход 81%. $R_f = 0.32$ (10:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 730, 1036, 1235, 1362, 1380, 1470, 1658, 1730, 2848, 2930, 3015. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 1.55-1.61 (м, 8H, \underline{CH}_2), 2.09-2.18 (м, 8H, $\underline{CH}_2CH=$), 4.43 (т, 4H, \underline{CH}_2 , $J = 6.8$ Гц), 5.41-5.48 (м, 4H, $\underline{CH}=\underline{CH}$), 7.63 (т, 2H, Ph, $J = 7.6$ Гц), 8.03 (т, 2H, Ph, $J = 6.4$ Гц), 8.03 (т, 2H, Ph, $J = 8.4$ Гц), 8.19 (д, 2H, Ph, $J = 6.4$ Гц), 8.94 (д, 6H, $J = 8.8$ Гц, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 26.2 C(12,3), 26.7 C(11,4), 27.4 C(7,8), 28.4 C(13,2), 65.1 C(1,14), 124.5 C(18,29), 125.8 C(22,33), 126.2 C(21,32), 127.5 C(16,27),

127.7 C(23,34), 128.6 C(6,9,20,31), 129.8 C(5,10), 130.1 C(17,28), 131.4 C(24,35), 133.2 C(19,30), 133.9 C(25,36), 167.6 C(15,26). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 534.70; $C_{36}H_{38}O_4$; вычислено $M = 534.66$. Найдено, %: C 80.87; H 7.16. Вычислено, %: C 80.87; H 7.53.

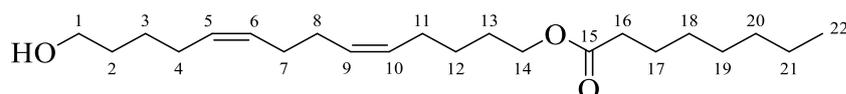
(5Z,9Z)-14-гидрокситетрадека-5,9-диен-1-ил пентаноат (18a)



Выход 81%. $R_f = 0.31$ (гексан-EtOAc – 10:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 732, 1090, 1251, 1345, 1460, 1742, 2078, 3025, 3460. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 0.92 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.27-1.45 (м, 2H, CH_2), 1.56-1.68 (м, 10H, 5 CH_2), 2.02-2.08 (м, 8H, 4 $CH_2CH=$), 2.31 (т, 2H, $CH_2-CO-O-$, $J = 7.6$ Гц), 3.65 (т, 2H, CH_2-OH , $J = 6.4$ Гц), 4.07 (т, 2H, $CH_2-O-CO-$, $J = 6.8$ Гц), 5.34-5.43 (м, 4H, 4 $CH=$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 13.7 C(19), 22.2 C(18), 25.8 C(3), 25.9 C(12), 26.8 C(7,8), 26.9 C(17), 27.1 C(4), 27.3 C(11), 28.2 C(13), 32.4 C(2), 34.1 C(16), 62.8 C(1), 64.2 C(14), 129.5 C(9), 129.6 C(6), 129.7 C(5), 129.9 C(10), 174.1 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 310.48; $C_{19}H_{34}O_3$; вычислено $M = 310.53$. Найдено, %: C 73.50; H 11.04. Вычислено, %: C 73.48; H 11.58.

(5Z,9Z)-14-гидрокситетрадека-5,9-диен-1-ил октаноат (18b)

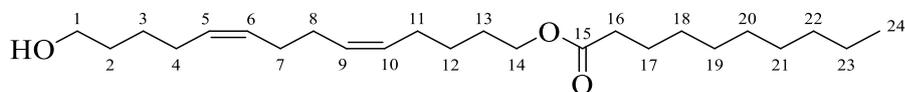


Выход 87%. $R_f = 0.32$ (гексан-EtOAc – 10:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 730, 1095, 1240, 1353, 1465, 1740, 2086, 3022, 3455. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 0.88 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.27-1.67 (м, 18H, CH_2), 2.02-2.09 (м, 8H, $CH_2CH=$), 2.29 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 3.63 (т, 2H, CH_2-OH , $J = 6.4$ Гц), 4.06 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.8$ Гц), 5.33-5.41 (м, 4H, $CH=CH$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.0 C(22), 22.6 C(21), 24.9 C(17), 25.8 C(3), 25.9 C(12), 26.7 C(11), 26.9 C(4), 27.3 C(7,8), 28.2 C(13), 28.9 C(19), 29.1 C(18), 31.7 C(20), 32.3 C(2), 34.4 C(16), 62.8 C(1), 64.2 C(14), 129.5 C(9), 129.6 C(6), 129.7 C(5), 129.9 C(10), 174.1 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 352.56;

$C_{22}H_{40}O_3$; вычислено $M = 352.52$. Найдено, %: С 74.95; Н 11.44. Вычислено, %: С 74.96; Н 11.43.

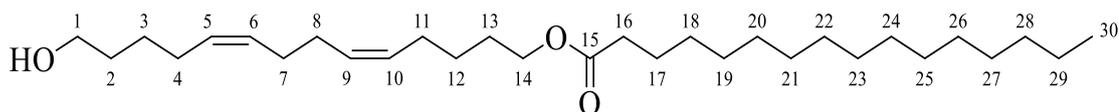
(5Z,9Z)-14-гидрокситетрадека-5,9-диен-1-ил деканоат (18в)



Выход 89%. $R_f = 0.31$ (гексан-EtOAc – 10:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 732, 1095, 1240, 1350, 1460, 1740, 2082, 3020, 3465. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 5.34-5.42 (м, 4H, 4CH=), 4.07 (т, 2H, CH₂-O-CO-, $J = 6.8$ Гц), 3.651 (т, 2H, CH₂-OH, $J = 6.4$ Гц), 2.29 (т, 2H, CH₂-CO-O-, $J = 7.6$ Гц), 2.00-2.09 (м, 8H, 4CH₂CH=), 0.89 (т, 3H, CH₃, $J = 7.2$ Гц), 1.27-1.30 (м, 12H, 6CH₂), 1.54-1.68 (м, 10H, 5CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(24), 22.6 C(23), 25.0 C(17), 25.8 C(3), 25.9 C(12), 26.8 C(7,8), 26.9 C(4), 27.4 C(11), 28.2 C(18), 29.1 C(19), 29.2 C(13,21), 29.4 C(20), 31.8 C(2), 34.4 C(22), 32.4 C(22), 62.8 C(1), 64.2 C(14), 129.5C(9), 129.6 C(6), 129.7 C(5), 129.9 C(10), 174.1 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 380.62; $C_{24}H_{44}O_3$; вычислено $M = 380.68$. Найдено, %: С 75.74; Н 11.65. Вычислено, %: С 75.72; Н 11.67.

(5Z,9Z)-14-гидрокситетрадека-5,9-диен-1-ил миристетат (18г)

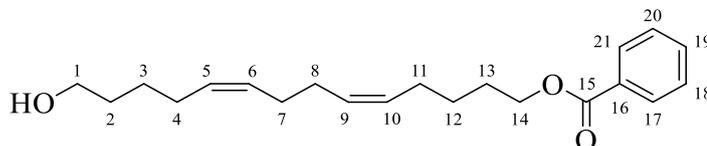


Выход 84%. $R_f = 0.29$ (гексан-EtOAc – 10:1). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 732, 1091, 1235, 1360, 1456, 1740, 2080, 3020, 3455. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 3H, CH₃, $J = 6.8$ Гц), 1.27-1.30 (м, 24H, 12CH₂), 1.56-1.67 (м, 10H, CH₂), 1.962-1.06 (м, 8H, 4CH₂CH=), 2.31 (т, 2H, CH₂-CO-O-, $J = 7.6$ Гц), 3.67 (т, 2H, CH₂-OH, $J = 6.8$ Гц), 4.08 (т, 2H, CH₂-O-CO-, $J = 6.8$ Гц), 5.35-5.44 (м, 4H, 4CH=).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(30), 22.7 C(29), 25.0 C(17), 25.8 C(3), 26.8 C(12), 26.9 C(7,8), 27.3 C(4,11), 28.2 C(18), 29.1 C(19), 29.2 C(13,27), 29.4 C(20-26), 30.8 C(2), 32.4 C(28), 34.4 C(16), 62.9 C(1), 64.2 C(14), 129.5 C(9), 129.6 C(6), 129.7 C(5), 129.9 C(10), 174.1 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z

464.78; $C_{30}H_{56}O_3$; вычислено $M = 464.86$. Найдено, %: C 77.53; H 12.14. Вычислено, %: C 77.51; H 12.17.

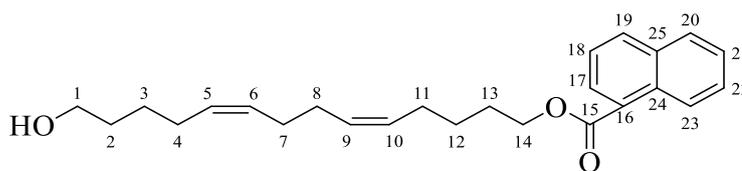
(5Z,9Z)-14-гидрокситетрадека-5,9-диен-1-ил бензоат (18д)



Выход 84%. $R_f = 0.32$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 747, 1025, 1072, 1125, 1210, 1262, 1350, 1455, 1664, 1758, 2870, 2938, 3390. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.39-1.46 (м, 4H, CH_2), 1.49-1.62 (м, 4H, CH_2), 2.06-2.12 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 3.64 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$, $J = 6.4$ Гц), 4.33 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$, $J = 6.8$ Гц), 5.34-5.44 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.44 (т, 2H, Ph, $J = 7.6$ Гц), 7.56 (т, 1H, Ph, $J = 7.2$ Гц), 8.06 (д, 2H, Ph, $J = 7.6$ Гц).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 25.8 C(3), 26.1 C(12), 26.8 C(11), 26.9 C(4), 27.3 C(7), 27.4 C(8), 28.3 C(13), 32.4 C(2), 62.8 C(1), 64.9 C(14), 128.3 C(18,20), 129.5 C(9,17,21), 129.6 C(6), 129.9 C(5), 129.8 (10), 130.4 C(16), 132.9 C(19), 167.7 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 330.47; $C_{21}H_{30}O_3$; вычислено $M = 330.41$. Найдено, %: C 76.33; H 9.15. Вычислено, %: C 76.34; H 9.14.

(5Z,9Z)-14-гидрокситетрадека-5,9-диен-1-ил 1-нафтоат (18е)



Выход 81%. $R_f = 0.26$ (гексан-EtOAc – 5:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 726, 1030, 1230, 1372, 1378, 1470, 1650, 1730, 2850, 2932, 3015. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.29-1.91 (м, 8H, 4 CH_2), 2.05-2.17 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 3.63 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$, $J = 6.8$ Гц), 4.45 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-CO-}$, $J = 6.4$ Гц), 5.35-5.47 (м, 4H, 4 $\text{CH}=\text{C}$), 7.49-8.95 (м, 7H, Napht).

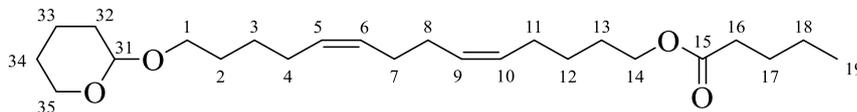
Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 25.8 C(3), 26.2 C(11), 26.8 C(4), 26.9 C(12), 27.3 C(8), 27.4 C(7), 28.4 C(13), 32.5 C(2), 62.8 C(1), 65.1 C(14), 124.5 C(18), 125.8 C(21), 126.2 C(22), 127.4 C(23), 127.7 C(20), 128.5 C(6,9), 129.6 C(16), 129.9

C(5,17), 130.1 C(10), 131.4 C(24), 133.3 C(19), 133.9 C(25), 167.8 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 380.53; C₂₅H₃₂O₃; вычислено M = 380.57. Найдено, %: C 78.91; H 8.48. Вычислено, %: C 78.89; H 8.49.

Общая методика синтеза тетрагидропирановых эфиров **5Z,9Z**-диеновых кислот

К раствору спирта (0.5 моль) и 3,4-дигидропирана (0.42 моль) при 0 °С прикапывали 0.5 мл концентрированной HCl. Реактор нагревали до комнатной температуры (20-22 °С) при перемешивании реакционной смеси и поддерживали указанную температуру в течение 18 часов. Затем добавили 0.9 г. твердого KOH и перемешивали при комнатной температуре (20-22 °С) в течение 15 минут. Далее реакционную массу отфильтровали. Продукт реакции получали путем перегонки фильтрата под вакуумом в комбайне с дефлегматором [242].

(**5Z,9Z**)-14-(тетрагидро-2H-пиран-2-илокси)тетрадека-5,9-диен-1-ил пентаноат (**19a**)

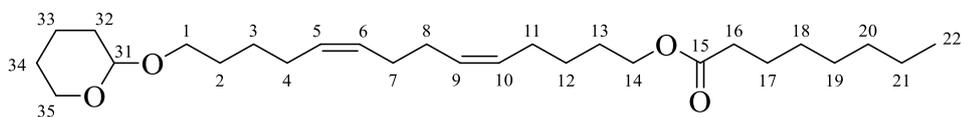


Выход 78%. R_f = 0.38 (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр, ν /см⁻¹: 670, 735, 1070, 1124, 1184, 1206, 1350, 1384, 1440, 1738, 2923, 3010. Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 0.91 (т, 3H, J = 7.2 Гц), 1.26-1.86 (м, 18H, CH₂), 2.01-2.08 (м, 8H, CH₂CH=), 2.29 (т, 2H, CH₂-C=O, J = 7.6 Гц), 3.35-3.89 (м, 4H, CH₂-O), 4.06 (т, 2H, CH₂-O, J = 6.4 Гц), 4.57 (т, 1H, O-CH-O, J = 3.2 Гц), 5.32-5.41 (м, 4H, CH=CH).

Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 13.7 C(19), 19.6 C(22), 22.2 C(18), 25.5 C(23), 25.9 C(3,12), 26.3 C(4,11), 26.8 C(13), 27.1 C(2), 27.3 C(7,8), 29.4 C(17), 30.8 C(21), 34.1 C(16), 62.2 C(14), 64.1 (1), 67.4 C(14), 98.8 C(20), 129.3 C(9), 129.5 C(6), 129.7 C(5), 130.0 C(10), 173.9 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 394.60;

$C_{24}H_{42}O_4$; вычислено $M = 394.55$. Найдено, %: С 73.05; Н 10.73. Вычислено, %: С 73.06; Н 10.72.

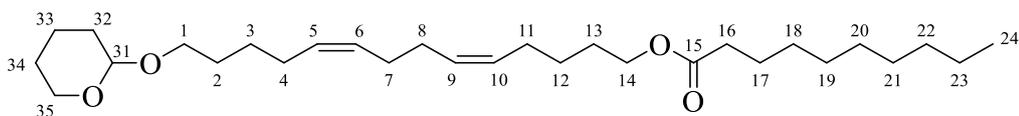
**Октил-(5Z,9Z)-14-(тетрагидро-2H-пиран-2-илокси)тетрадека-5,9-диеноат
(19б)**



Выход 76%. $R_f = 0.39$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 672, 765, 1030, 1068, 1128, 1160, 1202, 1354, 1381, 1441, 1662, 1740, 2853, 2925. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.87 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.22-1.86 (м, 24H, CH_2), 2.03-2.07 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.28 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 3.35-3.88 (м, 4H, CH_2), 4.05 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.8$ Гц), 4.57 (т, 1H, $\text{O}-\text{CH}-\text{O}$, $J = 3.6$ Гц), 5.31-5.40 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.0 C(22), 22.6 C(21), 25.5 C(17), 25.9 C(3), 26.3 C(4,11), 26.8 C(13), 27.0 C(2), 27.3 C(7,8), 28.9 C(19), 29.1 C(18), 31.6 C(20), 34.3 C(16), 64.15 C(1), 67.41 C(14), 129.3 C(9), 129.5 C(6), 129.7 C(5), 130.0 C(10), 173.9 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 436.68; $C_{27}H_{48}O_4$; вычислено $M = 436.63$. Найдено, %: С 74.26; Н 11.08. Вычислено, %: С 74.27; Н 11.07.

**(5Z,9Z)-14-(тетрагидро-2H-пиран-2-илокси)тетрадека-5,9-диен-1-ил
деcanoат (19в)**

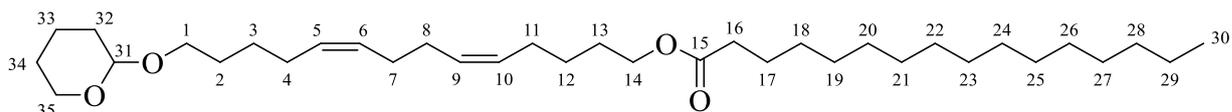


Выход 78%. $R_f = 0.40$ (гексан-EtOAc – 20:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 670, 730, 1078, 1121, 1182, 1204, 1350, 1380, 1446, 1738, 2855, 2920, 3010. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.88 (т, 3H, $J = 7.2$ Гц), 1.27-1.29 (м, 12H, CH_2), 1.38-1.86 (м, 16H, CH_2), 2.04-2.09 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.29 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 3.36-3.90 (м, 4H, CH_2-O), 4.07 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.4$ Гц), 4.58 (т, 1H, $\text{O}-\text{CH}-\text{O}$, $J = 4$ Гц), 5.33-5.42 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(24), 19.6 C(27), 22.6 C(23), 25.0 C(17), 25.5 C(28), 26.0 C(3, 12), 26.4 C(4, 11), 26.8 C(2), 27.0 C(13), 27.4 C(7,8), 29.1 C(19),

29.2 C(21), 29.4 C(20,18), 30.7 C(26), 31.8 C(22), 34.4 C(16), 62.2 C(29), 64.2 C(14), 67.4 C(1), 98.8 C(25), 129.3 C(9), 129.5 C(6), 129.7 C(5), 130.0 C(10), 173.9 C(15).
 Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 464.74; $C_{29}H_{52}O_4$; вычислено $M = 464.67$.
 Найдено, %: C 74.95; H 11.28. Вычислено, %: C 74.96; H 11.27.

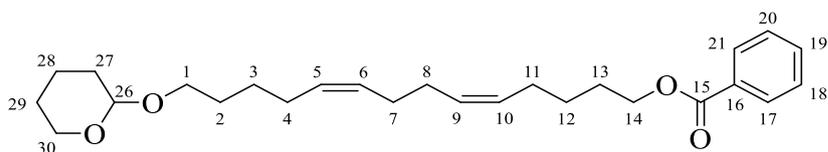
**(5Z,9Z)-14-(тетрагидро-2H-пиран-2-илокси)тетрадека-5,9-диен-1-ил
 палмитат (19Г)**



Выход 78%. $R_f = 0.44$ (гексан- $EtOAc - 20:1$). ИК-спектр ν/cm^{-1} : 672, 733, 1072, 1120, 1185, 1210, 1348, 1380, 1438, 1740, 2930, 3015. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 0.86 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.48-1.84 (м, 14H, CH_2), 1.24-1.26 (м, 28H, CH_2), 2.02-2.06 (м, 8H, $CH_2CH=$), 3.68-3.86 (м, 4H, CH_2), 4.04 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.4$ Гц), 4.55 (т, 1H, $O-CH-O$, $J = 3.2$ Гц), 5.30-5.38 (м, 4H, $CH=CH$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(30), 19.6 C(33), 22.6 C(29), 24.9 C(17), 25.5 C(31), 25.9 C(3,12), 27.0 C(2), 27.3 C(7,8), 28.2 C(4,11,13), 29.1 C(18), 29.2 C(19), 29.3 C(20), 29.57 C (21-23,25), 29.62 C(26), 29.65 C(24), 29.7 C(27), 30.7 C(32), 31.9 C(28), 34.3 C(16), 62.1 C(35), 64.1 C(14), 67.4 C(1), 98.7 C(31), 129.3 C(9), 129.5 C(6), 129.7 C(5), 129.9 C(10), 173.8 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 548.90; $C_{35}H_{64}O_4$; вычислено $M = 548.83$. Найдено, %: C 76.59; H 11.75. Вычислено, %: C 76.60; H 11.74.

**(5Z,9Z)-14-(тетрагидро-2H-пиран-2-илокси)тетрадека-5,9-диен-1-ил
 бензоат (19Д)**

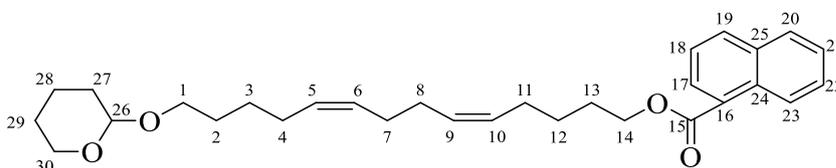


Выход 70%. $R_f = 0.44$ (гексан- $EtOAc - 20:1$). ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 768, 1020, 1066, 1132, 1164, 1210, 1355, 1380, 1440, 1612, 1740, 2925, 3050. Спектр ЯМР 1H ,

δ , м.д.: 1.42-1.85(м, 15H, CH_2), 2.08-2.11 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH=}$), 3.39-3.75 (м, 4H, CH_2), 4.34 (т, 2H, CH_2 , $J=6.8$ Гц), 5.39-5.41 (м, 4H, CH=CH), 7.43-8.69 (м, 5H, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 19.9 C(24), 25.4 C(25), 26.4 C(12), 26.11 C(3), 26.8 C(4,11), 27.0 C(2), 27.4 C(7,8), 28.4 C(13), 30.8 C(23), 62.3 C(26), 64.9 C(1), 65.9 C(14), 98.8 C(22), 128.3 C(18,20), 129.3C(9), 129.5 C(17,21), 129.8 C(6), 130.0 C(16), 130.2 C(5), 130.5 C(10), 132.8 C(19), 166.6 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 414.59; $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_4$; вычислено $M = 414.46$. Найдено, %: C 75.32; H 9.24. Вычислено, %: C 75.33; H 9.23.

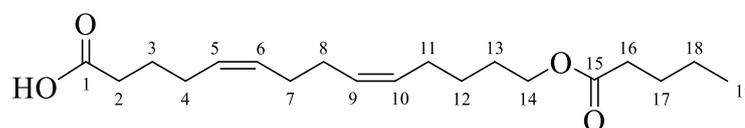
(5Z,9Z)-14-(тетрагидро-2H-пиран-2-илокси)тетрадека-5,9-диен-1-ил-17-нафтоат (19e)



Выход 72%. $R_f = 0.38$ (гексан- $\text{EtOAc} = 10:1$). ИК-спектр $\nu/\text{см}^{-1}$: 670, 735, 1065, 1124, 1180, 1215, 1350, 1382, 1438, 1746, 2935, 3010. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.45-1.90 (м, 14H, CH_2), 2.06-2.19 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH=}$), 3.39-3.80 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.60 (т, 1H, O-CH-O , $J = 2.8$ Гц), 4.43 (т, 2H, CH_2 , $J = 5.2$ Гц), 5.41-5.49 (м, 4H, CH=CH), 7.47-9.00 (м, 7H, NPh),

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 19.7 C(28), 25.6 C(29), 26.9 C(11), 26.3 C(3), 27.1 C(7,8), 27.4 C(4,12), 28.4 C(13), 29.4 C(27), 30.8 C(2), 62.3 C(30), 65.0 C(14), 67.5 C(1), 98.8 C(26), 124.5 C(18), 125.9 C(21), 126.1 C(22), 127.7 C(23), 128.5 C(20), 129.6 C(5,10), 129.9 C(6,9), 130.1 C(17), 129.4 C(16), 131.4 C(24), 133.3 C(19), 133.9 C(25), 167.6 C(15). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 464.65; $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_4$; вычислено $M = 464.62$. Найдено, %: C 77.55; H 8.68. Вычислено, %: C 77.55; H 8.67.

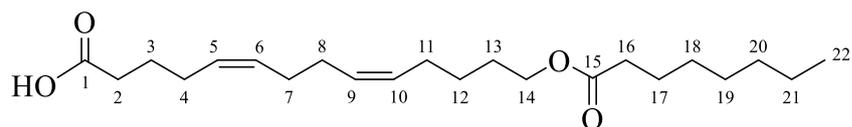
(5Z,9Z)-14-(пентаноилокси)тетрадека-5,9-диеновая кислота (19a)



Выход 61%. $R_f = 0.48$ (гексан- EtOAc – 10:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 740, 1130, 1245, 1357, 1460, 1655, 1742, 1778, 2840, 2920, 3038, 3380. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0,93 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.6$ Гц), 1.27-1.76 (м, 10H, CH_2), 2.38 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J = 7.6$ Гц), 2.32 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 2.06-2.15 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH=}$), 4.09 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.4$ Гц), 5.32-5.44 (м, 4H, CH=CH).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 13.7 C(19), 22.3 C(18), 24.6 C(3), 25.9 C(12), 26.5 C(4), 26.8 C(11), 27.1 C(17), 27.3 C(7,8), 28.2 C(13), 33.3 C(2), 34,1 C(16), 64.3 C(14), 128.7 C(9), 129.6 C(5), 129.7 C(10), 130.5 C(6), 174.1 C(15), 179.3 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 324.46; $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_4$; вычислено $M = 324.42$. Найдено, %: C 70.33; H 9.94. Вычислено, %: C 70.34; H 9.93.

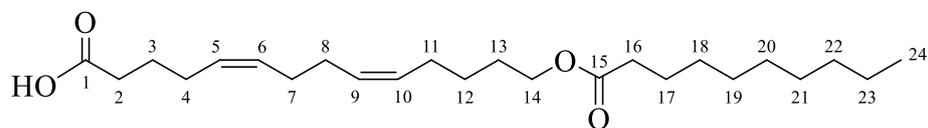
(5Z,9Z)-14-(октаноилокси)тетрадека-5,9-диеновая кислота (20б)



Выход 64%. $R_f = 0.48$ (гексан- EtOAc – 10:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 730, 1105, 1164, 1244, 1365, 1458, 1675, 1745, 2915, 3550. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.89 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.31-1.45 (м, 8H, CH_2), 1.63-1.65 (м, 6H, CH_2), 1.70-1.75 (м, 2H, CH_2), 2.10-2.13 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH=}$), 2.31 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Гц), 2.37 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J = 7.6$ Гц), 4.09 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.4$ Гц), 5.39-5.42 (м, 4H, CH=CH).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(22), 22.6 C(21), 24.6 C(4), 25.0 C(17), 25.9 C(12), 26.5 C(3), 26.8 C(11), 27.3 C(7,8), 28.2 C(13), 28.9 C(19), 29.1 C(18), 31.7 C(20), 33.3 C(2), 34.4 C(16), 64.3 C(14), 128.7 C(5), 129.6 C(10), 129.7 C(9), 130.5 C(6), 174.0 C(15), 179.4 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 366.55; $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_4$; вычислено $M = 366.50$. Найдено, %: C 72.09; H 10.45. Вычислено, %: C 72.10; H 9.34.

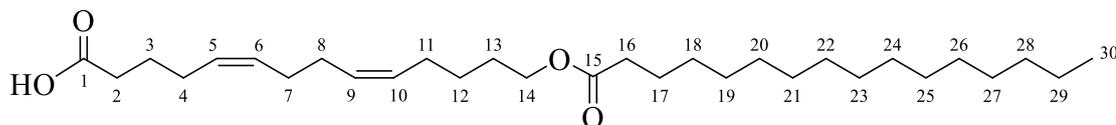
(5Z,9Z)-14-(деcanoилокси)тетрадека-5,9-диеновая кислота (20в)



Выход %57. $R_f = 0.49$ (гексан-ЕтОАс – 10:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 733, 1040, 1238, 1360, 1384, 1478, 1680, 1737, 1750, 2835, 2918, 3015. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Гц), 1.28-1.32 (м, 14H, CH_2), 1.48-1.38 (м, 2H, CH_2), 1.67-1.61 (м, 2H, CH_2), 1.76-1.68 (м, 2H, CH_2), 2.07-2.15 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.30 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 2.38 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J = 7.6$ Гц), 4.08 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.8$ Гц), 5.33-5.45 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

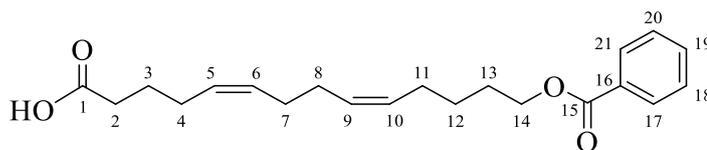
Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(24), 22.7 C(23), 24.6 C(3), 25.0 C(17), 25.9 C(12), 26.5 C(4), 26.8 C(8), 27.3 C(11), 28.2 C(7), 29.2 C(18,19), 29.3 C(13,21), 29.4 C(20), 31.9 C(22), 33.3 C(2), 34.4 C(16), 64.3 C(14), 128.7 C(9), 129.6 C(5), 129.7 C(10), 130.5 C(6), 174.1 C(15), 179.4 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 394.60; $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_4$; вычислено $M = 394.54$. Найдено, %: C 73.05; H 10.73. Вычислено, %: C 73.06; H 10.72.

(5Z,9Z)-14-(палмитоилокси)тетрадека-5,9-диеновая кислота (20г)



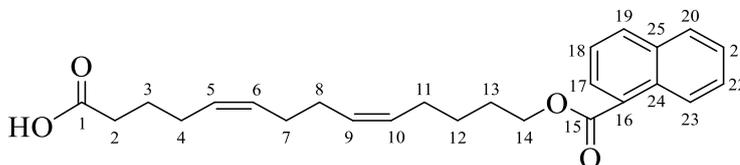
Выход 59%. $R_f = 0.51$ (гексан-ЕтОАс – 10:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 739, 1115, 1238, 1355, 1460, 1652, 1750, 1784, 2837, 2918, 3040, 3378. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0.90 (т, 3H, CH_3 , $J = 6.4$ Гц), 1.28-1.45 (м, 26H, CH_2), 1.62-1.67 (м, 6H, CH_2), 1.71-1.76 (м, 2H, CH_2), 2.06-2.15 (м, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 2.31 (т, 2H, CH_2 , $J = 7.6$ Гц), 2.38 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J = 7.6$ Гц), 4.09 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$, $J = 6.4$ Гц), 5.33-5.46 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.1 C(30), 22.7 C(29), 24.6 C(3), 25.0 C(17), 25.9 C(12), 26.5 C(4), 26.8 C(8), 27.3 (C7,11) 29.2 C(18), 29.3 C(19), 29.4 C(13,27), 29.5 C(20), 29.6 C(22-24), 29.7 C(21,25,26), 31.9 C(28), 33.3 C(2), 34.6 C(16), 64.2 C(14), 128.7 C(9), 129.7 C(5), 129.6 C(10), 130.5 C(6), 174.1 C(15), 179.0 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 478.76; $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_4$; вычислено $M = 478.706$. Найдено, %: C 75.26; H 11.37. Вычислено, %: C 75.27; H 11.36.

(5Z,9Z)-14-(бензоилокси)тетрадека-5,9-диеновая кислота (20д)

Выход 54%. $R_f = 0.50$ (гексан-EtOAc – 3:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 732, 1035, 1240, 1367, 1382, 1465, 1658, 1740, 2856, 2927, 3015, 3392. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.57-1.49 (м, 2H, CH_2), 1.84-1.68 (м, 4H, CH_2), 2.06-2.14 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 2.37 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J = 7.2$ Гц), 4.35 (т, 2H, CH_2 , $J = 6.4$ Гц), 5.33-5.49 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.28-8.07 (м, 5H, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 24.6 C(4), 26.1 C(12), 26.5 C(3), 26.8 C(11), 27.3 C(7,8), 28.3 C(13), 33.4 C(2), 64.9 C(14), 128.3 C(18,20), 128.7 C(5), 128.8 C(9), 129.6 C(17,21), 129.7 C(16), 130.5 C(6,10), 132.8 C(19), 166.7 C(15), 179.8 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 344.45; $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$; вычислено $M = 344.42$. Найдено, %: C 73.23; H 8.19. Вычислено, %: C 73.23; H 8.19.

(5Z,9Z)-14-(17-нафтоилокси)тетрадека-5,9-диеновая кислота (20e)

Выход 51%. $R_f = 0.52$ (гексан-EtOAc – 3:1). ИК-спектр, $\nu / \text{см}^{-1}$: 740, 1030, 1244, 1365, 1384, 1468, 1650, 1740, 2852, 2930, 3012, 3380. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.61-1.73 (м, 6H, CH_2), 2.07-2.16 (м, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 2.41 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J = 7.6$ Гц), 4.46 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$, $J = 6.4$ Гц), 5.34-5.53 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.49 (м, 7H, NPh).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 19.8 C(4), 21.4 C(3,11,12), 28.2 C(7,8), 30.8 C(13), 33.5 C(2), 64.5 C(14), 124.5 C(18), 125.8 C(21), 126.2 C(22), 127.2 C(23), 127.8 C(20), 128.6 C(5,9,16), 130.1 C(17), 130.15 C(10), 130.2 C(6), 131.4 C(24), 133.4 C(19), 133.9 C(25), 167.6 C(15), 179.3 C(1). Масс-спектр MALDI TOF: найдено m/z 394.52; $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$; вычислено $M = 394.48$. Найдено, %: C 76.11; H 7.66. Вычислено, %: C 76.11; H 7.66.

Методика изучения цитотоксичности

Культивирование клеток

Клетки (Jurkat, K562, U937, HL-60, фибробласты) были приобретены в Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) и культивированы стерильными методами в соответствии со стандартными протоколами. Все клеточные линии, использованные в исследовании, не содержали микоплазмы и вирусные загрязнения. Суспензионные культуры клеток Jurkat, K562, HL-60, U937 культивировались в среде RPMI 1640 (Биолот), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4 мкМ *L*-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина. Все клетки культивировались в инкубаторе при температуре 37 °С и атмосфере 5%-ного CO₂. Для проведения экспериментов суспензионные культуры клеток, достигших логарифмической фазы роста, пассировали в 24-луночные планшеты в объеме 100 тыс. клеток на лунку. После добавления тестируемых веществ клетки инкубировали в течение 24 часов с последующим анализом результатов методом проточной цитометрии.

Оценка жизнеспособности клеток

Оценку жизнеспособности клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентного ДНК красителя 7-AAD (7-аминоактиномицин D) (Biolegend). Данный краситель не проникает в живые клетки с целостной неповрежденной мембраной.

Методика проведения анализа апоптоза

После обработки клеточной линии в течение 48 часов проводили сбор и промывку (1-2 порции) фосфатно-солевым буфером (PBS) и, затем, центрифугировали при 400 g в течение 5 минут. Осадки клеток ресуспендировали в 200 мкл в PBS. Далее, 200 мкл реагента Guava Nexin (Millipore, Bedford, MA, USA) добавили к 5×10^5 клеткам в 200 мкл, и клетки инкубировали с реагентом в течение 20 мин при комнатной температуре в

темноте. По окончании инкубации клетки анализировали на системе NovoCyte™2000 FlowCytometry System (ACEA).

Методика изучения клеточного цикла

Клеточный цикл анализировали методом окрашивания йодидом пропидия. После обработки клеточной линии в течение 48 часов проводили сбор и промывку (1-2 порции) фосфатно-солевым буфером (PBS) и, затем, центрифугировали при 400 g в течение 5 минут. Осадки клеток ресуспендировали в 200 мкл в PBS. Затем, клетки высевали в 24-луночные круглодонные планшеты с плотностью 10×10^5 клеток на лунку, и центрифугировали при 450 g в течение 5 минут и выдерживали в охлажденном этаноле (70%) в течение 24 часов при 0 °C. После, клетки промывали PBS и инкубировали с 250 мкл реагента Guava Cell Cycle Reagent (Millipore) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Образцы анализировали на системе NovoCyte™ 2000FlowCytometry System (ACEA).

Статистика

Сравнения между группами проводились с использованием одностороннего ANOVA для групп с одной независимой переменной и с использованием двух-факторного ANOVA для групп с двумя независимыми переменными. Если среднее значение пробы отклонялось от медианы более чем на 3 стандартных отклонения, то она исключалась из набора данных. Для оценки данных по белкам сигнальных путей использовали отдельные тесты дисперсионного анализа. Статистическая значимость устанавливалась при $P < 0,05$. Для выявления значимых эффектов использовали отдельный t-тест с поправкой Бонферони.2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертационной работы выполнена программа ориентированных фундаментальных исследований, посвященных разработке эффективного, универсального и перспективного метода синтеза природных и синтетических стереоизомерно чистых 5Z,9Z-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.

Одновременно нами впервые разработаны оригинальные альтернативные способы стереоселективного синтеза 5Z,9Z-диеновых кислот.

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

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

На основании результатов, полученных в рамках выполнения диссертационной работы, 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.

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 α). 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 α) *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 ($IC_{50}=0.27\pm 0.015$ мкМ).

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-дикарбоновой 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, J.C. DNA Topoisomerases / J.C. Wang // *Annu. Rev. Biochem.* – 1996. – V. 65. – P. 635-692.
2. Bergerat, A. An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination / A. Bergerat, B. de Massy, D. Gadelle, P.C. Varoutas, A. Nicolas, P. Forterre // *Nature.* – 1997. – V. 386. – P. 414-417.
3. Wang, J.C. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein ω / J.C. Wang // *J Mol. Biol.* – 1971. – V. 55. – P. 523-533.
4. Stewart, L. A model for the mechanism of human topoisomerase I / L. Stewart, M.R. Redinbo, X. Qiu, W.G. Hol // *Science.* – 1998. – V. 279. – P. 1534-1541.
5. Levine, C. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities // C. Levine, H. Hiasa, K.J. Mariani, *Biochim. Biophys. Acta* – 1998. – V. 1400 P. 29–43.
6. Li, F. Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top I) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer? / F. Li, T. Jiang, Q. Li, X. Ling // *Am. J. Canc. Res.* – 2017. – V. 7. – P. 2350-2394.
7. Hsiang, Y.H. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I / Y.H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L.F. Liu // *Chem.* – 1985. – V. 260. – P. 14873-14878.
8. Denny, W.A. Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs / W.A. Denny // *Expert Opin. Emerg. Drugs.* – 2004. – V. 9. – P. 105-133.
9. D'Annessa, I. Simulations of DNA topoisomerase 1B bound to supercoiled DNA reveal changes in the flexibility pattern of the enzyme and a secondary protein–DNA binding site / I. D'Annessa, A. Coletta, T. Sutthibutpong, J. Mitchell, G. Chillemi, S. Harris, A. Desideri // *Nucleic Acids Res.* – 2014 – V. 42 – P. 9304–9312.
10. Pommier, Y. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme / Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, D. Strumberg // *Biochim. Biophys. Acta* – 1998. – V. 1400. – P. 83-105.

11. Li, T.-K. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs / T.-K. Li, L.F. Liu // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2001. – V. 40 – P. 53-77.

12. Holm, C. Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells / C. Holm, J.M. Covey, D. Kerrigan, Y. Pommier // *Cancer Res.* – 1989. – V. 15. – P. 6365-6368.

13. Liu, L.F. Mechanism of action of camptothecin / L.F. Liu, S.D. Desai, T.K. Li, Y. Mao, M. Sun, S.P. Sim // *Acad. Sci.* – 2000. – V. 922. – P. 1-10.

14. Pommier, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition / Y. Pommier // *Chem. Rev.* – 2009. – V. 109. – P. 2894-2902.

15. Leo, E. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs / E.-Leo, H. Zhang // *Chem. Biol.* – 2010. – V. 17. – P. 421-433.

16. Pommier, Y. Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes / Y. Pommier, C. Marchand // *Nature Rev.* – 2012. – V. 11. – P. 25-36.

17. Khaiwa, N. Camptothecin's journey from discovery to WHO Essential Medicine: Fifty years of promise / N. Khaiwa, N.R. Maarouf, M.H. Darwish, D.W.M Alhamad, A. Sebastian, M. Hamad, H.A. Omar, G. Orive, T.H. Al-Tel // *Eur. J. of Med. Chem.* – 2021. – V. 223. – P. 113639.

18. Burke, T.G. The structural basis of camptothecin interactions with human serum albumin: impact on drug stability / T.G. Burke, Z.M. Mi. // *J. Med. Chem.* – 1994. – V. 37. – P. 40-46.

19. A.Y. Chen, S.J. Shih, L.N. Garriques, M.L. Rothenberg, M. Hsiao, D.P. Curran. Silatecan DB-67 is a novel DNA topoisomerase I-targeted radiation sensitizer // *Mol. Cancer Ther.* – 2005. – V. 4. – P. 317-324.

20. Lavergne, O. BN 80927: A novel homocamptothecin with inhibitory activities on both topoisomerase I and topoisomerase II / O. Lavergne L. Lesueur-Ginot, F. Pla Rodas, P.G. Kasprzyk, Y. Pommier, D. Demarquay, G. Prevost, G. Ulibarri, A. Rolland, A.M. Schiano-Liberatore, J. Harnett, D. Pons, J. Camara, D.C.H. Bigg // *J. Med. Chem.* – 1998. – V. 41. – P. 5410–5419.

21. Tangirala, R.S. Synthesis and biological assays of E-ring analogs of camptothecin and homocamptothecin / R.S. Tangirala, S. Antony, K. Agama,

Y. Pommier, B.D. Anderson, R. Bevins // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – V. 14. – P. 6202-6212.

22. Bates, S.E. ABCG2 mediates differential resistance to SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) and homocamptothecins / S.E. Bates, W.Y. Medina-Perez, G. Kohlhagen, S. Antony, T. Nadjem, R.W. Robey, Y.J. Pommier // *Pharmacol. Exp. Ther.* – 2004. – V. 310. – P. 836-842.

23. Urasaki, Y. Activity of a Novel Camptothecin Analogue, Homocamptothecin, in Camptothecin-resistant Cell Lines with Topoisomerase I Alterations / Y. Urasaki, Y. Takebayashi, Y. Pommier // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60 – P. 6577–6580.

24. Takagi, K. Novel E-ring camptothecin keto analogues (S38809. and S39625) are stable, potent, and selective topoisomerase I inhibitors. without being substrates of drug efflux transporters / K. Takagi, T.S. Dexheimer, C. Redon, O. Sordet, K. Agama, G. Lavielle, A. Pierre, S.E. Bates // *Mol. Cancer Ther.* – 2007. – V. 6. – P. 3229-3238.

25. Hautefaye, P. Synthesis and pharmacological evaluation of novel non-lactone analogues of camptothecin / P. Hautefaye, B. Cimetiere, A. Pierre, S. Leonce, J. Hickman, W. Laine, C. Bailly, G. Lavielle // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – V. 13. – P. 2731-2735.

26. Chang, J.-Y. Novel Mutation of Topoisomerase I in Rendering Cells Resistant to Camptothecin / J.-Y. Chang, J.-F. Liu, S.-H. Juang, T.-W. Liu, L.-T. Chen // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – P. 3716-3721.

27. Pommier, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges/ Y. Pommier // *ACS Chem. Biol.* – 2013. – V. 8. – P. 82-95.

28. Cagir, A. Naturally occurring human DNA topoisomerase I poison / A. Cagir, S.H. Jones, R. Gao, B.M. Eisenhauer, S.M. Hecht. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125. – P. 13628-13629.

29. Cagir, A. Synthesis and topoisomerase I properties of Luotonin A analogues / A. Cagir, B.M. Eisenhauer, R. Gao, S.J. Thomas, S.M. Hecht // *Bioorg. Med. Chem.* – 2004. – V. 12. – P. 6287-6299.

30. Cinelli, M.A. Cushman. Design, synthesis, and biological evaluation of 14-substituted aromathecins as topoisomerase I inhibitors / M.A. Cinelli, A. Morrell,

T.S. Dexheimer, E.S. Scher // *J. Med. Chem.* – 2008. – V. 51. – P. 4609-4619.

31. Xiang, Y. Design, synthesis, and anticancer activities of 8,9-substituted Luotonin A analogs as novel topoisomerase I inhibitors / Y. Xiang, H. Li, J. Wang, X. Peng, C. Hu, L. Luo // *Med. Chem. Res.* – 2021. – V. 30. – P. 1512-1522.

32. Pan, X. Human SNM1A and XPF-ERCC1 collaborate to initiate DNA interstrand cross-link repair / X. Pan, J.M. Hartley, J.A. Hartley, K.N. White, Z. Wang, S.W. Bligh // *Phytomedicine.* – 2012. – V. 19. – P. 618-624.

33. Dong, G. New Tricks for an Old Natural Product: Discovery of Highly Potent Evodiamine Derivatives as Novel Antitumor Agents by Systemic Structure-Activity Relationship Analysis and Biological Evaluations / G. Dong, S. Wang, Z. Miao, J. Yao, Y. Zhang, Z. Guo, W. Zhang, C. Sheng // *J. Med. Chem.* – 2012. – V. 55. – P. 7593-7613.

34. Luo, C. Research progress on evodiamine, a bioactive alkaloid of *Evodiae fructus*: Focus on its anti-cancer activity and bioavailability (Review) / C. Luo, J. Ai, E. Ren, J. Li, C. Feng, X. Li, X. Luo, J. Ai, E. Ren, J. Li, C. Feng, X. Li, X. Luo // *Experimental and Therapeutic Medicine.* – 2021. – V. 22. – P. 1327.

35. He, S. Discovery of novel multiacting topoisomerase *i/ii* and histone deacetylase inhibitors / S. He, G. Dong, Z. Wang, W. Chen, Y. Huang, Z. Li, Y. Jiang, N. Liu, J. Yao, Z. Miao // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2015. – V. 6. – P. 239-243.

36. Cesari, I. Isolation and characterization of the alkaloid Nitidine responsible for the traditional use of *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Excell stem bark against bacterial infections / I. Cesari, P. Grisoli, M. Paolillo, C. Milanese, G. Massolini, G. Brusotti // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2015. – V. 105 – P. 115-120.

37. Tang, W. Recent Development of Antitumor Agents from Chinese Herbal Medicines / W. Tang, I. Hemni, B. Bertram // *Planta Med.* – 2003. – V. 69. – P. 97-108.

38. Fleury, F. Molecular determinants of site-specific inhibition of human DNA topoisomerase I by fagaronine and ethoxidine. Relation to DNA binding / F. Fleury, A. Sukhanova, A. Ianoul, J. Devy, I. Kudelina, O. Duval, A.J.P. Alix, J.C. Jardillier, I. Nabiev // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275 – P. 3501-3509.

39. Wang, L.K. Inhibition of topoisomerase I function by nitidine and fagaronine / L.K. Wang, R.K. Johnson // *Chem. Res. Toxicol.* – 1993 – V. 6. – P. 813-818.

- 40.** Janin, Y.L. Inhibition of topoisomerase I function by nitidine and fagaronine / Y.L. Janin, A. Croisy, J.F. Riou // *J. Med. Chem.* – 1993. – V. 36 – P. 3686-3692.
- 41.** Larsen, A.K. The antileukemic alkaloid fagaronine is an inhibitor of DNA topoisomerase I and II / A.K. Larsen, L. Grondard, J. Couprie, B. Desoize, L. Comoe, J.C. Jardillier, J.F. Riou // *Biochem. Pharmacol.* – 1993. – V. 46. – P. 1403-1412.
- 42.** Gatto, B. Identification of Topoisomerase I as the Cytotoxic Target of the Protoberberine Alkaloid Coralyne / B. Gatto, M.M. Sanders, C. Yu, H.-Y. Wu, D. Makhey, E.J. LaVoie, L.F. Liu // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56. – P. 2795-2800.
- 43.** Bajaj, N.P.S. Sequence-selective, pH-dependent binding to DNA of benzophenanthridine alkaloids / N.P.S. Bajaj, M.J. McLean, M.J. Waring, E. Smekal // *J. Mol. Recognit.* – 1990. – V. 3. – P. 48-54.
- 44.** Herbert J.M. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C / J.M. Herbert, J.M. Augereau, J. Gleye, J.P. Maffrand // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1990. – V. 172. – P. 993-999.
- 45.** Fadeeva, M. Tsitologia /M.D. Fadeeva, T.N. Beliaeva // *Tsitologia* – 1997. – V. 39. – P. 181-208.
- 46.** Rauf, A. Berberine as a potential anticancer agent: a comprehensive review / A. Rauf, T. Abu-Izneid, A.A. Khalil, M. Imran, Z.A. Shah, T.B. Emran, S. Mitra, Z. Khan, F.A. Alhumaydhi, A.S.M. Aljohani, I. Khan, M.M. Rahman, P. Jeandet, T.A. Gondal // *Molecules.* – 2021. – V. 26. – P. 7368.
- 47.** Xie, Q. Efficacy of berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic irrigant against a mixed-culture biofilm in an in vitro tooth model / Q. Xie, B.R. Johnson, C.S. Wenckus, M.I. Fayad // *J. Endod.* – 2012. – V. 38 – P. 1114-1117.
- 48.** Lau, C.W. Cardiovascular actions of berberine / C.W. Lau, X.Q. Yao, Z.Y. Chen, W.H. Ko, Y. Huang // *Cardiovasc. Drug Rev.* – 2001. – V. 19 – P. 234-244.
- 49.** Vieira, S. Role of 13-(di) phenylalkyl berberine derivatives in the modulation of the activity of human topoisomerase IB / S. Vieira, S. Castelli, M. Falconi, J. Takarada, G. Fiorillo, F. Buzzetti, P. Lombardi, A. Desideri // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – V. 77. – P. 68-75.
- 50.** Zhang, Y. Suppression of tumor-induced angiogenesis by taspine isolated from

Radix ET Rhizoma Leonticis and its mechanism of action in vitro / Y. Zhang, L. He, L. Meng, W. Luo, X. Xu // *Cancer Lett.* – 2008. – V. 262. – P. 103-113.

51. Fayad, W. Identification of a novel topoisomerase inhibitor effective in cells overexpressing drug efflux transporters / W. Fayad, M. Fryknäs, S. Brnjic, M.H. Olofsson, R. Larsson, S. Linder // *PLoS One* – 2009. – V. 4. – P. 7238.

52. Castelli, S. A natural anticancer agent thaspine targets human topoisomerase IB / S. Castelli, P. Katkar, O. Vassallo, M. Falconi, S. Linder, A. Desideri // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2013. – V. 13. – P. 356-363.

53. Facompré, M. Lamellarin D : a novel potent inhibitor of topoisomerase I / M. Facompré, C. Tardy, C. Bal-Mahieu, P. Colson, C. Perez, I. Manzanares, C. Cuevas, C. Bailly // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63. – P. 7392-7399.

54. Marco, E. Molecular determinants of topoisomerase I poisoning by lamellarins: comparison with camptothecin and structure-activity relationships / E. Marco, W. Laine, C. Tardy, A. Lansiaux, M. Iwao, F. Ishibashi, C. Bailly, F. Gago // *J. Med. Chem.* – 2005. – V. 48 – P. 3796-3807.

55. Chen, Z.F. Synthesis, characterization, and in vitro antitumor properties of gold(III) compounds with the traditional Chinese medicine (TCM) active ingredient liriodenine / Z.F. Chen, Y.C. Liu, Y. Peng, X. Hong, H.H. Wang, M.M. Zhang, H. Liang // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2012. – V. 17. – P. 247-261.

56. Gellert, E. The Indolizidine Alkaloids / E. Gellert // *J. Nat. Prod.* – 1982. – V. 45. – P. 50-73.

57. Li, Z. Isolation, total synthesis and biological activity of phenanthroindolizidine and phenanthroquinolizidine alkaloids. Synthesis / Z. Li, Z. Jin, R. Huang // *Synthesis.* – 2001. – V. 16. – P. 2365-2378.

58. Lee, S.K. Cytotoxic activity and G2/M cell cycle arrest mediated by antofine, a phenanthroindolizidine alkaloid isolated from *cynanchum paniculatum* / S.K. Lee, K.-A. Nam, Y.-H. Heo // *Planta Med.* – 2003. – V. 69. – P. 21-25.

59. Han, H. Natural inhibitors of DNA topoisomerase I with cytotoxicities / H.J. Han, N.H. Tan, G.Z. Zeng, J.T. Fan, H.Q. Huang, C.J. Ji, R.R. Jia, Q.S. // *Chem. Biodivers.* – 2008. – V. 5. – P. 1364-1368.

60. Kokoshka, J.M. Differences in the topoisomerase I cleavage complexes formed by camptothecin and wakayin, a DNA-intercalating marine natural product / J.M. Kokoshka, T.L. Capson, J.A. Holden // *Anticancer Drugs* – 1996. – V. 7. – P. 758-765.

61. Legentil, L. Synthesis and antitumor characterization of pyrazolic analogues of the marine pyrroloquinoline alkaloids: wakayin and tsitsikammamines / L. Legentil, L. Benel, V. Bertrand, B. Lesur // *J. Med. Chem.* – 2006. – V. 49. – P. 2979-2988.

62. Prescott, T.A. Lunacridine from *Lunasia amara* is a DNA intercalating topoisomerase II inhibitor / T.A. Prescott, I.H. Sadler, R. Kiapranis, S.K. Maciver // *J. Ethnopharmacol.* – 2007. – V.109. – P. 289-294.

63. Marshall, K.M. The anti-neoplastic and novel topoisomerase II mediated cytotoxicity of neoamphimedine, a marine pyridoacridine / K.M. Marshall, S.S. Matsumoto, J.A. Holden, G.P. Concepción, D. Tasdemir, C.M. Ireland, L.R. Barrows // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – V. 66. – P. 447-456.

64. Zhao, H. Nanoemulsion loaded with lycobetaine – oleic acid ionic complex: physicochemical characteristics, in vitro, in vivo evaluation, and antitumor activity / H. Zhao, H. Lu, T. Gong // *Int. J. Nanomedicine* – 2013. – V. 8. – P. 1959-1973.

65. Tang, W. Antimicrobial and Antioxidant Activities of three *Mentha* species essential oils. / W.Tang, I. Hemni // *Planta Med.* – 2003. – V. 69 – P. 97-108.

66. Barthelmes, H.U. Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II β poison and inhibits the growth of human tumour cells / H.U. Barthelmes, E. Niederberger, T. Roth, K. Schulte, W.C. Tang, F. Boege, H.H. Fiebig, G. Eisenbrand, D. Marko // *Br. J. Cancer.* – 2001. – V. 85. – P. 1585-1591.

67. Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II β poison and inhibits the growth of human tumour cells / H. U. Barthelmes, E Niederberger, T. Roth, K. Schulte, W. C. Tang, F. Boege, H-H. Fiebig, G. Eisenbrand, D. Marko // *British Journal of Cancer* – 2001. – V. 85. – P. 1585-1591.

68. Tang, W. Bertram. Recent Development of Antitumor Agents from Chinese Herbal Medicines; Part I. Low Molecular Compounds / W. Tang, I. Hemni, B. // *Planta Med.* – 2003. – V. 69. – P. 97-108.

69. Chen, X. Human cancer cell (Jurkat) killing by the cyanobacterial metabolite

calothrixin A / X. Chen, G.D. Smith // *J. Appl. Phycol.* – 2003. – V. 15. – P. 269-277.

70. Doan, N.T. Inhibition of bacterial RNA polymerase by the cyanobacterial metabolites 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A / N.T. Doan, P.R. Stewart, G.D. Smith, *FEMS Microbiol. Lett.* – 2001. – V. 196 – P.135-139.

71. Ishiyama, D. Novel human Topoisomerase I inhibitors, Topopyrones A, B, C and D / D. Ishiyama, Y. Kanai, H. Senda, W. Iwatani, H. Takahashi, H. Konno, S. Kanazawa / *J. Antibiot.* – 2000. – V. 53. – P. 873-878.

72. Khan, Q.A. The topopyrones poison human DNA Topoisomerases I and II / Q.A. Khan, M.A. Elban // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V. 130. – P. 12888-12889.

73. Khan, Q.A. Calothrixins, a new class of human DNA topoisomerase I poisons / Q.A. Khan, J. Lu, S.M. Hecht // *J. Nat. Prod.* – 2009. – V. 72. – P. 438-442.

74. Zhou, B.-N. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxyloides* / B.-N. Zhou, R.K. Johnson, M.R. Mattern, X. Wang, S.M. Hecht, H.T. Beck, A. Ortiz // *J. Nat. Prod.* – 2000. – V. 63. – P. 217-221.

75. McDonald, L.A. Inhibition of topoisomerase II catalytic activity by pyridoacridine alkaloids from a *Cystodytes* sp. ascidian: a mechanism for the apparent intercalator-induced inhibition of topoisomerase II / L.A. McDonald, G.S. Eldredge, L.R. Barrows, C.M. Ireland // *J. Med. Chem.* – 1994. – V. 37. – P. 3819-3827.

76. Rouëssé, J. Phase II study of elliptinium acetate salvage treatment of advanced breast cancer / J. Rouëssé, M. Spielmann, F. Turpin, T. Le Chevalier, M. Azab, J.M. Mondésir // *Eur. J. Cancer.* – 1993. – V. 29. – P. 856-859.

77. Hande, K.R. Topoisomerase II inhibitors / K.R. Hande // *Update Cancer Ther.* – 2008. – V. 3. – P. 13-26.

78. Deane, F.M. Synthesis and evaluation of novel ellipticines as potential anti-cancer agents / F.M. Deane, E.C. O'Sullivan, A.R. Maguire, J. Gilbert, J.A. Sakoff, A. McCluskey, F.O. McCarthy // *Org. Biomol. Chem.* – 2013. – V. 11. – P. 1334-1344.

79. Buckingham, J. V.R.N. Munasinghe. *Dictionary of Flavonoids* by CRC Press / J. Buckingham, V. Munasinghe // New York. – 2015 – P. 1199.

80. Gu, Y. Advances in Anti-Cancer Activities of Flavonoids in *Scutellariae radix*: Perspectives on Mechanism / Y. Gu, Q. Zheng, G. Fan, R. Liu // *Int. J. Mol. Sci.* –

2022. – V. 23. – P. 2-4.

81. Viola, H. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliceae) / H. Viola, C. Wolfman, M.L. Destein, C. Wasowski, C. Pena, J.H. Medina, A.C. Paladine // *J. Ethnopharmacol.* – 1994 – V. 44. – P. 47-53.

82. Toker, G. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden) / G. Toker, E. Kupeli, M. Memisoglu, E. Yesilada // *J. Ethnopharmacol.* – 2004. – V. 95. – P. 393-397.

83. Galati, G. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties /G. Galati, P. O'Brien // *J. Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – V. 37. – P. 287-303.

84. Rietjens, I.M. Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk./ I.M. Rietjens, M.G. Boersma, H. Woude, S.M.F. Jeurissen, M.E. Schutte, G.M. Alink // *Mutat. Res.* – 2005. – V. 574. – P. 124-138.

85. Bandele, O.J. Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II α and II β / O.J. Bandele, N. Osheroff // *Biochem.* – 2007. – V. 46. – P. 6097-6108.

86. Vafadar, A. Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells / A. Vafadar, Z. Shabaninejad, A. Movahedpour, F. Fallahi, M. Taghavipour, Y. Ghasemi, M. Akbari, A. Shafiee, S. Hajighadimi, S. Moradizarmehri, E. Razi, A. Savardashtaki // *Cell & Bioscience* – 2020. – V. 32. – P. 2-17.

87. Rauf, A. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review / A. Rauf, M. Imran, I. A. Khan, M., S. Gilani, Z. Mehmood, M. S. Mubarak // *Phytother Res* – 2018. – V. 32. – P. 2109-2130.

88. Boege, F. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I / F. Boege, T. Straub, A. Kehr, C. Boesenberg, K. Christiansen, A. Andersen, F. Jakob, J. Köhrle // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – P. 2262-2270.

89. López-Lázaro, M. Flavonoids As DNA Topoisomerase I Poisons / M. López-Lázaro, C. Martín-Cordero, M.V. Toro, M.J. Ayuso // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2002. – V. 17. – P. 25-29.

90. Chowdhury, A.R. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons

eukaryotic DNA topoisomerase I / A.R. Chowdhury, S. Sharma, S. Mandal, A. Goswami, S. Mukhopadhyay // *Biochem. J.* – 2002. – V. 366. – P. 653-661.

91. Webb, M.R. Comparative Analysis of Topoisomerase I β Inhibition and DNA Intercalation by Flavonoids and Similar Compounds: Structural Determinates of Activity / M.R. Webb, S.E. Ebeler // *Biochem. J.* – 2004. – V. 384. – P. 527-541.

92. Das, B.B. Differential induction of *Leishmania donovani* bi-subunit topoisomerase I-DNA cleavage complex by selected flavones and camptothecin: activity of flavones against camptothecin-resistant topoisomerase I / B.B. Das, N. Sen, A. Roy, S.B. Dasgupta, A. Ganguly, B.C. Mohanta, B. Dinda, H.K. Majumder // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V.34. – P. 1121-1132.

93. López-Lázaro, M. Cells Lacking DNA Topoisomerase II β are Resistant to Genistein / M. López-Lázaro, E. Willmore, C.A. Austin // *J. Nat. Prod.* – 2007. – V. 70. – P. 763-767.

94. López-Lázaro, M. Green tea constituents (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide / M. López-Lázaro, J.M. Calderón-Montaño, E. Burgos-Morón // *Mutagenesis.* – 2011. – V. 26. – P. 489-498.

95. López-Lázaro, M. The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells / M. López-Lázaro, E. Willmore, C.A. Austin // *Mutat. Res.* – 2010. – V. 696. – P. 41-47.

96. López-Lázaro, M. Curcumin induces high levels of topoisomerase I- and II-DNA complexes in K562 leukemia cells / M. López-Lázaro, E. Willmore, A. Jobson, K.L. Gilroy, H. Curtis, K. Padget // *J. Nat. Prod.* – 2007. – V. 70. – P. 1884-1888.

97. Strick, R. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia / R. Strick, P.L. Strissel, S. Borgers, S.L. Smith, J.D. Rowley // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2000. – V. 97. – P. 4790-4795.

98. Lanoue, L. Dietary factors and the risk for acute infant leukemia: Evaluating the effects of cocoa-derived flavanols on DNA topoisomerase activity / L. Lanoue, K.K. Green, C. Kwik-Urbe, C.L. Keen // *Exp. Biol. Med.* – 2010. – V.235 – P. 77-89.

99. Habermeyer, M. Anthocyanidins modulate the activity of human DNA

topoisomerases I and II and affect cellular DNA integrity / M. Habermeyer, J. Fritz, H.U. Barthelmes, M.O. Christensen, M.K. Larsen, F. Boege, D. Marko // *Chem. Res. Toxicol.* – 2005. – V. 18. – P. 1395-1404.

100. Esselen, M. Delphinidin modulates the DNA-damaging properties of topoisomerase II poisons / M. Esselen, J. Fritz, M. Hutter, D. Marko // *Chem. Res. Toxicol.* – 2009. – V.22. – P. 554-564.

101. Zahir, A. DNA topoisomerase I inhibitors: cytotoxic flavones from *Lethedon tannaensis* / A. Zahir, A. Jossang, B. Bodo, J. Provost, J.-P. Cosson, T. Sevenet // *J. Nat. Prod.* – 1996. – V. 59. – P. 701-703.

102. Bandele, O.J. Dietary polyphenols as topoisomerase II poisons: B ring and C ring substituents determine the mechanism of enzyme-mediated DNA cleavage enhancement / O.J. Bandele, S.J. Clawson, N. Osheroff // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. – V. 21. – P. 1253-1260.

103. Bandele, O.J. (-)-Epigallocatechin Gallate, A Major Constituent of Green Tea, Poisons Human Type II Topoisomerases / O.J. Bandele, N. Osheroff // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. — V. 21. – P. 936-943.

104. Park, I. Isoliquiritigenin induces G2 and M phase arrest by inducing DNA damage and by inhibiting the metaphase/anaphase transition / I. Park, K.K. Park, J.H. Park, W.Y. Chung // *Cancer Lett.* – 2009. – V.277. – P. 174.

105. Kimura, Y. Antitumor and antimetastatic activities of 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* roots / Y. Kimura, M. Taniguchi, K. Baba // *Planta Med.* – 2004. – V. 70. – P. 211-219.

106. Akihisa, T. 4-Hydroxyderricin from *Angelica keiskei* Roots Induces Caspase-dependent Apoptotic Cell Death in HL60 Human Leukemia Cells / T. Akihisa, T. Kikuchi, H. Nagai, K. Ishii, K. Tabata // *J. Oleo Sci.* – 2011. – V. 60. – P. 71-77.

107. Qin, Y. ambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by binding to its ATPase domain / Y. Qin, L. Meng, C. Hu, W. Duan, Z. Zuo, L. Lin, X. Zhang, J. Ding // *Mol. Cancer Ther.* – 2007. – V. 6. – P. 2429- 2440.

108. Zhao, W. Gambogic acid inhibits the growth of osteosarcoma cells in vitro by inducing apoptosis and cell cycle arrest / W. Zhao, S.F. Zhou, Z.P. Zhang, G.P. Xu,

X.B. Li, J.L. Yan // *Oncol. Rep.* – 2011. – V. 25. – P. 1289-1295.

109. Wang, X. Studies on chemical modification and biology of a natural product, gambogic acid (III): Determination of the essential pharmacophore for biological activity / X. Wang, N. Lu, Q. Yang, D. Gong, C. Lin, S. Zhang, M. Xi, Y. Gao, L. Wei, Q. Guo, Q. You // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. – V. 46. – P. 1280-1290.

110. Sadiq, A.A. Anti-proliferative effects of simocyclinone D8 (SD8), a novel catalytic inhibitor of topoisomerase II / A.A. Sadiq, M.R. Patel, B.A. Jacobson, M. Escobedo, K. Ellis, L.M. Oppegard, H. Hiasa, R.A. Kratzke // *Invest. New Drugs* – 2010. – V. 28. – P. 20-25.

111. Teiten, M.-H. Hybrid Curcumin Compounds: A New Strategy for Cancer Treatment / M.-H. Teiten, M. Dicato // *Molecules* – 2014. – V. 19. – P. 20839-20863.

112. Dhillon, N. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer / N. Dhillon, B.B. Aggarwal, R.A. Newman, R.A. Wolff, A.B. Kunnumakkara, J.L. Abbruzzese, C.S. Ng, V. Badmaev, R. Kurzrock // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – V. 14. – P. 4491-4499.

113. López-Lázaro, M. Curcumin induces high levels of topoisomerase I- and II-DNA complexes in K562 leukemia cells / M. López-Lázaro, E. Willmore, A. Jobson, K.L. Gilroy, H. Curtis, K. Padget // *J. Nat. Prod.* – 2007. – V. 70. – P. 1884-1888.

114. Gordon, O.N. Oxidative transformation of demethoxy- and bisdemethoxycurcumin: Products, mechanism of formation, and poisoning of human topoisomerase II α / O.N. Gordon, P.B. Luis, R.E. Ashley, N. Osheroff, C. Schneider // *Chem. Res. Toxicol.* – 2015. – V. 28. – P. 989-996.

115. Potter, E. Investigation of fatty acid conjugates of 3,5-bisarylmethylene-4-piperidone derivatives as antitumor agents and human topoisomerase-II α inhibitors / E. Potter, M. Jha, K.S. Bhullar, H.P.V. Rupasinghe, J. Balzarini, A. Jha // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – V. 23. – P. 411-421.

116. Burden, D.A. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme / D.A. Burden // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – V. 1400. – P. 139-154.

117. Jarvinen, T.A.H. Topoisomerase II alpha gene (TOP2A) amplification and

deletion in cancer—more common than anticipated / T.A.H. Jarvinen, E.T. Liu // *Cytopathology*. – 2003. – V. 14. – P. 309-313.

118. Li, Y.-X. Triterpenoids of marine origin as anti-cancer agents / Y.-X. Li, S.W.A. Himaya, S.-K. Kim // *Molecules* – 2013. – V. 18. – P. 7886-7909.

119. Yan, X.-J. Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. / X.-J. Yan, L.-H. Gong, F.-Y. Zheng, K.-J. Cheng, Z.-S. Chen, Z. Shi // *Drug Discovery Today* – 2014. – V. 19. – P. 482-488.

120. Chowdhury, A.R. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives / A.R. Chowdhury, S. Mandal, B. Mitra, S. Sharma, S. Mukhopadhyay // *Med. Sci. Monit.* – 2002. – V. 8. – P. 254-265.

121. Abdel Bar, F.M. Rational design and semisynthesis of betulinic acid analogues as potent topoisomerase inhibitors / F.M. Abdel Bar, M.A. Khanfar, A.Y. Elnagar, H. Liu, A.M. Zaghloul, F.A. Badria, P.W. Sylvester, K.F. Ahmad, K.P. Raisch, K.A. El Sayed // *J. Nat. Prod.* – 2009. – V. 72. – P. 1643-1650.

122. Nakagawa-Goto, K. Cancer preventive agents 9. Betulinic acid derivatives as potent cancer chemopreventive agents / K. Nakagawa-Goto, K. Yamada, M. Taniguchi, H. Tokuda, K.-H. Lee // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – V. 19 – P. 3378-3381.

123. Jamshidi-adevani, F. Comparative study of the cytotoxicity, apoptotic, and epigenetic effects of Boswellic acid derivatives on breast cancer / F. Jamshidi-adevani, S. Ghaemi, S. Al-Hashmi, S. Vakilian, J. Al-Kindi, N. Ur Rehman, K. Alam, K. Al-Riyami, R. Csuk, E. Arefian, A. Al-Harrasi // *Sci Rep.* – 2022. – V. 12. – P. 19979.

124. Chashoo, G. A propionyloxy derivative of 11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 cells mediated through topoisomerase I & II inhibition / G. Chashoo, S.K. Singh, P.R. Sharma, D.M. Mondhe, A.H. Dar, A. Saxena, S.S. Andotra, B.A. Shah, N.A. Qazi, S.C. Taneja // *Chem.-Biol. Interact.* – 2011. – V. 189. – P. 60-71.

125. Syrovets, T. Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and IIalpha / T. Syrovets, B. Büchele, E. Gedig, J.P. Slupsky, T. Simmet // *Mol. Pharmacol.* – 2000. – V. 58 – P. 71-81.

126. Mizushina, Y. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA

topoisomerase // *Biochem. J.* – 2000. – V. 350 – P. 757-763.

127. Ashour, A. Rational design and synthesis of topoisomerase I and II inhibitors based on oleanolic acid moiety for new anti-cancer drugs / A. Ashour, S. El-Sharkawy, M. Amer, F.A. Bar, Y. Katakura, T. Miyamoto, N. Toyota, T.H. Bang, R. Kondo, K. Shimizu // *Bioorg. Med. Chem.* – 2014. – V. 22. – P. 211-220.

128. Wang, P. Cytotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase I of polyhydroxylated triterpenoids and triterpenoid glycosides / P. Wang, S. Ownby, Z. Zhang, W. Yuan, S. Li // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – V. 20 – P. 2790-2796.

129. Sahoo, P. M. A brief review: antibacterial activity of quinone derivatives / P. M. Sahoo, Sunita Behera, R. Behura, A. Acharya, D. Biswal, S. K. Suna, R. Sahoo, R. C. Soren, B. R. Jali // *Bioint. Res. Ap. Chem.* – 2022. – V. 12 – P. 3247-3258

130. Dahlem, M. A. Junior, Quinones as an efficient molecular scaffold in the antibacterial/antifungal or antitumoral arsenal / M. A. Dahlem Junior, R. W. Edzang, A. L. Catto // *Int. J. Mol. Sciences* – 2022. – V. 23. – P. 14108-14121.

131. Guo, Y. Research progress on the antiviral activities of natural products and their derivatives: Structure–activity relationships / Y. Guo, A. Ma, X. Wang, C. Yang, X. Chen, G. Li, F. Qiu // *Front. Chem.* – 2022. – V. 1. – P. 3-10.

132. Smith, C. E. A mechanism for inducing plant development: the genesis of a specific inhibitor / C. E. Smith, T. Rutledge, Z. Zeng, R. C. O'Malley, D. G. Lynn // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1996. – V. 93. – P. 6986-6991.

133. Lu, J.-J. A mechanism for inducing plant development: the genesis of a specific inhibitor / J.-J. Lu, J.-L. Bao, G.-S. Wu, W.-S. Xu, M.-Q. Huang, X.-P. Chen, Y.-T. Wang // *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* – 2012. – V. 13. – P. 456-463.

134. Ashley, R. E. Natural products as topoisomerase II poisons: effects of thymoquinone on DNA cleavage mediated by human topoisomerase I α / R.E. Ashley, N. Osheroff // *Chem. Res. Toxicol.* – 2014. – V. 27 – P. 787-793

135. Moiseeva, A. A. Anthracycline derivatives and their anticancer activity // A. A. Moiseeva / *Journal of Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences* – 2019. – V. 2. – P. 9-18.

136. Kogan, N.M. HU-331, a novel cannabinoid-based anticancer topoisomerase

II inhibitor / N.M. Kogan, M. Schlesinger, E. Priel, R. Rabinowitz, E. Berenshtein, M. Chevion, R. Mechoulam // *Mol. Cancer Ther.* – 2007. – V. 6. – P. 173-183.

137. Y. Pommier, Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme / Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, D. Strumberg // *Biochim. Biophys Acta: Gene Struct. Express.* – 1998. – V. 1400. – 83-105.

138. Li, C.J. β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin / C.J. Li, L. Averboukh, A.B. Pardee // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 22463- 22468.

139. Kuo, Y.H. Cytotoxic Constituents from the Stems of *Diospyros maritime* / Y.H. Kuo, C.I. Chang, S.Y. Li, C.J. Chou, C.F. Chen, Y.H. Kuo, K.H. Lee // *Planta Med.* – 1997. – V. 63. P. 363-365.

140. Ting, C.Y. Isodiospyrin as a novel human DNA topoisomerase I inhibitor / C.Y. Ting, C.T. Hsu, H.T. Hsu, J.S. Su, T.Y. Chen, W.Y. Tarn, Y.H. Kuo, J. Whang-Peng, L.F. Liu, J. Hwang // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – V. 66. – P. 1981-1991.

141. Wei, P. New potential inhibitors of DNA topoisomerase. Part II: Design and synthesis of α -lapachone derivatives under microwave irradiation / P. Wei, X. Zhang, S. Tu, S. Yan, H. Yi // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – V. 19. – P. 828-830.

142. Lee, K.H. In vivo antitumor activity of mansonone E isolated from *Ulmus davidiana* var. *japonica* NAKAI / K.H Lee, C.H Cho, W.H Yoon// *Korean Journal of Pharmacognosy* – 2004. – V. 35. – P. 199-202.

143. Huang, Z.-H. Huang. Design, synthesis and biological evaluation of novel mansonone E derivatives prepared via CuAAC click chemistry as topoisomerase II inhibitors / Z.-H. Huang, S.-T. Zhuo, C.-Y. Li, H.-T. Xie, D. Li, J.-H. Tan, T.-M. Ou, Z.-S. Huang, L.-Q. Gu, S.-L. Huang // *Eur. J. Med. Chem.* – 2013. – V. 68. – P. 58-71.

144. Chen, Z.F. Cytotoxicity of the traditional chinese medicine (TCM) plumbagin in its copper chemistry / Z.F. Chen, M.X. Tan, L.M. Liu, Y.C. Liu, H.S. Wang, B. Yang, Y. Peng, H.G. Liu, H. Liang, // *Dalton Trans.* – 2009. – V. 28. – P. 10824-10833.

145. Yang, F.SH-7, a new synthesized shikonin derivative, exerting its potent antitumor activities as a topoisomerase inhibitor / F. Yang, Y. Chen, W. Duan, C. Zhang, H. Zhu, J. Ding // *Int. J. Cancer.* – 2006. – V. 119. – 1184-1193.

146. Kennedy, S. Topoisomerase I/II inhibition by a novel naphthoquinone containing a modified anthracycline ring system / S. Kennedy, J.C. DiCesare, R.J. Sheaff // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2011. – V. 408. – P. 94-98.

147. Li, Y. Emodin triggers DNA double-strand breaks by stabilizing topoisomerase II-DNA cleavage complexes and by inhibiting ATP hydrolysis of topoisomerase II / Y. Li, Y. Luan, X. Qi, M. Li, L. Gong, X. Xue, X. Wu, Y. Wu, M. Chen, G. Xing, J. Yao, J. Ren // *Toxicol. Sci.* – 2010. – V. 118 – P. 435-443.

148. Duan, F. Haloemodin as Novel Antibacterial Agent Inhibiting DNA Gyrase and Bacterial Topoisomerase I / F. Duan, X. Li, S. Cai, G. Xin, Y. Wang, D. Du, S. He, B. Huang, X. Guo, H. Zhao, R. Zhang, L. Ma, Y. Liu, Q. Du, Z. Wei, Z. Xing, Y. Liang, X. Wu, C. Fan, C. Ji, D. Zeng, Q. Chen, Y. He, X. Liu, W. Huang // *J. Med. Chem* – 2014. – V. 57. – P. 3707-3714.

149. Sun, C. C. Inhibition of angiogenesis involves in anticancer activity of riccardin D, a macrocyclic bisbibenzyl, in human lung carcinoma / C. C. Sun, Y. S. Zhang, X. Xue, Y. N. Cheng, H. P. Liu, C. R. Zhao, H. X. Lou, X. Qu // *J. Eur. J. Pharmacol.* – 2011. – V. 667. – P. 136-143.

150. Aflalo, E. Inhibition of topoisomerase I activity by tyrphostin derivatives, protein tyrosine kinase blockers: mechanism of action / E. Aflalo, S. Iftach, S. Segal, A. Gazit, E. Priel // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54. – P. 5138-5142.

151. Mazumder, A. Effects of tyrphostins, protein kinase inhibitors, on human immunodeficiency virus type 1 integrase / A. Mazumder, A. Gazit, A. Levitzki, M. Nicklaus, J. Yung, G. Kohlhagen // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – P. 15111-15122.

152. Leone, S. Resveratrol induces DNA double-strand breaks through human topoisomerase II interaction / S. Leone, T. Cornetta, E. Basso, R. Cozz // *Cancer Lett.* – 2010. – V. 295. – P. 167-172.

153. Leone, S. Resveratrol acts as a topoisomerase II poison in human glioma cells / S. Leone, E. Basso, F. Polticelli // *Int. J. Cancer.* – 2012. – V. 131. – P. 173-178.

154. Huang, C.P. Anticancer activity of botanical alkyl hydroquinones attributed to topoisomerase II poisoning / C.P. Huang, W.H. Fang, L.I. Lin, R.Y. Chiou, L.S. Kan, N.H. Chi, Y.R. Chen, T.Y. Lin, S.B. Lin // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2008. – V. 227.

– P. 331-338.

155. Mizushina, Y. Inhibitory effects of docosyl p-coumarate on DNA topoisomerase activity and human cancer cell growth / Y. Mizushina, K. Nishimura, Y. Takenaka, T. Takeuchi, F. Sugawara, H. Yoshida, T. Tanahashi // *Int. J. Oncol.* – 2010. – V. 37. – P. 993-1000.

156. Nozaki, H. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity / H. Nozaki, K.I. Hayashi, M. Kido, K. Kakumoto, S. Ikeda, N. Matsuura, H. Tani, D. Takaoka, M. Iinuma, Y. Akao // *Tetrahedron Lett.* – 2007. – V. 48. – P. 8290-8292.

157. Castelli, S. A derivative of the natural compound kakuol affects DNA relaxation of topoisomerase IB inhibiting the cleavage reaction / S. Castelli, S. Vieira, I. D'Annessa, P. Katkar, L. Musso, S. Dallavalle, A. Desideri // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2013. – V. 530 – P. 7-12.

158. Xiao, J. Recent advances of podophyllotoxin/epipodophyllotoxin hybrids in anticancer activity, mode of action, and structure-activity relationship: An update (2010-2020) / J. Xiao, M.Gao, Z. Sun, Q Diao, P. Wang, F. Gao // *Eur. J. Med. Chem.* – 2020. – V. 208. – P. 220-227.

159. Zhang, W. Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play / W. Zhang, P. Gou, J. Dupret, C. Chomienne, F. Rodrigues-Limaa // *IJPSN.* – 2021. – V. 14. – P. 1173-1181.

160. Reyhanoglu, G. Etoposide/ G. Reyhanoglu, P. Tadi // *National library of medicine* – 2023 – V. 1. – P. 3-4.

161. Pitts, S. L. Contributions of the D-ring to the activity of etoposide against human topoisomerase II α : potential interactions with DNA in the ternary enzyme-drug-DNA complex / S. L. Pitts, M. J. Jablonksy, M. Duca,; D. Dauzonne, C. Monneret, P. B. Arimondo, C. Anklin, D. E. Graves // *Biochemistry.* – 2011. – V. 50. – P. 5058.

162. Meresse, P. Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry / P. Meresse, E. Dechaux, C. Monneret, E. Bertounesque // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – V. 12. – P. 2443-2466.

163. Seiter, K. Toxicity of the topoisomerase II inhibitors. / K. Seiter // *Expert Opin. Drug Saf.* – 2005. – V. 4. – P. 219- 234.

164. Xu, H. A review on hemisynthesis, biosynthesis, biological activities, mode of action, and structure-activity relationship of podophyllotoxins: 2003-2007/ H. Xu, M. Lv, X. Tian // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – V. 16. – P. 327–349.

165. Motyka, S. Podophyllotoxin and its derivatives: Potential anticancer agents of natural origin in cancer chemotherapy / S. Motyka, K. Jaferník, H. Ekiert, J. Sharifi-Rad, D. Calina, B. Al-Omari, A. Szopa, W. C. Cho. // *Biomed Pharmacother.* – 2023. – V. 158. – P. 14145.

166. Utsugi, T. Antitumor activity of a novel podophyllotoxin derivative (TOP-53) against lung cancer and lung metastatic cancer / T. Utsugi, J. Shibata, Y. Sugimoto, K. Aoyagi, K. Wierzba, T. Kobunai, T. Terada, T. Oh-hara, T. Tsuruo, Y. Yamada // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56. – P. 2809–2814.

167. Byl, J.A. DNA topoisomerase II as the target for the anticancer drug TOP-53: mechanistic basis for drug action / J.A. Byl, S.D. Cline, T. Utsugi, T. Kobunai, Y. Yamada, N. Osheroff // *Biochemistry.* – 2001. – V. 40. – P. 712–718.

168. Liu, J.M. Natural Product-Based Inhibitors of Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) / J.M. Liu, L.T. Chen, Y. Chao, A.F. Li, C.W. Wu, T.S. Liu, H.S. Shiah, J.Y. Chang, J.D. Chen, H.W. Wu, W.C. Lin, C. Lan, J. Whang-Peng // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2002 – V. 49. – P. 425–428.

169. Guerram, M. Podophyllotoxin, a medicinal agent of plant origin: past, present and future/ M. Guerram, Z. Jiang, Lu-Y. Zhang // *Chinese Journal of Natural Medicines.* – 2012 – V. 10. – P. 161–169.

170. Mazumder, K. A Review on Mechanistic Insight of Plant Derived Anticancer Bioactive Phytocompounds and Their Structure Activity Relationship / K. Mazumder, A. Aktar, P. Roy, B. Biswas, Md. E. Hossain, K. Sarkar, S. Chandra Bachar, F. Ahmed, A. S. M. Monjur-Al-Hossain, K. Fukase // *Molecules.* – 2022 – V. 9. – P. 2036-2037.

171. Suzuki, K. Topostatin, a novel inhibitor of topoisomerase I and II produced *Thermomonospora alba* strain / K. Suzuki, K. Nagao, Y. Monnai, A. Yagi, M. Uyeda // *J. Antibiot.* – 1998. – V. 51. – P. 991-998.

172. Shioiri, T. Synthesis of topostins b567 and d654 (wb-3559d, flavolipin), DNA topoisomerase I inhibitors of bacterial origin / T. Shioiri, Y. Terao, N. Irako, T. Aoyama // *Tetrahedron*. – 1998. – P. 54. – P. 15701-15710.

173. Ikegami, Y. Topostin, a novel inhibitor of mammalian dna topoisomerase I from flexibacter topostinus sp. Nov./ Y. Ikegami, N. Takeuchi, M. Hanada, Y. Hasegawa, K. Ishii, T. Andoh, K. Suzuki, H. Yamaguchi, S. Miyazaki // *J. Antibiot.* – 1990. – V. 43. – P. 158-162.

174. Mizushima, T. Inhibition of Escherichia coli DNA topoisomerase I activity by phospholipids / T. Mizushima, S. Natori, K. Sekimizu // *Biochem. J.* – 1992. – V. 285. – P. 503-506.

175. Tamura, H. Cidic phospholipids directly inhibit DNA binding of mammalian DNA topoisomerase I / H. Tamura, Y. Ikegami, K. Ono, K. Sekimizu, T. Andoh // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 261. – P. 151-154.

176. Suzuki, K. Inhibition of Topoisomerases by Fatty Acids / K. Suzuki, F. Shono, H. Kai, T. Uno, M. // *J. Enz. Inhib.* – 2000. – V. 15. – P. 357-366.

177. Mizushina, Y. Inhibitory action of conjugated C18-fatty acids on DNA polymerases and DNA topoisomerases / Y. Mizushina, T. Tsuzuki, T. Eitsuka, T. Miyazawa, K. Kobayashi, H. Ikawa, I. Kuriyama, Y. Yonezawa, M. Takemura, H. Yoshida, K. Sakaguchi // *Lipids*. – 2004. – V. 39. – P. 977-983.

178. Yonezawa, Y. Inhibitory effect of conjugated eicosapentaenoic acid on human DNA topoisomerases I and II / Y. Yonezawa, T. Tsuzuki, T. Eitsuka, T. Miyazawa, T. Hada, K. Uryu, C. Murakami-Nakai, H. Ikawa, I. Kuriyama, M. Takemura, M. Oshige, H. Yoshida, K. Sakaguchi, Y. Mizushina // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2005. – V. 435. – P. 197-206.

179. Carballeira, N.M. Total syntheses and biological evaluation of (5Z,9Z)15 - 5,9-hexadecadienoic acid, an inhibitor of Human topoisomerase I / N.M. Carballeira, J.E. Betancourt, E.A. Orellano // *J. Nat. Prod.* – 2002. – V. 65. – P. 1715-1718.

180. Lee, H. Topoisomerase I inhibitors from the Streptomyces sp. strain KM86-9B isolated from a marine sponge / H.K. Lee, D.-S. Lee, J. Lim, J.S. Kim, K.S. Im, J.H. Jung // *Arch. Pharm. Res.* – 1998 – V. 21. – 729-733.

181. Suzuki, K. Inhibition of Topoisomerases by Fatty Acids / K. Suzuki, F. Shono, H. Kai, T. Uno // *J. Enz. Inhib.* – 2000. – V. 15. – P. 357-366.

182. Carballeira, N.M. An improved synthesis for the (Z)-14-methyl-9-pentadecenoic acid and its topoisomerase I inhibitory activity / N.M. Carballeira, D. Sanabria, D. Oyola // *ARKIVOC.* – 2007. – V. 8. – P. 49-57.

183. Juagdan, E.G. Elenic acid, an inhibitor of Topoisomerase II, from a sponge, *Plakinastrella* sp. / E.G. Juagdan, R.S. Kalindindi, P.J. Scheuer, M. Kelly-Borges // *Tetrahedron Lett.* – 1995. – V. 36. – P. 2905-2908.

184. Chen, A.Y. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets / A.Y. Chen, L.F. Chu // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1994. – V. 34. – P. 191-218.

185. Mizushina, Y. Selective inhibition of the activities of both eukaryotic. DNA polymerases and DNA topoisomerases by elenic acid / Y. Mizushina, C. Murakami, K. Ohta, H. Takikawa, K. Mori, H. Yoshida, F. Sugawara, K. Sakaguchi // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – V. 63. – P. 399-407.

186. Choi, J.-Y. Topoisomerase I and II inhibitory constituents from the bark of *Tilia amurensis* / J.-Y. Choi, C.-S. Seo, M.-S. Zheng, C.-S. Lee, J.-K. Son // *Arch. Pharm. Res.* – 2008. – V. 31. – P. 1413-1418.

187. Li, X.-C. Potent in vitro antifungal activities of naturally occurring acetylenic acids / X.-C. Li, M.R. Jacob, S.I. Kahn, M.K. Ashfaq, K.S. Babu, A.K. Agarwal, H.N. ElSohly, S.P. Manly // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – V. 52. – P. 2442-2448.

188. Morbidoni, H.R. Dual Inhibition of Mycobacterial Fatty Acid Biosynthesis and Degradation by 2-Alkynoic Acids / H.R. Morbidoni, C. Vilcheze, L. Kremer, R. Bittman, J.C. Sacchettini // *J. Chem. Biol.* – 2006. – V. 13. – P. 297-307.

189. Fatope, M.O. C₁₈ Acetylenic Fatty Acids of *Ximenia Americana* with Potential Pesticidal Activity / M.O. Fatope, O.A. Adoum, Y. Takeda // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – V. 48. – P. 1872-1874.

190. Li, X.-C. 2,6-hexadecadiynoic acid and 2,6-nonadecadiynoic acid: Novel synthesized acetylenic fatty acids as potent antifungal agents/ X.-C. Li, M.R. Jacob, H.N. ElSohly, D.G. Nagle, T.J. Smillie, L.A. Walker, A.M. Clark // *J. Nat. Prod.* – 2003. – V. 66. – P. 1132–1135.

191. Carballeira, N.M. Total synthesis and antileishmanial activity of the natural occurring acetylenic fatty acids 6-heptadecynoic acid and 6-icosynoic acid / N.M. Carballeira, M.M. Cartagena, C.F. Prada, C.F. Rubio // *Lipids*. – 2009. – V. 44. – P. 953-961.

192. Carballeira, N.M. 2-Alkynoic fatty acids inhibit topoisomerase IB from *Leishmania donovani* / N.M. Carballeira, M. Cartagena, D. Sanabria, M. Kaiser, D. Tasdemir, C.F. Prada, R.M. Reguera, R. Balaña-Fouce // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2012. – V. 22. – P. 6185-6189.

193. Yonezawa, Y. Inhibitory effect of conjugated eicosapentaenoic acid on human DNA topoisomerases I and II / Y. Yonezawa, T. Tsuzuki, T. Eitsuka, T. Miyazawa, T. Hada, K. Uryu, C. Murakami-Nakai, H. Ikawa, I. Kuriyama, M. Takemura, M. Oshige, H. Yoshida // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2005. – V. 435. – P. 197-206.

194. Yonezawa, Y. Mechanism of cell cycle arrest and apoptosis induction by conjugated eicosapentaenoic acid, which is a mammalian DNA polymerase and topoisomerase inhibitor / Y. Yonezawa, T. Hada, K. Uryu, T. Tsuzuki, K. Nakagawa, T. Miyazawa, H. Yoshida, Y. Mizushima // *Int. J. Oncol.* – 2007. – V. 30. – P. 1197-1204.

195. Castelli, S. Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits human topoisomerase IB with a mechanism different from camptothecin / S. Castelli, A. Campagna, O. Vassallo, C. Tesauro, P. Fiorani, P. Tagliatesta, F. Oteri, M. Falconi, H.K. Majumder, A. Desideri // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2009. – V. 486. – P. 103-110.

196. Vassallo, O. Conjugated eicosapentaenoic acid (cEPA) inhibits *L. donovani* topoisomerase I and has an antiproliferative activity against *L. donovani* promastigotes / O. Vassallo, S. Castelli, A. Biswas, S. Sengupta, P.K. Das, I. D'Annessa, F. Oteri, A. Leoni, P. Tagliatesta // *Open Antimicrob. Agents J.* 2011. – V. 3. – P. 23-29.

197. Nemoto, T. Amphimic acids and related long-chain fatty acids as DNA topoisomerase I inhibitors from an Australian sponge *Amphimedon* sp.: isolation, structure, synthesis, and biological evaluation / T. Nemoto, G. Yoshimo, M. Ojika, Y. Sakagami // *Tetrahedron*. – 1997. – V. 53. – P. 16699-16710.

198. Makarieva, T.N. A new cytotoxic fatty acid (5Z,9Z)-22-methyl-5,9-tetracosadienoic acid and the sterols from the far Eastern sponge *Geodinella robusta* /

T.N. Makarieva, E.A. Santalova, I.A. Gorshkova, A.S. Dmitrenok, A.G. Guzii, V.I. Gorbach, V.I. Svetashev, V.A. Stonik // *Lipids*. – 2002 – V. 37. – P. 75-80.

199. Carballeira, N.M. Total syntheses and biological evaluation of (5Z,9Z)-5,9-hexadecadienoic acid, an inhibitor of Human topoisomerase I / N.M. Carballeira, J.E. Betancourt, E.A. Orellano // *J. Nat. Prod.* – 2002. – V. 65. – P. 1715-1718.

200. Carballeira, N.M. Gonzalez. Identification of the Novel Antimicrobial Fatty Acid (5Z,9Z)-14-Methyl-5,9-pentadecadienoic Acid in *Eunicea succinea* / N.M. Carballeira, E.D. Reyes, A. Sostre, A.D. Rodriguez, J.L. Rodriguez // *J. Nat. Prod.* – 1997. – V. 60 – P. 502-504.

201. Carballeira, N.M. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents / N.M. Carballeira // *Prog. Lipid. Res.* – 2008. – V. 47. – P. 50-61.

202. Djerassi, C. Phospholipid studies of marine organisms. Part 25. Sponge phospholipids / C. Djerassi, W.-K. Lam // *Acc. Chem. Res.* – 1991. – V.24. – P. 69-75.

203. Nemoto, T. Amphimic acids and related long-chain fatty acids as DNA topoisomerase I inhibitors from an Australian sponge, *Amphimedon* sp.: isolation, structure, synthesis, and biological evaluation / T. Nemoto, G. Yoshino, M. Ojika, Y. Sakagami // *Tetrahedron*. – 1997. – V. 53. – P. 16699-16710.

204. Raederstorff, D. Biosynthetic studies of marine lipids. 11. Synthesis, biosynthesis, and absolute configuration of the internally branched demospongiic acid, 22-methyl-5,9-octacosadienoic acid / D. Raederstorff, A. Y. L. Shu, E. Janice Thompson, and Carl Djerassi // *J. Org. Chem.* – 1987. – V. 52. – P. 2337-2346.

205. D'yakonov, V. A. The facile synthesis of the 5Z,9Z-dienoic acids and their topoisomerase I inhibitory activity / V. A. D'yakonov, A. A. Makarov, L. U. Dzhemileva, E. Kh. Makarova, E. K. Khusnutdinova, U. M. Dzhemilev // *Chem. Commun.* – 2013. – V. 49. – P. 8401-8403.

206. Thomas, A. Targeting Topoisomerase I in the Era of Precision Medicine / A. Thomas, Y. Pommier // *Clin Cancer Res.* – 2019. – V. 25(22). – P. 6581-6589.

207. You, F. Topoisomerase inhibitors and targeted delivery in cancer therapy / F. You, C. Gao // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2019. – V. 19. – P. 713-729.

208. D'yakonov, V.A. Novel Mg-organic reagents in organic synthesis. Cp₂TiCl₂-Catalyzed intermolecular cyclomagnesiation of cyclic and acyclic 1,2-dienes using Grignard reagents // V.A. D'yakonov, A.A. Makarov, A.G. Ibragimov, L.M. Khalilov, U.M. Dzhemilev // *Tetrahedron*. – 2008. – V. 64. – P. 10188-10194.

209. D'yakonov, V.A. Cyclomagnesiation of O-containing 1,2-dienes with Grignard reagents in the presence of Cp₂TiCl₂ / V.A. D'yakonov, A.A. Makarov, E.Kh. Makarova, L.M. Khalilov, U.M. Dzhemilev // *Russ Chem Bull*. – 2012. – V. 61. – P. 1943-1949.

210. D'yakonov, V.A. Synthesis and transformations of metallacycles 39. Zr-Catalyzed cyclomagnesiation of N-containing allenes / V.A. D'yakonov, A.A. Makarov, E.Kh. Makarova, T.V. Tyumkina, U.M. Dzhemilev // *Russ. Chem. Bull*. – 2012. – V. 61. – P. 158-164.

211. D'yakonov, V.A. The facile synthesis of the 5Z,9Z-dienoic acids and their topoisomerase I inhibitory activity / V.A. D'yakonov, A.A. Makarov, L.U. Dzhemileva, E.Kh. Makarova, E.K. Khusnutdinova, U.M. Dzhemilev // *Chem. Commun*. – 2013. – V. 49. – P. 8401-8403.

212. D'yakonov, V.A. Novel organomagnesium reagents in synthesis. Catalytic cyclomagnesiation of allenes in the synthesis of N-, O-, and Si-substituted 1Z,5Z-dienes / V.A. D'yakonov, E.Kh. Makarova, U.M. Dzhemilev // *Tetrahedron*. – 2013. – V. 69. – P. 8516-8526.

213. D'yakonov, V.A. Stereoselective synthesis of 11-phenylundeca-5Z,9Z-dienoic acid and investigation of its human topoisomerase I and I α 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 // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. – 2015. – V. 25. – P. 2405-2408.

214. Carballeira, N. Facile syntheses for (5Z,9Z)-5,9-hexadecadienoic acid, (5Z,9Z)-5,9-nonadecadienoic acid, and (5Z,9Z)-5,9-eicosadienoic acid through a common synthetic route / N. Carballeira, A. Emiliano, A. Guzmán // *Chem. Phys. Lipids*. – 1999. – V. 100. – P. 33-40.

215. Castelli, S. A Derivative of the natural compound kakuol affects DNA

relaxation of topoisomerase IB inhibiting the cleavage reaction / S. Castelli, S. Vieira, I. D'Annessa, P. Katkar, L. Musso, S.A. Dallavalle // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2013. – V. 530. – P. 7-12.

216. Carballeira, N.M. Total synthesis and biological evaluation of (5Z,9Z)-5,9-hexadecadienoic acid, an inhibitor of human topoisomerase I / N.M. Carballeira, J.E. Betancourt, E.A. Orellano, F.A. Gonzalez // *J. Nat. Prod.* – 2013. – V. 65. – P. 1715-1718.

217. Dzhemilev, U.M. Cyclo- and carbomagnesianation of 1,2-dienes catalyzed by Zr complexes / U.M. Dzhemilev, V.A. D'yakonov, L.O. Khafizova, A.G. Ibragimov // *Tetrahedron.* – 2004. – V. 60. – P. 1287-1292.

218. Dzhemilev, U.M. Cyclomagnesianation of olefins with ethylmagnesium bromide in the presence of titanium complexes / U.M. Dzhemilev, V.A. D'yakonov, L.O. Khafizova, A.G. Ibragimov // *Russ. J. Org. Chem.* – 2005. – V. 41. – P. 352–357.

219. Levy, G. Carbon-13 nuclear magnetic resonance for organic chemists / G. Levy, G. Nelson // *Wiley.* – 1972. – P. 292.

220. Staker, B.L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog / B.L. Staker, K. Hjerrild, M.D. Feese, C.A. Behnke, A.B. Burgin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 15387-15392.

221. Trott, O. Software news and update AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / O. Trott, A.J. Olson // *J. Comput. Chem.* – 2010. – V. 31. – P. 455-461.

222. Uytterhoeven, K. Two 1:1 binding modes for distamycin in the minor groove of d(GGCCAATTGG) / K. Uytterhoeven, J. Sponer, L. Van Meervelt // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – V. 269. – P. 2868-2877.

223. Wu, C.C. On the structural basis and design guidelines for type II topoisomerase-targeting anticancer drugs / C.C. Wu, Y.C. Li, Y.R. Wang, T.K. Li // *Nucleic. Acids. Res.* – 2013. – V. 41. – P. 10630-10640.

224. Ulukan, H. Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential / H. Ulukan, P.W. Swaan // *Drugs.* – 2002. – V. 62(14). – P. 2039-2057.

225. Shen, L.L. DNA-unwinding test using eukaryotic DNA topoisomerase I / L.L. Shen // *Methods. Mol. Biol.* – 2001. – V. 95. – P. 149-160.

226. Mazerski, J. The geometry of intercalation complex of antitumor mitoxantrone and ametantrone with DNA: molecular dynamics simulations / J. Mazerski, S. Martelli, E. Borowski // *Acta. Biochim. Pol.* – 1998. – V. 45(1). – P. 1-11.

227. Петров, В.И. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / В.И. Петров, О.С. Медведев, И.Н. Тюренков, Н. Мурашев – М.: ФГБУ «НЦЭМСП» Минздравсоцразвития РФ, 2012. – 944 с.

228. Makarov, A.A. New synthetic analogues of natural 5Z,9Z-dienoic acids: Stereoselective synthesis and study of the anticancer activity / A.A. Makarov, L.U. Dzhemileva, A.R. Salimova, E.K. Makarova, I.R. Ramazanov, V.A. D'yakonov, U.M.Dzhemilev // *Bioorg. Chem.* – 2020. – V. 104 – P. 104303.

229. D'yakonov, V.A. Catalytic cyclometallation in steroid chemistry III: Synthesis of steroidal derivatives of 5Z,9Z-dienoic acid and investigation of its 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.

230. 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 α / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, A.R. Mulukova, D.S. Baev, E.K. Khusnutdinova, T.G. Tolstikova, U.M. Dzhemilev // *Med. Chem. Res.* – 2016. – V. 25. – P. 30-39.

231. Castelli, S. Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits human topoisomerase IB with a mechanism different from camptothecin / S. Castelli, A. Campagna, O. Vassallo, C. Tesauro, P. Fiorani, P. Tagliatesta, F. Oteri, M. Falconi, H.K. Majumder // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2009. – V. 486(2). – P. 103-110.

232. D'yakonov, V.A. Novel hybrid molecules on the basis of steroids and (5Z,9Z)-Tetradeca-5,9-dienoic acid: synthesis, anti-cancer studies and human Topoisomerase I inhibitory activity. anticancer agents / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, R.A. Tuktarova, S.R. Ishmukhametova, M.M. Yunusbaeva, I.R. Ramazanova, U.M. Dzhemilev. // *Med. Chem.* – 2017. – V. 17(8). – P. 1126-1135.

233. Chen, W. S. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene / W.S. Chen, P.Z.Xu, K. Gottlob, M.L.Chen,

T. Shiyanova, I. Roninson, W. Weng // *Genes. Dev.* – 2001. – V. 17. – P. 2203-2208.

234. Chin, Y. R. Akt isoform-specific signaling in breast cancer: uncovering an anti-migratory role for palladin / Y. R. Chin, A. Toker // *Cell. Adh. Migr.* – 2001. – V. 3. – P. 211-214.

235. Seymour, M.L. Correction: Corrigendum: mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases / M.L. Seymour, A. Chaudhury, L. Bajaj, V.V. Bondar, L. Bremner, U. Saleem, // *Nat. Comm.* – 2017. – V. 8. – P. 15793.

236. Brandsma L. *Best Synthetic Methods: Acetylenes, Allenes and Cumulenes.* Academic Press. – 2003. – 502 p.

237. Kuang, J. An efficient synthesis of terminal allenes from terminal 1-alkynes / J. Kuang, S. Ma // *J. Org. Chem.* – 2009. – V. 74. – P. 1763.

238. Zhang, X. Allenes as dipolarophiles in the intramolecular carbene cyclization cycloaddition cascade reaction / X. Zhang, R. Ko, S. Li, R. Miao, P. Chiu // *Synlett.* – 2006. – P. 1197. – P. 1200.

239. Grigg, R. Palladium catalysed tetramolecular queuing cascades of aryl iodides, carbon monoxide, amines and a polymer supported allene / R. Grigg, W. MacLachlan, M. Rasparini // *Chem. Commun.* – 2000. – V. 22. – P. 2241.

240. Gree, T. W. *Protective Groups in Organic Synthesis* / T. W. Green, P. G. M Wuts // Wiley-Interscience, New-York. – 1999. – P. 743.

241. Clavier, H. Highly Selective Cobalt-Mediated [6 + 2] Cycloaddition of Cycloheptatriene and Allenes / H. Clavier, K.L. Jeune, I. Riggi, A. Tenaglia, G. Buono // *J. Org. Lett.* – 2011. – V. 13. – P. 308-311.

242. Титце, Л. *Препаративная органическая химия. Реакции и синтезы в практикуме органической химии и научно-исследовательской лаборатории* / Л.Титце, Т.Айхер. – М.: Мир, 1999. – 235 с.

243. Takahashi, A. Novel supramolecular hydrogen-bonded cholesteric mesogens: liquid crystalline, thermoptical and glass-forming properties / A. Takahashi, V.A. Mallia, N. Tamaoki // *J. Mater. Chem.* – 2003. – V. 13. – P. 1582-1587.