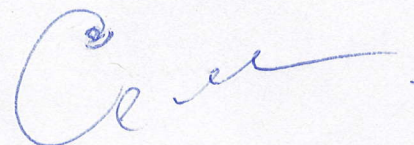


На правах рукописи



Семаков Алексей Владимирович

**МОДИФИКАЦИЯ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ
ПРИРОДНЫМИ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫМИ ЛАКТОНАМИ**

1.4.16. – Медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Черноголовка – 2026

Работа выполнена в лаборатории природных соединений обособленного подразделения Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ИФАВ РАН).

Научный руководитель: Брель Валерий Кузьмич

доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией фосфорорганических соединений
ФГБУН Института элементоорганических соединений
имени А.Н. Несмеянова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Вацадзе Сергей Зурабович

доктор химических наук, профессор РАН,
заведующий лабораторией супрамолекулярной химии
ФГБУН «Институт органической химии
им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук»

Мокров Григорий Владимирович

доктор химических наук,
руководитель Отдела химии лекарственных средств
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических технологий»

Ведущая организация: ФГБУН «Новосибирский институт органической химии имени Н.Н.Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится 09 июня 2026 г. в 13.00 на заседании диссертационного совета 24.1.108.03 при ФГБУН Федеральном исследовательском центре проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д.1, зал заседаний Ученого совета.

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

Автореферат разослан _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.108.03
кандидат биологических наук



Л.В. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Антрациклиновые антибиотики с момента введения в клиническую практику в 70х годах остаются широко используемым классом противоопухолевых препаратов. Данные противоопухолевые агенты и сегодня остаются препаратами первой линии при лечении новообразований самого различного генеза, таких как: различных сарком мягких тканей, раке молочной железы, мелкоклеточном раке легкого, а также бластом, возникших из клеток кроветворной системы. Прошло чуть более 50 лет от открытия антрациклинов как пигментов стрептомицетов до клинических испытаний антрациклинов 3 поколения. Хотя арсенал противоопухолевых антрациклинов природного и синтетического происхождения довольно велик, поиски эффективных противоопухолевых препаратов среди вторичных метаболитов стрептомицетов продолжаются. Исследования направлены не только на получение препаратов, цитотоксичных сами по себе, но и на создание препаратов со сниженной токсичностью и работающих на более широком спектре опухолей. На данный момент основным ограничивающим фактором применения антрациклинов является развиваемая ими кардиотоксичность, что вынуждает клиницистов ограничивать общую кумулятивную дозу антрациклинов. Преодоление кардиотоксичности — приоритетная цель при поиске новых антрациклинов и их лекарственных форм. Другая важная задача на текущий момент — создание препаратов, способных обходить множественную лекарственную устойчивость, что расширит в итоге спектр чувствительных к антрациклинам опухолей. Такие исследования безусловно важны, поскольку позволят в конечном счете избежать ежегодно сотни тысяч смертей от той части онкологических заболеваний, что плохо поддаются химиотерапии.

Степень разработанности темы исследования. С момента открытия антрациклиновых антибиотиков и осознания их полезности как противоопухолевых агентов была проведена большая работа для установления зависимости их структуры от активности. Первоначально изучение антрациклинов было связано с установлением наиболее удачных структурных типов природных антибиотиков с антрахиноновым тетрациклическим агликоном как противоопухолевых агентов. Спустя время было найдено, что разные типы антрациклинов несмотря на структурную схожесть работают по разным механизмам, и оптимальными характеристиками для использования в клинике обладают антрациклина группы даунорубицина (рубимицина Б), куда входят также доксорубицин и карминомицин. За последующие десятилетия большая работа проведена для установления важности отдельных функциональных групп в молекуле антрациклинов для проявления ими противоопухолевой активности и развиваемой токсичности. В Европе такие работы активно проводились группой Ф.Аркамоне, одним из первооткрывателей антрациклинов, а в СССР такие работы проводились под руководством Олсуфьевой и Преображенской в НИИ по изучению антибиотиков. Сейчас акцент в химии антрациклинов почти целиком сместился с внесения новых функциональных групп в агликоновое ядро или сахар на получение конъюгатов по спиртовому, карбонильной или аминогруппе для массово используемых антрациклинов с сохранением неизменной структуры самого антибиотика. Либо вовсе на использование нацеленных форм доставки антрациклинов в опухоль обычно без химической модификации. Огромное количество исследователей используют DAU и DOX просто как иллюстрацию для работоспособности своих моделей наноразмерных форм доставки или работоспособности молекул-векторов для нацеленной доставки лекарств. Тем не менее замечено, что при модификации аминогруппы аминсахара антрациклинов через образование на ее месте

амидов или уретанов получают неактивные соединения, кроме случаев, когда такие соединения распадаются в клетке и выступают в роли пролекарств, а для многих N-алкильных производных характерно сохранение в той или иной мере цитотоксической активности.

Цель данной работы – синтез высокоактивных производных антрациклиновых антибиотиков с потенциально сниженным, по сравнению с исходными антрациклиновыми антибиотиками, кардиотоксическим действием. Для достижения этой цели был выбран подход, основанный на получении алкилированных аналогов антрациклинов по аминогруппе даунозаминного фрагмента через реакцию присоединения аза-Михаэля с сесквитерпеновыми лактонами природного или полусинтетического происхождения.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

- 1) Поиск доступных растительных источников с большим содержанием сесквитерпеновых лактонов и выделение стартовых сесквитерпеновых лактонов из этих источников;
- 2) Расширение набора сесквитерпеновых источников как строительных блоков для реакции аза-Михаэля путем химической модификации имеющихся сесквитерпеновых лактонов;
- 3) Синтез конъюгатов даунорубицина с полученной библиотекой сесквитерпеновых лактонов, а также синтез amino-конъюгатов других антрациклинов (доксорубицина и 5-имино-даунорубицина) с СЛ;
- 4) Установление цитотоксической активности *in vitro* полученных модифицированных конъюгатов антрациклинов на клеточных культурах опухолевых линий.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые были синтезированы гибридные молекулы, соединяющие в себе фрагмент молекулы даунорубицина и сесквитерпеновых лактонов со структурными типами эвдесманолидов, гваянолидов, эремофианолидов, гемакранолидов. Впервые показана возможность использования сесквитерпеновых лактонов для модификации антрациклинов напрямую как строительных блоков в реакции аза-Михаэля. Впервые получена серия N-алкильных производных доксорубицина и 5-имино-даунорубицина с алкильными заместителями из сесквитерпеновых лактонов. Большая работа проведена по исследованию возможностей применения лактонов девясила, алантолактона и изоалантолактона, как материала для синтеза других соединений-лактонов с разным строением углеродного скелета и несущих разные функциональные группы. Ее применимость выходит за границы данной работы, заключённой в модификации антрациклиновых антибиотиков, эти подходы могут быть использованы для создания библиотек лактонов способных к реакции Михаэля как с целью использования их как относительно небольших строительных блоков в комбинаторной химии, так и для поиска селективных ковалентных ингибиторов широкого круга ферментов (гликолиза, NF- κ B, ферментов сигнальных каскадов) и в перспективе создания на их основе лекарств при использовании их как самостоятельных агентов. В работе собраны методы выделения сесквитерпеновых лактонов в препаративных количествах из коммерчески доступного растительного сырья, а также из растений который каждый исследователь может вырастить в условиях средней полосы России. Синтетические находки в области миграции двойной связи в алкенах могут быть применимы и более широкому количеству субстратов в органическом синтезе чем СЛ. С первого взгляда несложная реакция алкенов с синглетным кислородом не так проста в реализации на практике, особенно в случае в “темновом” варианте, в препаративных масштабах. На примере синтеза артемизитена, включающий этап

взаимодействия алкена с синглетным кислородом, подобраны условия условия где подобный синтез протекает быстро и с высокими выходами, что может быть интересно широкому кругу химиков. Скрининг полученных производных на линиях раковых клеток карциномы легкого A549, рабдомиосаркомы RD, карциномы толстого кишечника HCT116 и аденокарциномы молочной железы MCF7 позволил отобрать 2 соединения-лидера (конъюгаты DAU с эпоксиизо-алантолактоном и дегидрокостус-лактоном), существенно превосходящих исходный даунорубицин по антипролиферативному действию и обладающих низкими значениями острой токсичности. Данные соединения уже проходят исследования на более глубокую биологическую активность, в том числе и на развитие антрациклин-индуцированной кардиомиопатии *in vivo*, что выходит за рамки данной работы.

Положения выносимые на защиту:

- Способы препаративного извлечения лактонов корней девясила. Практичнее проводить выделение этих лактонов по отдельности, с целью получить либо алантолактон, либо изоалантолактон.
- Способы выделения лактонов костуса (горькуши лопуховидной), способ отделения липофильных лактонов от липидов.
- Способность алантолактона к реакциям галоген-перелактонизации с сохранением углеродного скелета или нет.
- Подобранные условия препаративной реакции алкенов с синглетным кислородом на примере синтеза артемизитена из артемизинина.
- Синтез серии *N*-замещенных аналогов даунорубицина через реакцию присоединения сесвитерпеновых лактонов природного или полусинтетического происхождения.
- Синтез *N*-замещенных аналогов доксорубицина и 5-ID через реакцию присоединения сесвитерпеновых лактонов природного или полусинтетического происхождения.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: VIII Молодежная конференция ИОХ РАН, (Москва, Россия, 22-23 мая 2019 г.), XII Всероссийская научная конференция с международным участием и школой молодых ученых Химия и технология растительных веществ (Киров, Россия, 29 ноября – 02 декабря 2022 г.), VII Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 21–23 декабря 2022 г.), V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 16–19 декабря 2019 г.), VI Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 21–23 декабря 2021 г.), 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» (Волгоград, Россия, 16–19 мая, 2022 г.), 4-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2019» (Екатеринбург, Россия, 9-14 июня 2019 г.), Весенняя школа-конференция ХимРар по медицинской химии МедХимРар-21 (Химки, Россия, 29–30 марта 2021 г.), X Всероссийская научная конференция и школа молодых ученых “Химия и технология растительных веществ” (Казань, Россия, 5-9 июня 2017 г.), Международная научно-практическая конференция “Достижения и перспективы развития фитохимии” (Караганда, Казахстан, 10-11 апреля 2015 г.), а также ежегодных конференциях молодых ученых ИФАВ РАН (Черноголовка, 2015-2022 г.)

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Основное содержание работы опубликовано в 14 статьях в отечественных и иностранных научных

журналах, рекомендованных ВАК, 1 статье в научном журнале, входящем в список РИНЦ и в 27 тезисах в сборниках докладов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. В первой главе (литературный обзор) обобщены имеющиеся в литературе данные по механизму антрациклиновой кардиотоксичности, существующим подходам модификации структуры антрациклиновых антибиотиков. Во второй главе приведены методики получения стартовых сесквитерпеновых лактонов из природных источников и пути их модификации и обсуждаются данные, полученные нами при непосредственном синтезе производных антрациклинов, показаны результаты первичного скрининга соединений на цитотоксическую активность. В третьей главе (экспериментальная часть) подробно описаны методики проведения экспериментов по получению как исходных лактонов, так и самих производных антрациклинов. Работа изложена на 231 стр., включает 80 рисунков и 15 таблиц. Список цитируемой литературы состоит из 426 наименований.

Плановый характер работы и благодарности. Диссертационная работа выполнена в лаборатории природных соединений Института физиологически активных веществ ФИЦ Проблем химической физики и медицинской химии РАН. Исследования по теме диссертации выполнены в рамках государственного задания ФИЦ ПХФ и МХ РАН (FFSN-2021-0013, “Природные биологически активные вещества и их аналоги”) и поддержаны грантами РФФИ 18-33-00567 мол_а. «Синтез активируемых в опухолевых клетках пролекарств на основе сесквитерпеновых лактонов», руководитель Семаков А.В., 2018-2019 гг., РФФИ 18-33-20209 мол_а_вед. «Синтез и изучение фундаментальных механизмов противоопухолевого действия рационально спланированных гибридных соединений на основе уникальных природных матриц», руководитель Неганова М.Е., 2018-2019 гг., РФФИ 18-03-00757 А. «Молекулярный дизайн мультитаргетных нейропротекторных соединений на основе природных скаффолдов», руководитель Клочков С.Г., 2018-2020 гг., РФФИ 16-03-00674 А. «Синтез новых оригинальных антинеопластов функционализацией природных сесквитерпеновых лактонов», руководитель Афанасьева С.В., 2016-2018 гг., РФФИ, 19-73-00343, Новые антинеопласты на основе антрациклиновых антибиотиков и сесквитерпеновых лактонов, 2019-2021., РФФИ, 23-23-00575, «Карбонильные производные артемизинина – строительные блоки в синтезе новых биологически активных конъюгатов с аминами», руководитель Пухов С.А., 2023-2024.

Личный вклад автора заключается в планировании и выполнении экспериментальной работы, поиске и систематизации литературы, написании литературного обзора, описании спектров полученных соединений, выращивании растений-источников СЛ, поиске поставщиков и закупке реагентов и принадлежностей необходимых для выполнения работы. Первоначальная идея диссертационной работы в виде модификации антрациклиновых антибиотиков СЛ по аминогруппе сформулирована научным руководителем Клочковым С.Г.. Вся синтетическая часть (модификации антрациклинов и химические трансформации сесквитерпеновых лактонов) выполнена автором лично, очистка полученных веществ, также как и вся часть, связанная с выделением лактонов из растительных источников. Оформление результатов в виде научных публикаций и докладов проведены автором лично, либо при непосредственном участии автора.

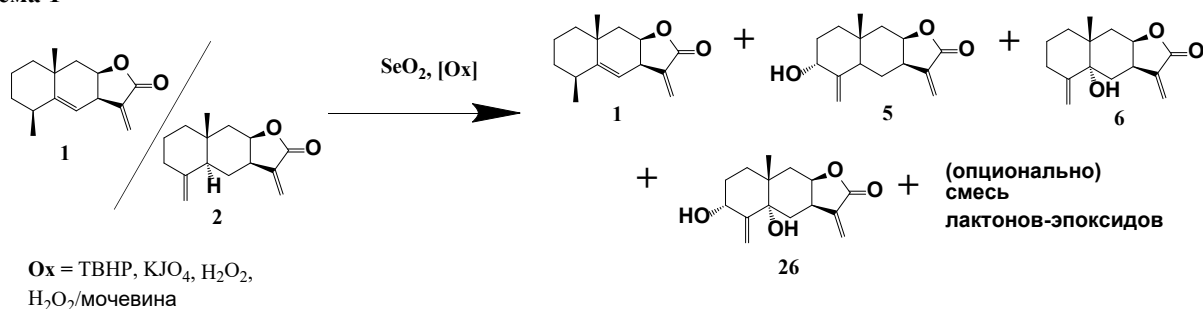
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Часть 1. Получение стартовых лактонов

Сесквитерпеновые лактоны (СЛ) относятся к тем группам веществ, для которых уже известно о существовании большого количества представителей, выделенных из природных источников. Однако, несмотря на разнообразие известных структур, зачастую они являются минорными метаболитами растений. В этих случаях описанные выходы СЛ составляют порядка нескольких мг на кг сухого сырья, а значит такие источники СЛ мало подходят для их дальнейшего использования как субстратов в дальнейших синтезах. Альтернативой для получения СЛ служат многоступенчатые полные синтезы этих молекул, но хотя такие случаи и известны, каждый тоже представлял собой долгую и очень затратную работу и сопровождался в итоге малыми выходами. Вместо этих двух крайностей оптимальным решением для получения разнообразных соединений этого класса видится химическая модификация тех лактонов, которые накапливаются в растениях в значительных концентрациях и могут быть выделены в препаративных количествах. Поэтому в работе был сделан упор на те растительные источники с высоким содержанием СЛ в сухом сырье, которые либо доступны коммерчески (корни девясила высокого *Inula helenium L.*, корни горькуши лопуховидной *Saussurea lappa Decne.* в сухом виде или в виде CO₂ сверхкритического экстракта), либо были выращены собственными силами (соцветия пижмы девичьей *Tanacetum parthenium L.*, листья василька крупноголовчатого *Centaurea macrocephala Muss.-Puschk. ex Willd.* и другие).

Корневища девясила высокого содержат два вещества из класса сесквитерпеновых лактонов в довольно больших количествах – алантолактон (**1**) и изоалантолактон (**2**). Каждый содержится в концентрации порядка 2% от сухой массы корневищ. Это, учитывая коммерческую доступность и невысокую цену, делает корни девясила многообещающим кандидатом для выделения этих двух лактонов. Однако, на практике при попытке препаративного выделения индивидуальных лактонов девясила возникают значительные затруднения. Это связано в первую очередь с тем, что оба основных лактона **1** и **2** девясила имеют почти идентичные свойства, что сильно затрудняет их разделение. Найдено, что алантолактон практичнее всего отделять от изоалантолактона в обогащенном экстракте корней девясила путем окисления их смеси при действии диоксида селена с соокислителем. В этих условиях весь изоалантолактон быстро окисляется в аллильный спирт **5**, в то время как алантолактон остается интактным и уже легко отделяется на колонке с силикагелем. Как побочные продукты при этом помимо изотелекина **5** получают также полярные лактоны телекин **6** и диол **26**.

Схема 1



Изоалантолактон же удобнее получать через промежуточную реакцию образования аминоконъюгатов смеси лактонов с морфолином. В зависимости от исходной чистоты

лактонов можно селективно кристаллизовать из смеси почти весь аминоконъюгат только с изоалантолактоном, после чего несложно регенерировать исходный лактон **2**. Кроме того подобраны условия для кристаллизации изоалантолактона (**2**) не прибегая к образованию аминоконъюгатов, но это занимает большее время.

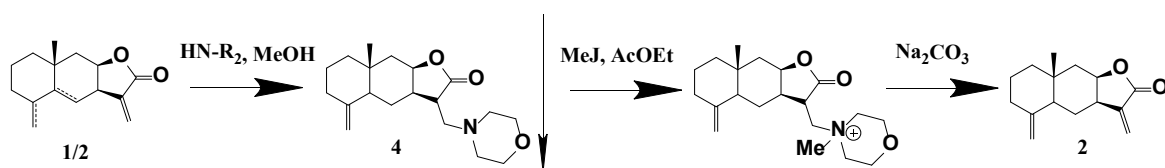
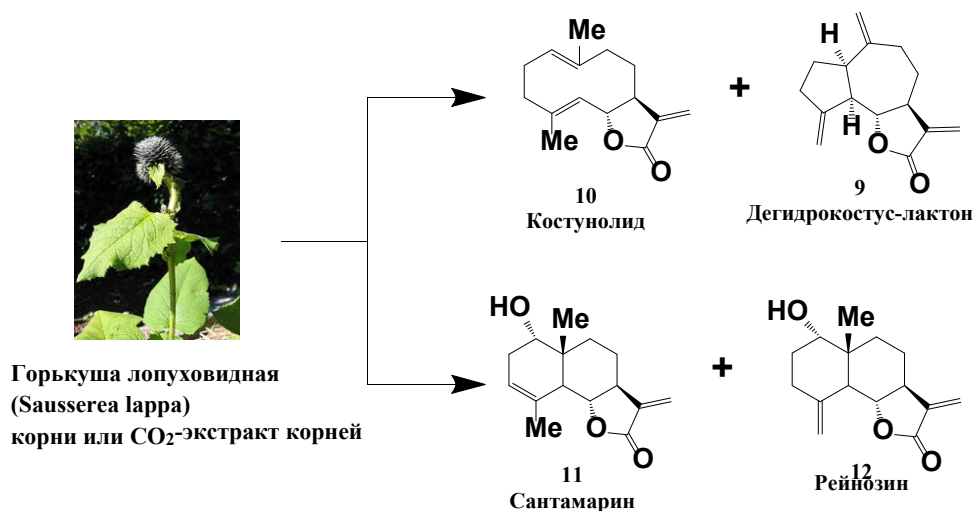


Таблица 1 - Сравнение выходов лактонов девясила в зависимости от метода

Метод	Выход лактонов (% от сухой массы корней)	
	Алантолактон	Изоалантолактон
А. Кристаллизация из водного метанола	-	0,77
Б. Хроматография на силикагеле с импрегнированным нитратом серебра	1,66	-
В. Кристаллизация аддуктов с диметиламином	-	1,31
Г. Кристаллизация аддуктов с морфолином	-	1,38
Д. Окисление смеси лактонов диоксидом селена и перекисью водорода	1,13	-
Е. Окисление смеси лактонов диоксидом селена и т-бутил гидропероксидом	1,70	-
Ж. Окисление смеси лактонов диоксидом селена и периодатом калия	1,71	-

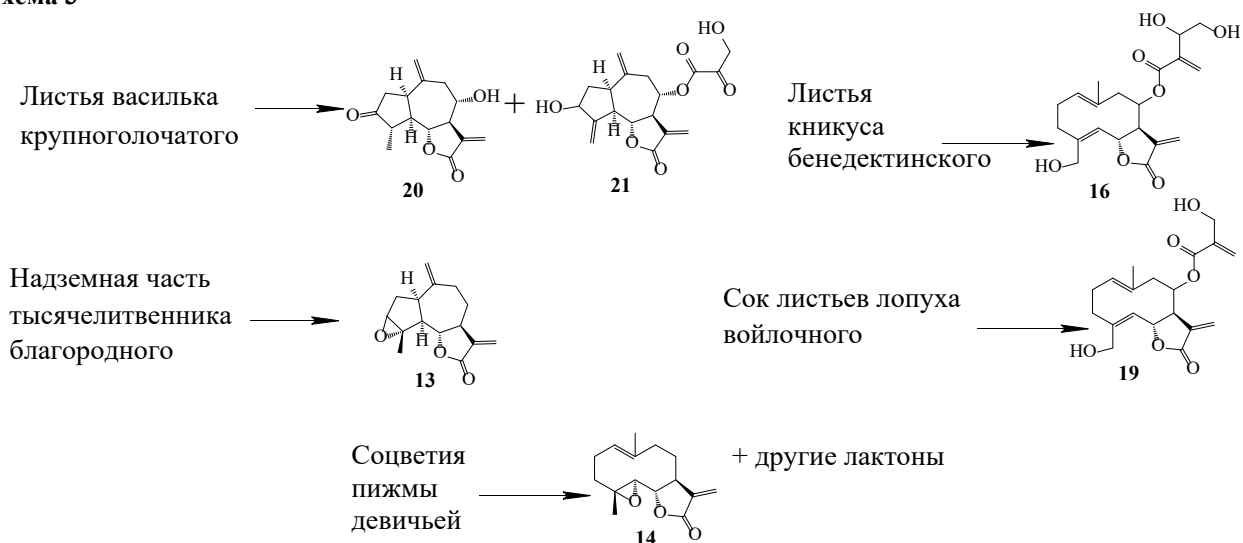
Другим удобным препаративным источником СЛ являются корни и корни костуса (горькуша лопуховидная, *Saussurea lappa* (Decne.) C.B. Clarke). Основными лактонами корней костуса являются костунолид (**10**) и дегидрокостус-лактон (**9**). В качестве источника для выделения лактонов костунолида и дегидрокостус-лактона использовали CO₂ сверхкритический экстракт корней костуса. Он примерно на 25 % состоял из смеси СЛ и на 75% из триглицеридов, для удаления последних, СЛ из экстракта несколько раз извлекали горячим водным ацетонитрилом и очищали фильтрованием через силикагель. Дегидрокостус-лактон и костунолид разделяли на колонке с импрегнированным нитратом серебра. Более

Схема 2



быстрый способ разделения липидов и липофильных лактонов костуса состоит в разбавлении экстракта двумя несмешивающимися растворителями – гексаном и ацетонитрилом. При этом липиды сразу переходят в гексановый слой, а СЛ остаются в ацетонитриле. Положительным моментом является также коагуляция и выпадение имеющихся в экстракте взвесей. В меньших количествах из экстракта были выделены минорные лактоны горькуши лопуховидной – сантамарин (11) и рейнозин (12), которые также отделяли друг от друга на колонке с импрегнированным нитратом серебра. Другим источником костунолида (10) и дегидрокостус-лактона (9) были непосредственно сами измельченные корни костуса из нескольких коммерческих источников. Колоночная хроматография одного из них после экстракции и предварительном выделении лактонной фракции на силикагеле дала выходы фракции содержащей смесь костунолида (10) и дегидрокостус-лактона (9) с выходами 3,22% и 1,99% от сухой массы. Костус из этого источника затем был использован для препаративного извлечения лактонов костуса.

Схема 3



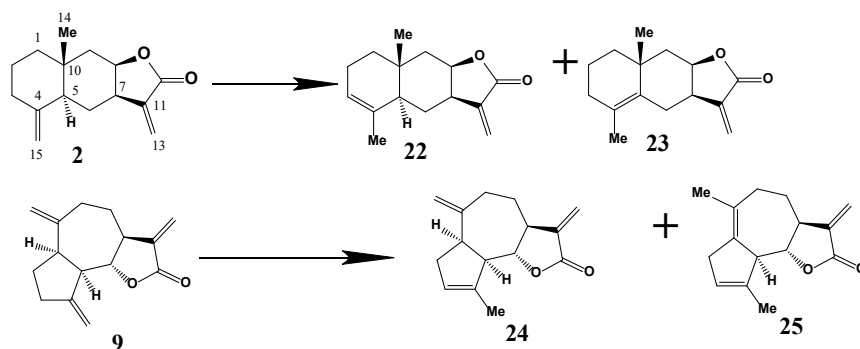
Прочие использованные природные СЛ были выделены из сухого растительного сырья. Для этого на основе известных методик нами был найден оптимальный способ получения лактонной фракции. Он состоит в следующем: высушенные измельченные части растения экстрагировали хлороформом, упаривали, растворяли в горячем метаноле и небольшими порциями при взбалтывании добавляли насыщенный раствор ацетата свинца (20% по объему), оставляли остывать в течение ночи. Жидкую часть декантировали с осадка пигментов, кислот и полифенольных соединений, промывали петролейным эфиром от высоколипофильных примесей, отгоняли метанол из водно-метанольной части при пониженном давлении, разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Из обогащенной лактонной фракции индивидуальные лактоны выделяли препаративной колоночной хроматографией. Таким способом из соцветий пижмы девичьей (*Tanacetum parthenium* L.) был выделен гермакрановый СЛ партенолид (14) с выходом 0,78%, из листьев василька крупноголочатого (гроссгемиа крупноголочатая, *Centaurea macrocephala* Muss.-Puschk. ex Willd.) – гваянолиды гроссгемин (20) с выходом 0,63% и цинаропикрин (21) с выходом 1,18%, из листьев кникуса бенедектинского (волчец кудрявый, *Cnicus benedictus* L.) – гермакранолид кницин (16) с выходом 1,14% от массы сухого сырья, из надземной части тысячелистника благородного (*Achillea nobilis* L.) – гваянолид эстафиатин (13).

Из сока свежих листьев лопуха войлочного (*Arctium tomentosum L.*), широко распространённого в умеренном климате растения, впервые был выделен гермакрановый лактон онопордопикрин (**19**). Он идентифицирован как основной сесквитерпеновый лактон листьев данного вида лопуха. Относительно высокое содержание в соке листьев наряду с доступностью сырья позволяют использовать лопух войлочный как источник онопордопикрина для синтеза других сесквитерпеновых лактонов в препаративных количествах.

Часть 2. Химическая модификация сесквитерпеновых лактонов

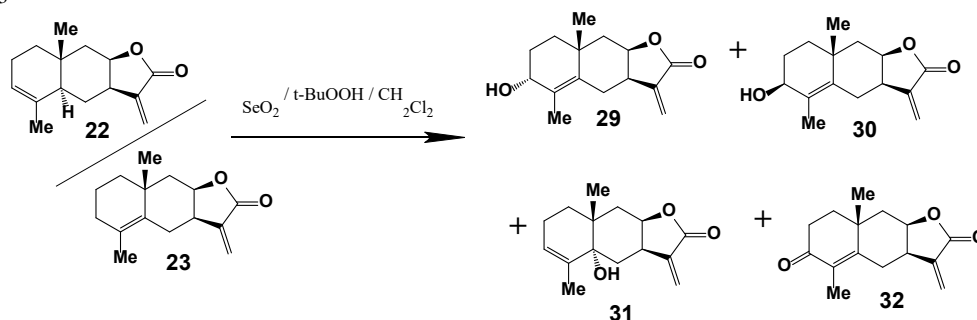
Расшить количество возможных строительных блоков для реакции аза-Михаэля с даунорубицином возможно если использовать помимо природных сесквитерпеновых лактонов их полусинтетические аналоги. Трифторуксусная кислота приводит к миграции Δ^{4-14} двойной связи у изоалантолактона **2** из экзо- в эндо-положение Δ^4 с образованием аллоалантолактона **23**. Протестированы разные условия (серная кислота, хлорная кислота, муравьиная кислота, микроволновое облучение сорбированного на различных носителях) теоретически ведущие к конверсии изоалантолактона **2** в синтетически менее доступный его изомер **22** с двойной связью в положении Δ^3 . В отличие от других методов кипячение изоалантолактона **2** с йодом ведет к быстрой конверсии с преимущественным образованием лактона изомера **22**.

Схема 4



Дегидрокостус-лактон (**9**) из природного источника также имеет в составе молекулы двойные экзометиленовые связи способные к миграции в эндо-положение в количестве двух штук. Оптимальным агентом для изомеризации дегидрокостус-лактона (**9**) также является молекулярный йод. Теоретически при это может получиться 8 разных изомеров., однако на практике получены два его изомера, которые были идентифицированы как изо-дегидрокостус-лактон (**24**) и кауниолид (**25**).

Схема 5

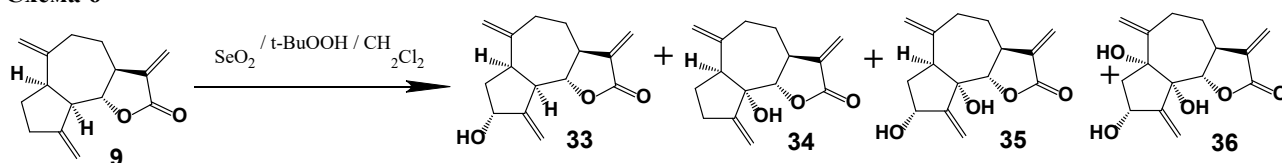


Получены продукты аллильного окисления полученных изомеров изоалантолактона по положению двойной связи **22** и **23**. Поскольку делить хроматографически на силикагеле изомеры по положению спиртовой группы проще чем по положению двойной связи, то проще

не разделять каждый раз продукты изомеризации изоалантолактона, а окислять их смесь. В итоге были получены аллильные спирты **29**, **30** и **31**, а также енон **32** как продукт самопроизвольно окисления аллильного спирта **30**.

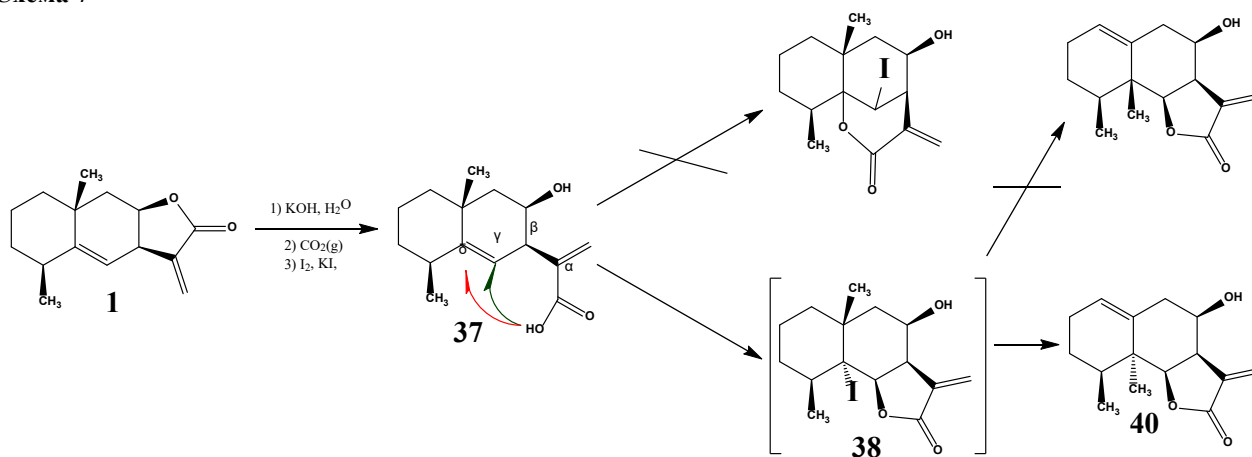
Аналогично, аллильным окислением через действие диоксида селена в присутствии *t*-BuOOH, были получены аналоги дегидрокостус лактона **33-36** с одной или двумя дополнительными спиртовыми группами. Стоит заметить, что СЛ с дополнительной двойной связью в *экзо*-положении легко вступают в реакцию с диоксидом селена (время реакции <1 ч до полной конверсии), в то время как СЛ дополнительной двойной связью, но уже в *эндо*-положении, гораздо менее активны (время реакции > 7д) в реакции окисления селеном или вовсе не активны.

Схема 6



Алантолактон имеет одну структурную особенность, которую можно использовать для целой группы синтетических превращений. При гидролизе в щелочных условиях алантолактон при нагревании гидролизуется с размыканием лактонного цикла до алантовой кислоты (нем. “*Alantsaure*”, **37**). Она содержит двойную связь в γ -положении от карбоксильной группы и, следовательно, от него можно ожидать, что он будет вступать в реакции галоген-лактонизации с образованием нового пятичленного лактонного цикла. Однако, при попытке провести йодлактонизацию вместо ожидаемого йодлактона, сохраняющего эвдесмановый скелет, как основной продукт реакции был выделен эремофиланолид строения **40**. Ранее сообщалось о похожей перегруппировке эпоксиалантолактона под действием муравьиной или щавелевой кислот, однако перегруппировка в эремофиланолиды не из эпоксидов описана впервые.

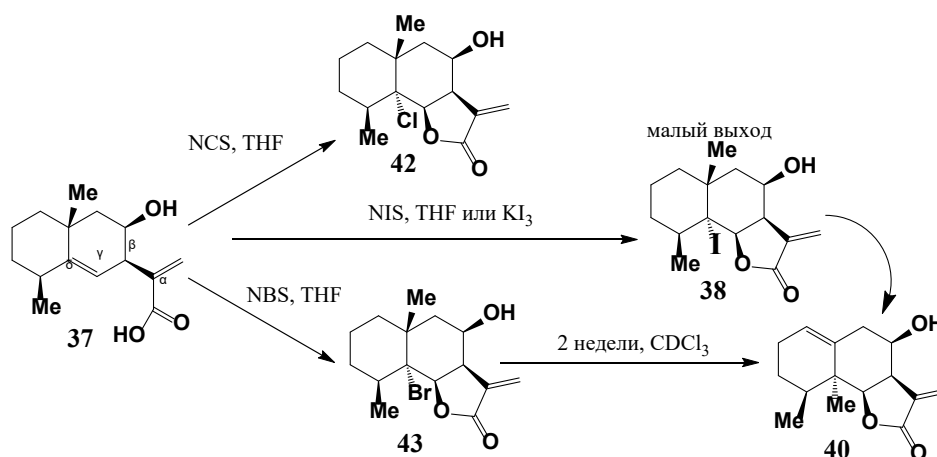
Схема 7



Другие формы галоген-лактонизации алантовой кислоты **37** дали более предсказуемый вариант. Хлорлактонизация проводилась при действии NCS как источника хлороний-иона. Лучше всего себя показали условия проведения хлорлактонизации в среде ТГФ с небольшой добавкой уксусной кислоты и разделкой реакции промыванием раствором NaHCO_3 . В таком варианте продукт хлорлактон **42** получался с количественным выходом. Бромлактонизацию проводили в аналогичных условиях с применением NBS. Прочие условия бромлактонизации

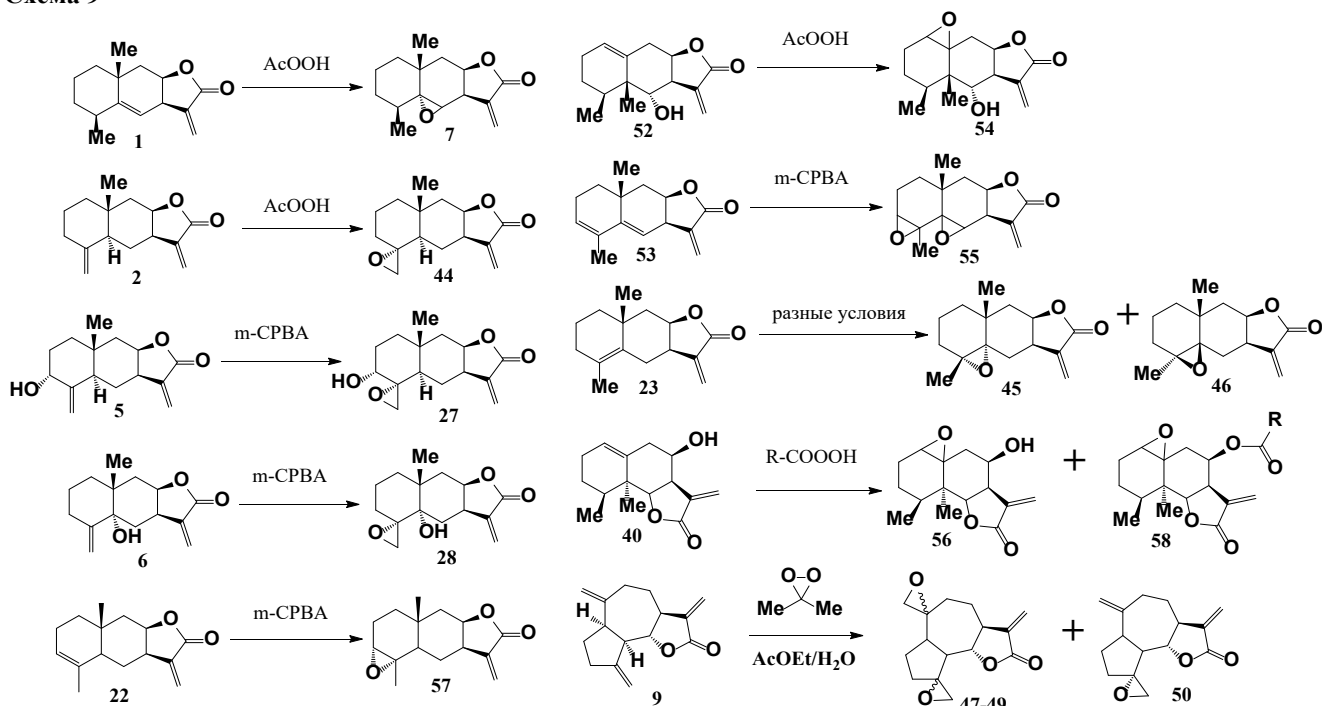
(с использованием брома, генерацией брома *in situ* из бромида, NBS в других растворителях) приводили к сложной смеси продуктов реакции и низким выходом бромлактона **43**. При длительном хранении на воздухе или в среде дейтерированного хлороформа бромлактон **43** частично самопроизвольно разлагается с образованием **40**, того же вещества что получается при лактонизации под действием йода. Поэтому далее для синтеза конъюгатов с даунорубицином его не использовали. Хлорлактон **42** более стабилен. Аналогичный йодлактон **38** получался при действии NIS или при медленном добавлении KI₃ получался со слишком низкими выходами и также был недостаточно стабилен.

Схема 8



Для полученных СЛ получены имеющих в своем строении дополнительную (не лактонную) двойную связь были синтезированы через реакцию эпоксицирования соответствующие им эпоксиды (Схема 9). В качестве эпоксицирующих агентов использовали надуксусную кислоту или *m*-CPBA. Как правило в реакции образовывался только один продукт эпоксицирования соответствующего лактона. Однако, аллоалантолактон (**23**) при эпоксицировании всегда давал два изомера **45** и **46** неразделимых хроматографически.

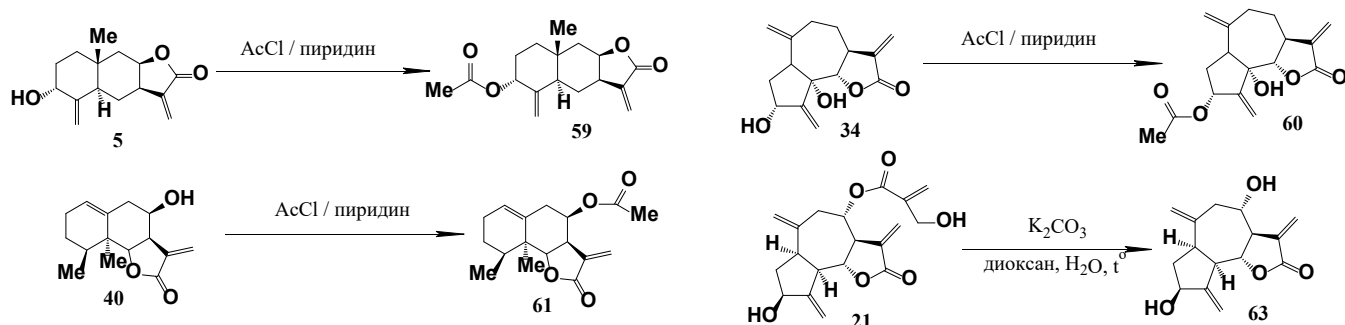
Схема 9



Варьирование условий вело только к разным соотношениям продуктов **45** и **46**. При эпоксирировании лактона-продукта йодлактонизации **40**, кроме непосредственного продукта эпоксирирования **56** также обнаруживались продукты ацилирования по спиртовой группе по типу **58**. Эпоксирирование дегидрокостус-лактона (**9**) действием надкислот оказалось сложно-контролируемым процессом из-за сниженной стабильности продуктов реакции, диэпоксидов **47-49** и моноэпоксида **50**, в этих условиях. Более приемлемые выходы удалось достичь при замене эпоксирирующего агента на диметил-диоксиран в двухфазной среде.

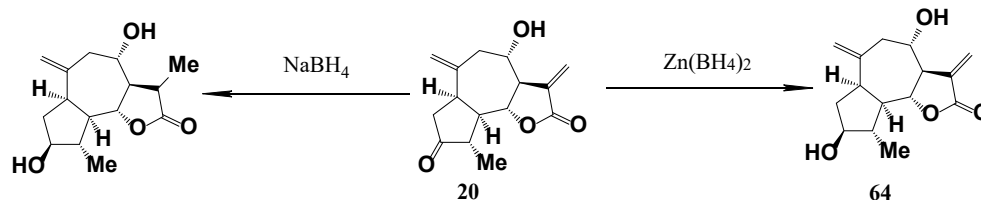
Из лактонов, несущих спиртовую группу, достаточно открытую для возможности ацилирования, были получены соответствующие сложные эфиры через реакцию с уксусным ангидридом в среде пиридина. При этом лактон изотелекин (**5**) был ацилирован до ацетил-изотелекина (**59**), а лактон-продукт йодлактонизации **40** был ацилирован до лактона **61** (Схема 10). В диоле **34** только одна из двух гидроксильных групп подвергалась ацилированию. В итоге ацилирование диола **34** приводило к моноацилированному лактону **60**. Лактон цинаропикрин (**21**), выделенный из листьев артишока равно как и из листьев гроссгемии, наоборот содержал нежелательный ацильный фрагмент наличие которого ведет к нежелательным побочным реакциям при дальнейшем использовании лактона для синтеза конъюгатов аза-Михаэля с антрациклинами. Основным гидролизом из него был получен лактон дезацил-цинаропикрин **63**.

Схема 10



Гроссгемиин (**20**), второй лактон листьев гроссгемии, по структуре близок к полученному дезацил-цинаропикрину (**63**). Селективным восстановлением при действии боргидрида цинка $Zn(BH_4)_2$ кетогруппа в гроссгемиине была восстановлена до спиртовой с сохранением активной экзометиленовой группы при лактонном цикле, что дало лактон гроссгейминол (**64**). Использование обычных условий восстановления при действии $NaBH_4$ ведет к утрате этой активной группы.

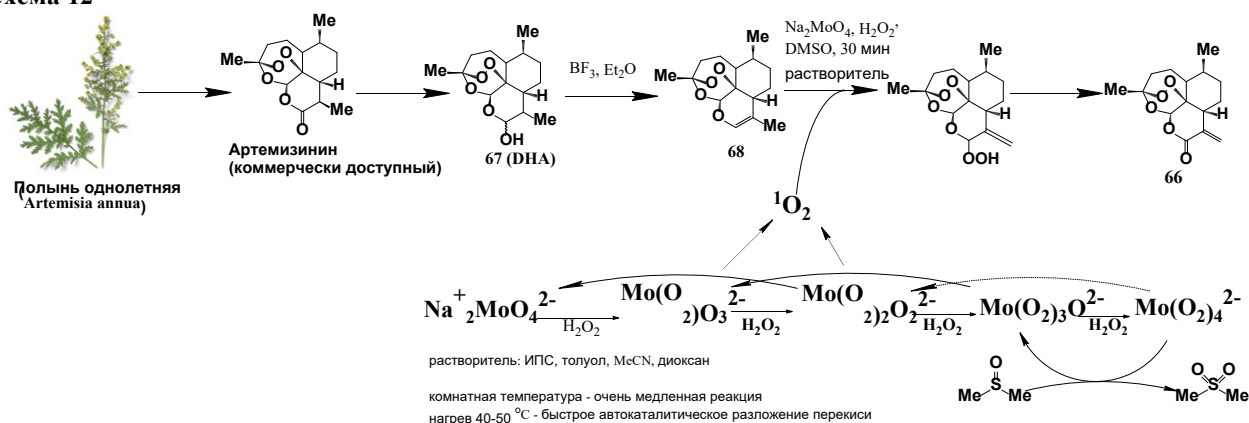
Схема 11



Артемизинин является коммерчески доступным СЛ, однако не имеет экзометиленовой группы при лактонном цикле и не способен вступать в реакции присоединения аза-Михаэля. Его аналог с экзометиленовой группой вместо метильной, СЛ артемизитен (**66**), может быть синтезирован из дигидроартемизинина (ДНА, **67**) на основе известных методик через дегидрирование ДНА с образованием ангидро-ДНА (**68**), который при действии синглетного кислорода дает гидропероксид (Схема 12). Последний при действии уксусного ангидрида в

пиридине образует нужный лактон **66**. Узким местом данной схемы синтеза является стадия фотокиснирования. Ее реализация в мультиграммовых масштабах требует длительного времени. “Темновой” вариант этой реакции фотокиснирования с образованием синглетного кислорода через каталитическое разложение перекиси водорода Na_2MoO_4 оказался более подходящим для масштабирования. Были испытаны варианты этой реакции с разными условиями. Добавка в реакционную смесь кокатализатора ДМСО или нитрата лантана, ускоряет разложение перокси-молибдатов, сокращая время реакции и образование побочных продуктов. Подобраны оптимальные способ добавления перекиси, температура и тип детергента. На выход требуемого продукта большое влияние оказывал тип используемого растворителя, среди них лучше всего себя показал диоксан.

Схема 12



Часть 3. Синтез конъюгатов сесквитерпеновых лактонов с антрациклинами

Ранее было описано наблюдение проявления антиоксидантных свойств конъюгатов Михаэля СЛ и аминов часто *in vitro*, в то время как исходные реагенты, лактон и амин, такими свойствами не обладают. В данной работе была выдвинута гипотеза, что введение подобного типа группы в виде сшивки “лактон-амин” в молекулу антрациклина (Рис.1) также будет снижать поражающее действие АФК и от таких производных можно ожидать меньшей АФК-индуцированной кардиотоксичности. Более того, предшествующие исследования показали, что введение в аминсахарный фрагмент молекулы антрациклина *N*-алкильных заместителей таких как *N*-бензил или *N*-метил группы может привести к некоторым положительным эффектам без потери цитотоксической активности. Этот подход давал путь к возможности разделения кардиотоксичности от цитотоксических свойств в ряду антрациклинов, а также

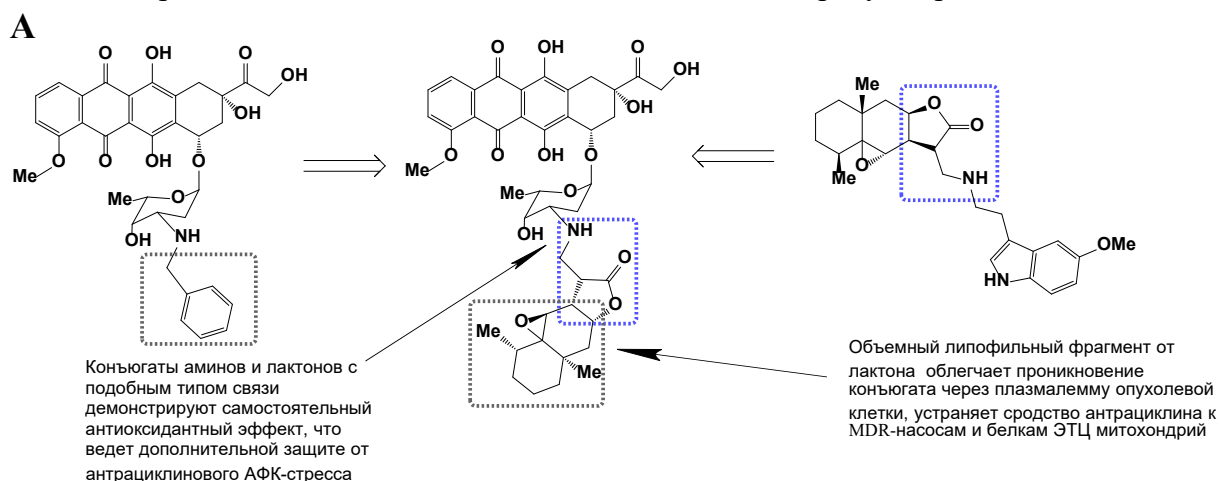
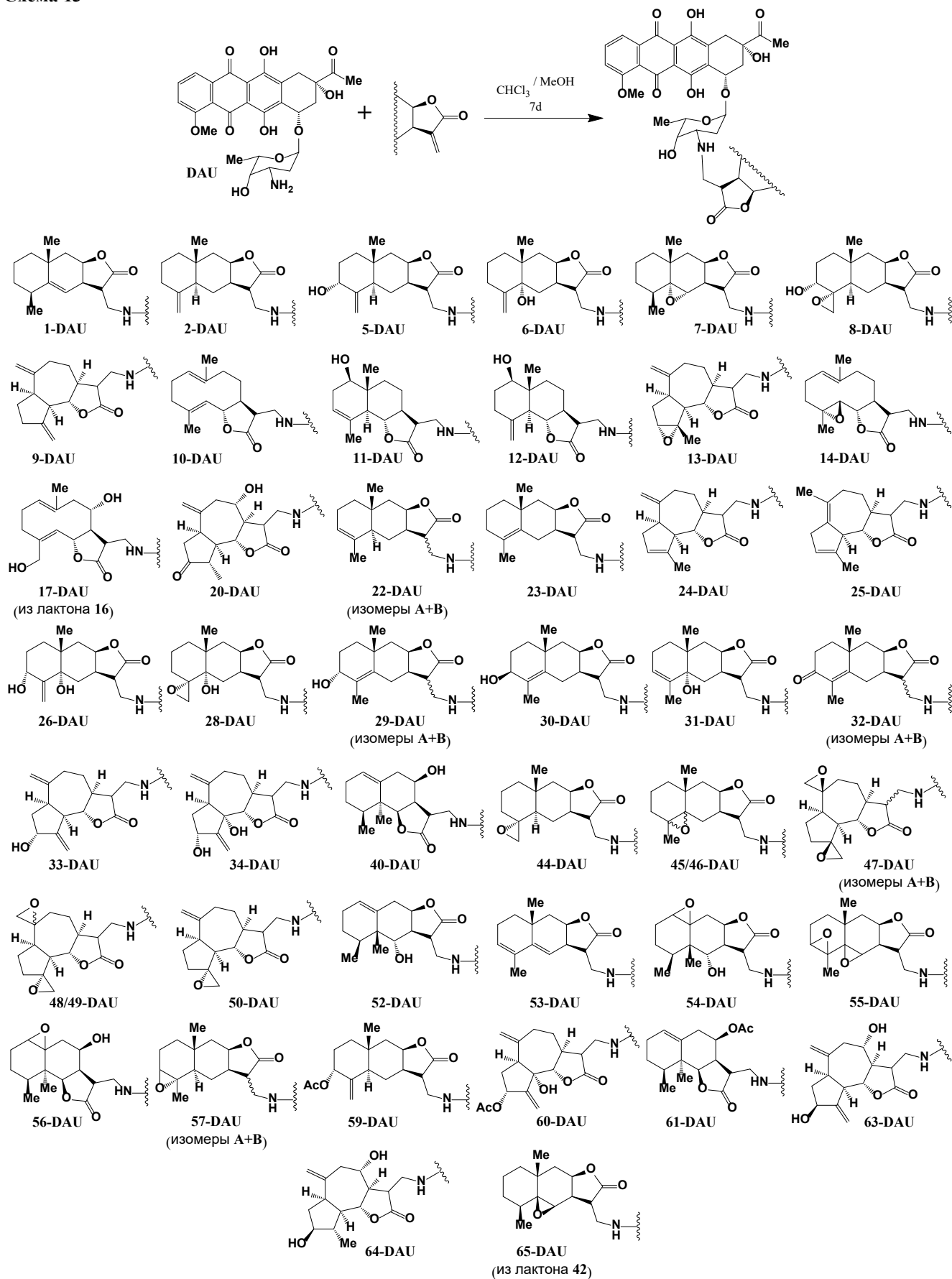


Рисунок 1 План строения *N*-алкильных конъюгатов лактонов и антрациклинов

влияло и на другие виды их активностей такие как способность выступать субстратами MDR-насосов, способность ингибировать топоизомеразы II α/β , образованию разрывов ДНК или

Схема 13



способность к повреждению хроматина. Здесь же, в предлагаемом типе конъюгатов антрациклинов оставшаяся липофильная часть молекулы СЛ может имитировать *N*-бензильный остаток, который присутствует в тех *N*-алкильных производных антрациклинов, где известны случаи сниженной кардиотоксичности. Всего этого можно достичь если провести реакцию аза-Михаэля напрямую между СЛ как акцептором, имеющим электрон-дефицитный алкен в составе и аминогруппой в антрациклиновом антибиотике как нуклеофилом.

Проведена модификация антрациклинового антибиотика даунорубицина сесквитерпеновыми лактонами *Inula helenium* L. - алантолактоном, изоалантолактоном и аллоалантолактоном, а также прочими лактонами, полученными из природных и полусинтетических источников. Таким образом была синтезирована серия конъюгатов Михаэля (**1-DAU** – **65-DAU**) DAU с полученными на предыдущем этапе сесквитерпеновыми лактонами (Схема 13). Перед реакцией даунорубицин переводили в форму амина из его гидрохлорида. Реакцию проводили в среде метанол/хлороформ. В данном случае, при присоединении к антрациклинам, требовалось длительное время реакции, обычно около 7 суток. При использовании антрациклинов как аминов выходы продуктов не были количественными и составляли обычно около 50% от теоретического, но отдельных случаях падали до низких значений. В конъюгатах формируется новый хиральный центр в α -положении лактонного цикла с определенной конфигурацией. Как правило, в продуктах реакции присоединений аза-Михаэля лактона к аминогруппе антрациклина почти полностью преобладал только один оптический изомер. Но в случае некоторых лактонов два возможных изомера образовывались в сопоставимых количествах, тогда очистке подвергали оба изомера. В нескольких случаях непосредственного продукта присоединения лактона к аминогруппе DAU выделить не удалось, в таких случаях, в частности для лактонов книсицина **16**, хлорлактона **42** и артемизитена **66**, в продуктах реакции в лактонной части конъюгата были обнаружены последствия побочных реакций.

Уже первые пробные эксперименты по синтезу аминоконъюгатов DAU с двумя лактонами девясила (алантолактоном и изоалантолактоном) и проверке их цитотоксической активности показали, что активность конъюгатов на нескольких опухолевых линиях довольно высока и близка к активности исходного DAU или превосходит его. Далее, прежде всего для ограниченной серии конъюгатов DAU, полученных при реакции с СЛ девясила и их эпоксидами, было проведено тестирование на предмет цитотоксической активности на расширенной панели адгезивных и суспензионных опухолевых линий человека. Было установлено, что конъюгаты DAU с СЛ изоалантолактоном, алантолактоном и аллоалантолактоном и их эпоксидами обладают большей активностью по отношению к опухолевым линиям клеток человека, чем соответствующие конъюгаты доксорубицина. Для всех протестированных конъюгатов DAU с СЛ обычно характерна цитотоксическая активность сопоставимая с исходным DAU или превышающая ее, иногда на порядок. Обычно IC₅₀ цитотоксичность полученных конъюгатов лежит в районе 1мкМ или в субмикромольных концентрациях, что делает их довольно активными соединениями. Это приводит нас к выводу, что подобная модификация DAU не ведёт к утрате активности, но при этом можно ожидать сниженной кардиотоксичности подобного рода конъюгатов из-за собственной способности конъюгатов СЛ с аминами проявлять антиоксидантные свойства, что было показано в предыдущих работах. Можно ожидать что это будет частично нивелировать поражающий эффект антрациклин-зависимой АФК-генерации в клетках миокарда.

Для прогнозирования токсичности все соединения были протестированы в отношении

нормальных клеточных линий млекопитающих FLECH-T, HEK-293, MDCK-M и NIH/3T3 (Табл.2). В последнем столбце для производных даунорубицина приведен коэффициент избирательности, равный отношению средней IC₅₀ для всех нормальных клеточных линий к средней IC₅₀ для всех опухолевых клеточных линий, некий аналог широты терапевтического действия в опытах *in vivo*. Большая часть конъюгатов не обладает селективной токсичностью по отношению к опухолевым клеточным линиям. Те соединения, которые оказывают высокую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток (**1-DAU**, **45/46-DAU**, **10-DAU**), проявляют высокую цитотоксичность и по отношению к нормальным линиям клеток. Стоит выделить только два конъюгата **44-DAU** и **9-DAU**, которые при цитотоксичности, равной цитотоксичности даунорубицина в отношении большинства опухолевых культур, продемонстрировали меньшую цитотоксичность по отношению к нормальным клеточным линиям, приближенную к DAU. Эти два соединения были признаны нами соединениями-хитами и подвергнуты далее испытаниям на острую токсичность в опытах *in vivo*.

Таблица 2 Цитотоксическая активность серии конъюгатов DAU и СЛ против нормальных клеток

Соединение	IC ₅₀ (мкМ/л)				k=norm/tum (отношение усредненных IC ₅₀ цитотоксичнос ти на разных линиях)
	FLECH-T (эмбриональные фибробласты легкого человека)	HEK-293 (псевдонормальная почка человека)	MDCK-M (псевдонормальная почка собаки)	NIH/3T3 (эмбриональные фибробласты мышь)	
DAU	9,95±0,31	3,60±0,34	0,33±0,13 b	1,15±0,03	4,4
1-DAU	1,24±0,21	3,45±0,21	1,05±0,02	1,12±0,27	1,9
2-DAU	2,78±0,30	2,32±0,04	1,47±0,07	4,47±0,42	1,1
5-DAU	8,11±0,51	1,09±0,10	0,38±0,02	0,31±0,02	1,6
6-DAU	1,59±0,07	1,30±0,05	1,09±0,12	1,53±0,04	1,3
7-DAU	3,35±0,10	9,52±0,10	1,10±0,02	4,14±0,35	2,7
9-DAU	9,55±0,42	0,27±0,05	0,55±0,07	1,79±0,04	3,0
10-DAU	1,48±0,05	0,51±0,00	1,58±0,05	2,19±0,05	1,4
11-DAU	2,86±0,11	0,88±0,08	1,66±0,03	4,42±0,03	2,3
12-DAU	5,74±0,18	3,37±0,04	0,57±0,01	3,13±0,20	2,1
23-DAU	1,32±0,06	6,37±0,24	1,00±0,07	1,61±0,24	2,7
44-DAU	1,61±0,13	11,41±0,53	0,89±0,03	0,46±0,01	3,0
45/46-DAU	2,52±0,05	2,05±0,09	0,61±0,03	0,60±0,02	1,4

Вторая серия конъюгатов DAU с расширенным набором СЛ была испытана на предмет цитотоксической активности на более ограниченной панели клеточных опухолевых линий. Здесь для оценки селективности конъюгатов к опухолевым клеткам в качестве нормальной линии клеток человека была выбрана псевдонормальная линия клеток эмбрионального почечного эпителия человека HEK293. Более наглядно результаты испытаний цитотоксичности конъюгатов даунорубицина можно представить если изобразить их на графике, где данные IC₅₀ отложены по оси ординат, а по оси абсцисс одновременно отложены значения IC₅₀ для псевдонормальной линии (HEK293). Для тех соединений, для которых есть одновременно установленные значения IC₅₀ для пар из одной из опухолевой линий и для HEK293, такой график приведен ниже (Рис.2). В качестве соединений хитов можно ориентироваться на абсолютные или относительные значения IC₅₀. В первом случае тогда стоит выбрать **8-DAU** (SL18-DAU) для линии A549, **11-DAU** (SL72-DAU) для линий RD и

MCF7, **44-DAU** (SL4-DAU) для линии HCT116. Во втором случае предпочтение стоит отдать **44-DAU** (SL4-DAU) для линий A549 и HCT116, **7-DAU** (SL05-DAU) для линий MCF7 и RD, веществу не очень активному, но максимально нетоксичному для псевдонормальной линии. По совокупности характеристик на графике стоит также выделить конъюгаты с рейнозином (**12-DAU**, SL73-DAU), гроссгеминном (**20-DAU**, SL69-DAU) и алантолактоном (**1-DAU**, SL2-DAU).

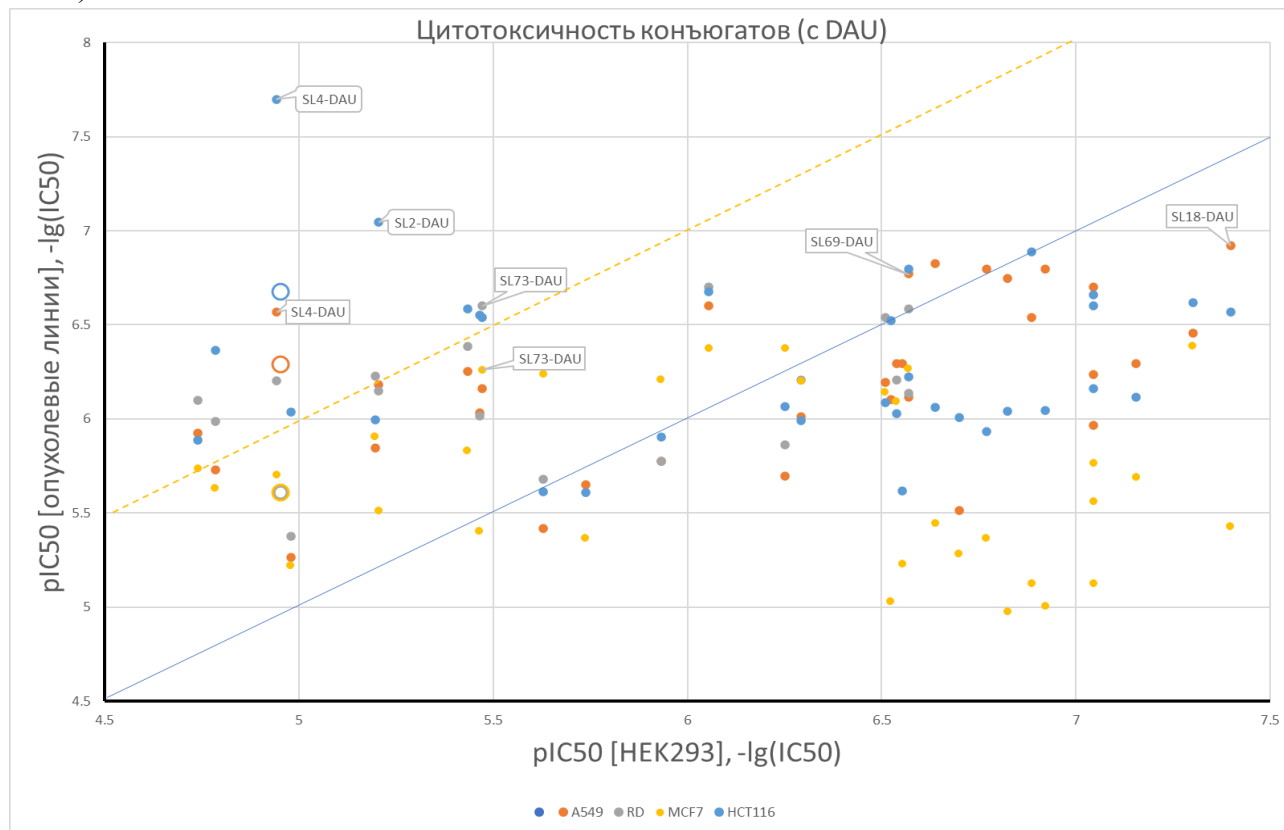


Рисунок 2 Диаграмма сравнения цитотоксичности конъюгатов DAU с сесквитерпеновыми лактонами. Полыми кружками обозначены значения для исходного DAU.

Для проверки возможности конъюгатов DAU к сохранению основного механизма действия исходного антибиотика вызывать подавление синтеза ДНК и затем гибель опухолевых клеток было проведено исследование по оценке их влияния на клеточный цикл и на активацию клеточной гибели по пути апоптоза в дозах, сопоставимых с IC_{50} . Возможность ареста клеточного цикла в опухолевых линиях (HL60, Jurkat, A549 и K562) при действии конъюгатов DAU определяли также с помощью проточной цитофлуориметрии путем оценки содержания ДНК для определения соотношения клеточных популяций.

Обычно считается, что DAU преимущественно влияет на S-фазу клеточного цикла, но проведенные эксперименты свидетельствуют, что немодифицированный DAU для всех протестированных опухолевых линий эффективно вызывал арест клеточного цикла в G2/M фазе (Рис.3А), что видно по накоплению клеток с тетраплоидным набором хромосом. Конъюгаты DAU и СЛ сохраняют сходное с DAU влияние, вызывая накопление клеток в фазе G2/M клеточного цикла. Однако выраженность этих эффектов варьировалась в зависимости от клеточной линии, а также от времени инкубации с соединениями из-за разной скорости пролиферации у разных линий клеток. Для линии суспензионных клеток HL-60 (клетки лейкемии) наиболее выраженный эффект действия DAU достигал спустя 48 ч инкубирования (83,8% клеток в G2/M фазе). Действие протестированных конъюгатов DAU и СЛ на клетки

HL-60 также было наиболее выражено спустя 48 ч и приводило к тому, что большая часть клеток остается в G2/M фазе (Рис.3В). Наиболее активны в отношении клеток линии HL60 были соединения DNR-SL62 и DNR-SL63. Эффект при инкубировании в течение 24 ч был менее выраженным для всех конъюгатов. В том же тесте на подавление клеточного цикла на линии Jurkat только производные с изотелекином (SL17-DAU) и костунолидом (SL63-DAU) сохраняли наиболее близкий к исходному антрациклиновому антибиотику эффект. На линии клеток A549 эффект сохраняли конъюгаты с телекином (SL20-DAU), дегидрокостуслактоном (SL62-DAU), костунолидом (SL63-DAU) и рейнозином (SL73-DAU). На клетках линии K562 только SL62-DAU проявлял аналогичную активность в отношении ареста клеток в G2/M фазе клеточного цикла. Итого, наиболее активным из испытанных конъюгатов является соединение SL62-DAU, которое было эффективно на трех линиях клеток (A549, HL60 и K562) и вызывало клеточную остановку, сопоставимую с DAU.

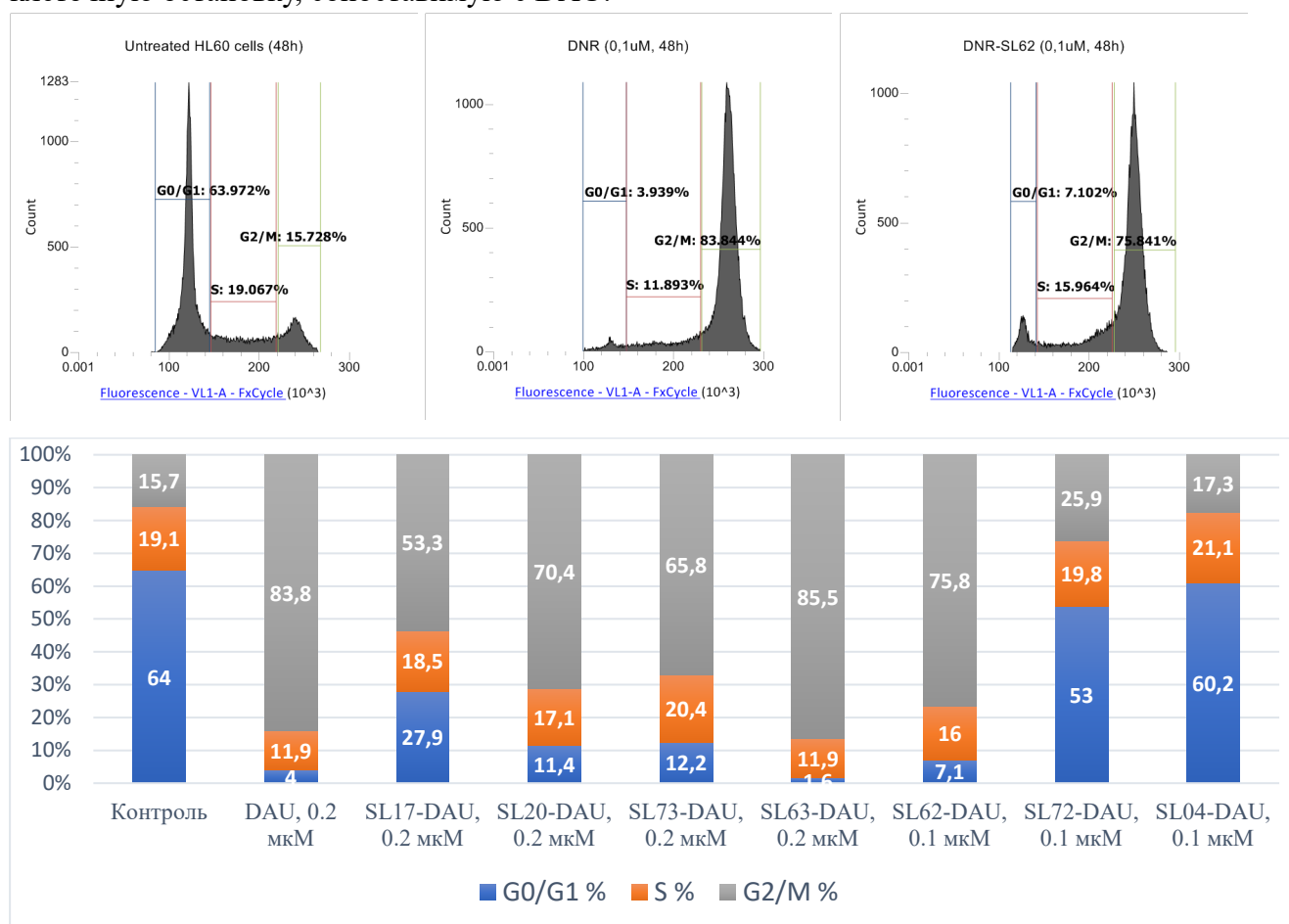


Рисунок 3 А. Гистограммы содержания ДНК в клетках HL-60 по данным проточной цитофлуориметрии после 48 ч в тесте FxCycle™ для необработанных (слева), обработанных DAU (в центре) и обработанных одним из конъюгатов SL62-DAU (справа); **В.** Распределение клеток HL-60 по фазам клеточного цикла при обработке конъюгатами DAU и СЛ спустя 48 ч

Оценку влияния на запуск апоптоза определяли по уровню экстернализации фосфатидилсерина и активации каспаз с помощью метода проточной цитофлуориметрии на линиях клеток HL60 и Jurkat, которые наиболее чувствительны к действию конъюгатов. Активность прохождения этих двух процессов была определена в тестах с аллофикоцианин-меченным Annexin V и SytoxBlue™, типичную картину результата анализа клеток можно увидеть на дотограммах распределения клеток по популяциям (Рис.4А), где: А-апоптотические клетки, V-жизнеспособные, N-некротические, D-поврежденные клетки. Анализ клеток линии HL-60 обработанных немодифицированным DAU в дозе 0,1 мкМ показал, что спустя 24 доля

апоптических и некротических клеток еще очень слабо отличалась от контроля в виде необработанных клеток. И только спустя 48 ч инкубации картина распределения клеток по апоптической и некротической популяциям становилась достоверно отличной. При обработке клеток HL60 прочими соединениями в дозах, близких к IC50 наблюдалась та же картина – спустя 24 ч инкубации картина мало отличалась от необработанных клеток в контроле и только при инкубации в течение 48 часов, содержание апоптотической и некротической популяций статистически значимо отличается от контроля практически у всех соединений (Рис.4В). Наиболее сходным с DAU по действию является конъюгат с рейнозином (SL73-DAU). Клеткам линии Jurkat требуется меньше времени для проявления эффектов немодифицированного DAU, уже спустя 24 ч появляются видимые изменения в популяциях некротических и апоптических клеток. При тестировании конъюгатов DAU на линии Jurkat спустя 24 ч количество мертвых клеток было меньше в отличие от немодифицированного DAU и было близко к контролю, наибольший эффект среди них показало производное с костунолидом (SL63-DAU), но спустя 48 и 72 ч эффект соединений становился более отчетливым. Вероятно, инициация апоптотической гибели клеток является результатом ареста клеточного цикла в фазе G2/M и проявляется только спустя время после достижения накопления клеток в этой фазе.

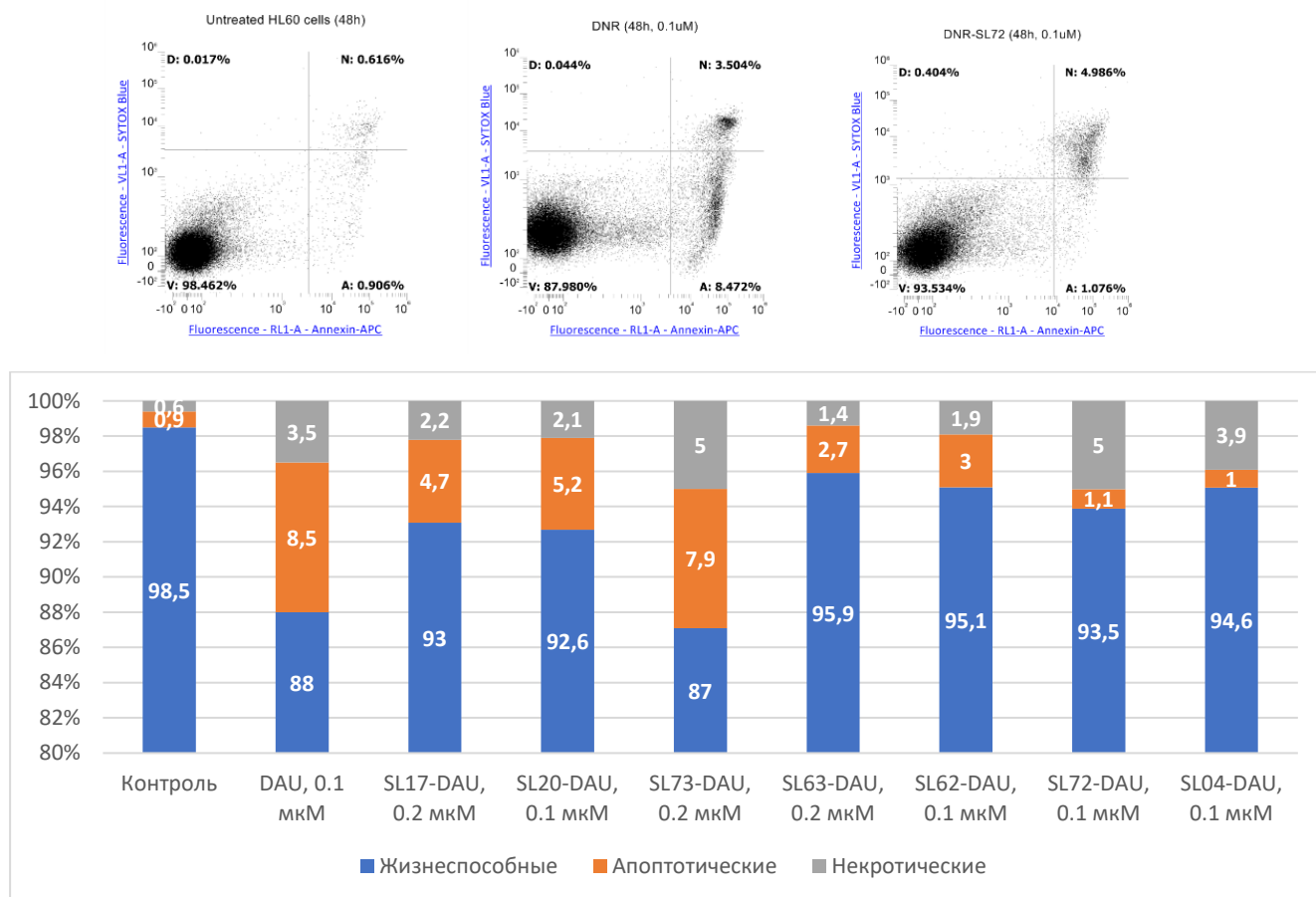


Рисунок 4 А. Дотограммы клетках HL-60 по данным проточной цитофлуорометрии после 24 ч в тесте на индукцию апоптоза для необработанных (слева), обработанных DAU (в центре) и обработанных одним из конъюгатов SL72-DAU (справа); **В.** Распределение клеток HL-60 по популяциям жизнеспособности при обработке конъюгатами DAU и СЛ спустя 48 ч

Подобная серия аминоконъюгатов сесквитерпеновых лактонов была получена и для доксорубина (Схема 14), более полярного и более клинически значимого

противоопухолевого антибиотика. Однако в этом случае конъюгаты DOX с СЛ не демонстрировали превосходящую исходный антрациклин активность, хотя и часто были менее токсичны для псевдонормальных клеток (Табл.3). Среди конъюгатов с DOX можно отметить только соединение **45/46-DOX** (производное эпоксиаллоантолактона), которое в отношении большинства опухолевых культур проявило цитотоксичность близкую с цитотоксичностью препарата сравнения. Стоит отметить, что наиболее чувствительными к действию исследуемых соединений оказались культуры HeLa и PANC-1. Была показана возможность синтеза конъюгатов Михаэля DOX напрямую из его соли гидрохлорида без выделения основания.

Схема 14

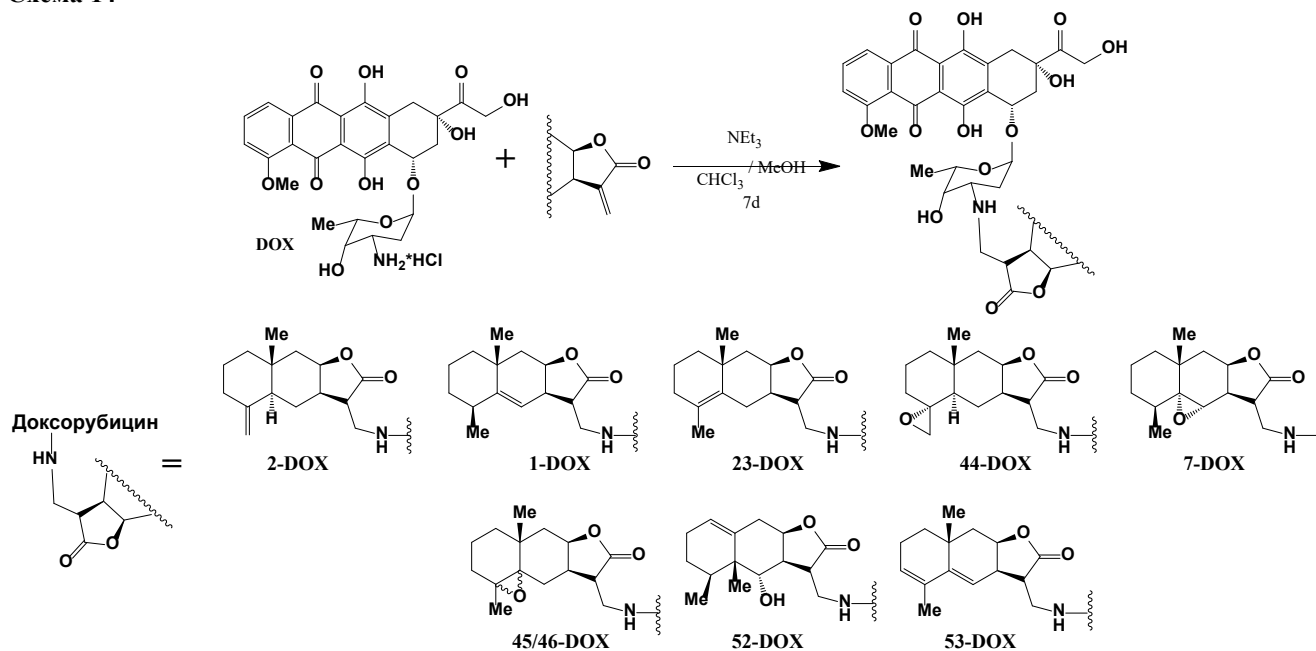


Таблица 3 Цитотоксическая активность конъюгатов DOX и сесквитерпеновых лактонов

Соединение	IC ₅₀ (мкМ/л)						
	A549	RD	MCF7	HCT116	HeLa	PANC-1	HEK293
DOX	0.38±0.02	0.29±0.02	0.46±0.03	0.14±0.01	2.92±0.62	2.18±0.06	6.78±0.76
1-DOX	3.29±0.11	2.67±0.1	26.76±0.65	4.55±0.03	3.26±0.25	0.81±0.07	29.83±0.18
2-DOX	2.21±0.06	2.41±0.03	11.11±0.17	2.81±0.05	8.24±0.25	2.25±0.24	19.82±0.42
7-DOX	4.52±0.57	2.47±0.07	3.03±0.07	2.52±0.02	1.76±0.03	4.48±0.17	4.50±0.32
23-DOX	3.18±0.09	2.98±0.06	8.41±0.02	1.26±0.05	12.20±0.37	1.50±0.06	11.00±0.11
44-DOX	1.86±0.12	2.76±0.02	5.65±0.22	1.07±0.01	1.98±0.45	1.91±0.06	11.73±0.10
45/46-DOX	0.88±0.11	1.18±0.01	2.94±0.02	0.25±0.04	2.11±0.70	0.91±0.05	0.98±0.23
52-DOX	2.01±0.09	1.95±0.01	1.90±0.07	0.20±0.01	- ^a	- ^a	6.42±0.21
53-DOX	1.87±0.07	1.03±0.02	2.34±0.01	0.43±0.02	- ^a	- ^a	16.42±1.07

5-Имино-даунорубин (5-ID) – некардиотоксичный аналог DAU. Образование на месте хинонового кольца DAU стабильного иминохинона в 5-ID не ведет к потере противоопухолевой активности, при этом появляются новые свойства: изменение окраски антибиотика с красной на сине-пурпурную, отсутствие нежелательного эффекта образования активных форм кислорода *in vivo* и резкое снижение кардиотоксичности. Были синтезированы

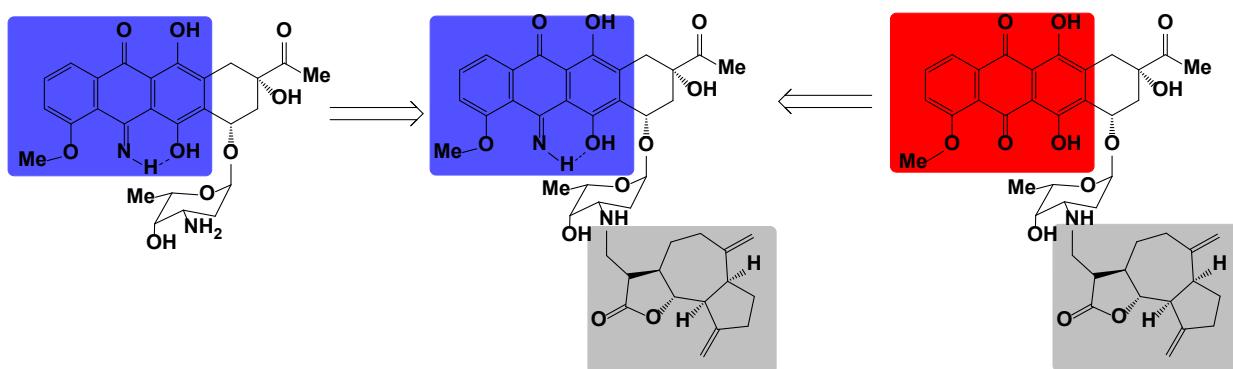


Рисунок 5 Принцип объединения в одной молекуле фрагмента из 5-иминодаунорубицина и *N*-алкилированных СЛ производных даунорубицина

N-алкильные конъюгаты 5-ID с сесквитерпеновыми лактонами как антрациклины, объединяющие в составе молекулы сразу два подхода к снижению кардиотоксичности опосредованной активными формами кислорода (Рис.5). Во-первых, замена хинона в хромофоре DAU на иминоквон лишает антрациклин возможности эффективно участвовать в образовании активных форм кислорода, а, во-вторых, модификация аминсахара DAU лактонами придает молекуле некоторые антиоксидантные свойства. Были получены конъюгаты 5-ID с СЛ: алантолактоном, изоалантолактоном и дегидрокостус-лактоном выделенных из растительных источников. Помимо этого, был получен и незамещенный по аминсахару 5-ID. Полученные конъюгаты **1-5ID** и **2-5ID** оказались более активными *in vitro* на линиях клеток HeLa и MCF7 чем чистый 5-имино-даунорубицин (Табл.4), в то же время конъюгат с дегидрокостус-лактоном (**9-5ID**) наоборот еще сильнее терял в активности. Использование фрагментов липофильных сесквитерпеновых лактонов в конъюгатах 5-ID, кроме того, позволит обходить системы устойчивости к антрациклинам за счет лучшего преодоления плазмалеммы опухолевой клетки и потери сродства антрациклина к мембранным насосам.

Таблица 4 Цитотоксическая активность 5-имино-даунорубицина и его конъюгатов с СЛ

Соединение	Формула исходного лактона	IC ₅₀ (мкМ/л)				
		HeLa (карцинома шейки матки)	A549 (карцинома легкого)	MCF7 (аденокарцинома молочной железы)	HCT116 (карцинома толстого кишечника)	HEK293 (эмбриональный почечный эпителий)
DAU	---	0.26±0.02	0.53±0.05	2.44±0.07	0.29±0.01	0.03±0.00
5-ID		5.39±0.60	1.84±0.06	2.91±0.11	0.08±0.00	0.06±0.00
1-5ID		2.56±0.47	1.34±0.04	0.97±0.05	2.96±0.05	1.74±0.05
2-5ID		2.77±0.32	3.73±0.24	4.06±0.52	3.83±0.09	0.56±0.04
9-5ID		9.39±0.66	23.29±0.86	52.44±2.33	21.36±3.13	9.97±0.29

Из линии клеток K562 путем продолжительного культивирования под воздействием все увеличивающихся доз даунорубицина была получена резистентная к даунорубицину линия клеток K562/DNR. Обе линии – родительскую K562 и резистентную K562/DNR параллельно подвергли воздействию DAU и SL04-DAU. Согласно полученным данным, цитотоксичность соединений по отношению к линии K562 в течение 3 суток развивается по нарастающей. Если через одни сутки 50%-ная ингибирующая концентрация даунорубицина в 3 раза больше, чем SL04-DAU, то к 72 часам инкубации даунорубицин становится токсичнее SL04-DAU. Совершенно иная картина открывается при исследовании цитотоксичности в отношении резистентной линии клеток K562/DNR. Даунорубицин становится менее токсичным на всем протяжении опыта: его IC₅₀ приблизительно в 3, 100 и 200 раз выше, чем в отношении родительской K562 через 24, 48 и 72 часа воздействия соответственно. Конъюгат SL04-DAU демонстрирует меньшее снижение цитотоксичности – в 3, 5 и 25 раз через 24, 48 и 72 часа соответственно, на всем протяжении опыта оставаясь достоверно более активным соединением, чем даунорубицин.

Таблица 2. Сравнение цитотоксичности DAU и SL04-DAU по отношению к резистентной к даунорубицину (K562/DNR) и родительской линии клеток (K562) в тесте с ресазурином

Культура	Соединение	IC ₅₀ , μM		
		24 часа	48 часов	72 часа
K562	DAU	23,48±0,02	0,74±0,03	0,42±0,04
	SL04-DAU	7,83±0,25*	2,48±0,07*	0,69±0,00*
K562/DNR	DAU	64,82±0,68	68,26±0,37	80,73±0,89
	SL04-DAU	20,26±0,19*	12,19±0,18*	17,84±0,74*

* p≤0,05 по отношению к клеткам, подвергнутым воздействию DAU.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы условия получения трудноделимых лактонов девясила высокого, алантолактона и изоалантолактона, для масштабов в десятки граммов чистых продуктов. Удобнее получать алантолактон если избавиться от имеющегося в экстракте изоалантолактона окислением диоксидом селена. Для изоалантолактона – подобраны условия кристаллизации и регенерации его из аминоконъюгатов, или без превращения в аминоконъюгат.

2. Осуществлено выделение СЛ в препаративных масштабах из горькуши лопуховидной (костуса), также богатого источника СЛ. Найден способ быстрого отделения липофильных лактонов от липидов.

3. Предложен и осуществлен синтез продуктов галогенлактонизации кислоты от гидролиза алантолактона. Реакция с NCS и NBS дает эвдесмановые галогенлактоны с высоким выходом, в то время как реакция с йодом ведет к перегруппировке алантолактона в эремофилановый лактон.

4. Подобраны условия реакции с синглетным кислородом на примере синтеза лактона артемизитена. Лучше всего показала себя “темновая” система с каталитическим разложением перекиси молибдатом натрия в среде диоксана.

5. Получена серия новых конъюгатов даунорубицина через реакцию прямого присоединения СЛ по аминоконъюгату, изучено цитотоксическое действие полученных конъюгатов. Конъюгаты СЛ с DAU как правило сохраняют активность исходного антибиотика или превосходят его, иногда на порядок. Выявлены соединения-хиты для дальнейшего изучения их биологической активности.

6. Получены конъюгаты СЛ с другими антрациклинами – чаще используемым в клинике доксорубицином и потенциально некардиотоксичным 5-имино-даунорубицином. Они также не теряют цитотоксических свойств при такой модификации что позволяет рассматривать их как основу для разработки новых антинеопластов.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. **Semakov A.V.**, Anikina L.V., Afanasyeva S.V., Pukhov S.A., Klochkov S.G. Synthesis and Antiproliferative Activity of Conjugates of Anthracycline Antibiotics with Sesquiterpene Lactones of the Elecampane // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2018. -Vol. 44, Is 5. – p. 538-546. DOI: 10.1134/S1068162018040167

2. Neganova M., **Semakov A.**, Aleksandrova Y., Yandulova E., Pukhov S., Anikina L., Klochkov S. N-alkylation of anthracycline antibiotics by natural sesquiterpene lactones as a way to obtain antitumor agents with reduced side effects // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9, Is. 5. – May 2021 (547). DOI: 10.3390/biomedicines9050547

3. Аникина Л.В., **Семаков А.В.**, Афанасьева С.В., Пухов С.А., Клочков С.Г.. Синтез и антипролиферативная активность конъюгатов даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонами // *Химико-фармацевтический журнал* – 2018. – Т. 52, №4. – с. 23-26. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-4-23-26

4. **Семаков А.В.**, Клочков С.Г. Способы препаративного выделения изоалантолактона и алантолактона из корней девясила высокого // *Химия Растительного Сырья* – 2020. – №3. – С. 145–154. DOI: 10.14258/jcrpm.2020034681

5. С.Г. Клочков, С.А. Пухов, М.Е. Неганова, Е.С. Дубровская, Л.В. Аникина, С.В. Афанасьева, **А.В. Семаков**. Биологическая активность алантолактонов в экспериментах на клетках // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. – 2018. – Т.1, № 3. – e00047. DOI: 10.18097/bmcrm00047

6. **Semakov A.V.**, Anikina L.V., Klochkov S.G.. Synthesis and Cytotoxic Activity of the Products of Addition of Thiophenol to Sesquiterpene Lactones // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2021. – Vol. 47, No. 4. – p. 906–917. DOI: 10.1134/S106816202104018X

7. Pukhov S.A., **Semakov A.V.**, Globa A.A., Anikina L.V., Afanasyeva S.V., Yandulova E.Y., Aleksandrova Y.R., Neganova M. and Klochkov S.G.. New Conjugates of Daunorubicin with Sesquiterpene Lactones and Their Biological Activity // *ChemistrySelect*. – 2021. – Т.6. – p. 8446–8451. DOI: 10.1002/slct.202102244

8. **Semakov A.V.**, Brel V.K.. Molecular Iodine as an Optimal Catalyst of Alkene Migration in Sesquiterpene Lactones to a Hindered endo-Position // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2022. – Vol. 92, No 8. – 1392-1400. DOI: 10.1134/S1070363222080059

9. **Semakov A.V.** and Klochkov S.G.. Addition Products of Thiophenol and Selenophenol to Inula Helenium Lactones // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2020. - Vol. 56, No. 2. – 254-256. DOI: 10.1007/s10600-020-03000-7

10. **Semakov A.V.**, Anikina L.V., Pukhov S.A., Afanas`eva S.V. and Klochkov S.G.. Conjugates of alantolactone with anthracycline antibiotics // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2016. – Vol. 52, No. 4. – p. 695-696. DOI: 10.1007/s10600-016-1744-y

11. **Semakov A.V.**, Afanas`eva S.V. and Klochkov S.G. New synthesis of eremophilanes from alantolactone // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2016. – Vol. 52, № 5 – 643-944. DOI: 10.1007/s10600-016-1827-9

12. **Semakov A.V.** Low Molecular Weight Modifications of Anthracycline Antibiotics. Part I. Reactions by Amino Group (A Review) // *Reviews and Advances in Chemistry*. – 2024. – Vol. 14, Is. 4. – p. 345-422. DOI: 10.1134/S2634827624600440

13. **Semakov A.V.**, Pukhov S.A. Low Molecular Weight Modifications of Anthracycline Antibiotics. Part II. Reactions by Other Positions (A Review) // *Reviews and Advances in Chemistry*. – 2024. - Vol. 14, Is. 4. – p. 423-493. DOI: 10.1134/S2634827624600452

14. Глоба А.А., **Семаков А.В.**, Пухов, С.А., Афанасьева С.В., Аникина Л.В. Снижение кардиотоксичности даунорубицина путём конъюгации с природными сесквитерпеновыми лактонами // *Биомедицина*. – 2024. – Т.20, № 3. – С. 37-46. DOI: 10.33647/2074-5982-20-3-37-46

Другие некоторые публикации по теме работы:

1. **Семаков А.В.**, Пухов С.А. Оптимизация условий реакции алкенов с «темновым»

синглетным кислородом, на примере синтеза артемизитена // Химия и технология растительных веществ: Тезисы докладов XII Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых, Киров, 2022

2. **Семаков А.В.**, Пухов С.А., Аникина Л.В., Александрова Ю.А., Яндулова Е.Ю., Неганова М.Е., Клочков С.Г.. N-алкилирование даунорубицина сесквитерпеновыми лактонами ведет к активным антинеопластам и снижению угнетающего действия на энергетический метаболизм клетки // 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021»: материалы конференции, Волгоград, 2022

3. Аникина Л.В., **Семаков А.В.**, Пухов С.А., Глоба А.А., Афанасьева С.В., Клочков С.Г.. Цитотоксичность конъюгатов даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонами в отношении резистентной линии клеток A549/DNR // 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021»: материалы конференции, Волгоград, 2022

4. Пухов С.А., **Семаков А.В.**, Глоба А.А., Аникина Л.В., Афанасьева С.В., Клочков С.Г.. Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с сесквитерпеновыми лактонами // Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии: Материалы очных докладов Международной научной конференции, Екатеринбург, 2020

5. Anikina L., **Semakov A.**, Pukhov S., Afanasyeva S., Klochkov S. Minor natural sesquiterpene lactones isotelekin, reynosin and santamarine as a platform for the creation of antineoplastic drugs // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants (MedChem Russia 2019), Abstract book – Ekaterinburg, 2019.

6. Dubrovskaya E.S., **Semakov A.V.**, Afanasyeva S.V. and Klochkov S.G.. The effect of phenylsulfanyl (selenyl) derivatives of natural sesquiterpene lactones on the survival of neuroblastoma SK-N-MS cells under the toxic effect of hydrogen peroxide // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants (MedChem Russia 2019), Abstract book - Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2019. – 448 p. P. 182

7. **Семаков А.В.**, Клочков С.Г., Аникина Л.В. Цитотоксическая активность конъюгатов доксорубицина с сесквитерпеновыми лактонами девясила и их полусинтетическими производными // Материалы VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 2021, журнал «Успехи молекулярной онкологии.» 2022. Том 8. № 4. С.150

8. **Семаков А.В.**, Аникина Л.В., Клочков С.Г. Синтез конъюгатов сесквитерпеновых лактонов с тиофенолом и селенофенолом как способ создания на их основе активируемых АФК-пролекарств // Материалы V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 2019, Москва. Успехи молекулярной онкологии. 2019;6(4):1-187. С.145

9. **Семаков А.В.** Простой способ отделения липофильных сесквитерпеновых лактонов от липидов // Химия и технология растительных веществ: Тезисы докладов XII Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых, Киров, 2022

10. **Семаков А.В.**, Аникина Л.В., Клочков С.Г. Модификация природных сесквитерпеновых лактонов тио- и селенофенолом для создания на их основе активируемых АФК пролекарств // VIII молодежная конференция ИОХ РАН посвященная 85-летию со дня основания ИОХ РАН, Москва, 2019 г.

11. **Семаков А.В.** Синтез активируемых АФК пролекарств сесквитерпеновых лактонов в виде их конъюгатов с тио- и селенофенолами // Весенняя школа-конференция ХимРар по медицинской химии МедХимРар-21, Химки, 2021

12. **Семаков А.В.**, Аникина Л.В., Пухов С.А., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Цитотоксичность конъюгатов даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонам эвдесманового и гваянового типа // Материалы IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 2018. Успехи молекулярной онкологии. 2018. Том 5. № 4. Приложение. С. 94

13. **Семаков А.В.**, Клочков С.Г., Аникина Л.В. Цитотоксическая активность конъюгатов доксорубицина с сесквитерпеновыми лактонами девясила и их полусинтетическими производными. // Материалы VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии,

Москва, 21–23 декабря 2021 г., журнал «Успехи молекулярной онкологии.» 2022. Том 8. № 4. С.150.

14. **Семаков А.В.**, Аникина Л.В., Пухов С.А., Клочков С.Г. Реакция галогенлактонизации в препаративном синтезе производных алантолактона // X Всероссийская научная конференция и школа молодых ученых «Химия и технология растительных веществ», Казань, 2017

15. **Semakov A.V.**, Anikina L.V., Afanasyeva S.V., Klochkov S.G. Modification Of Antracycline Antibiotics With Natural Lactones // Международная научно-практическая конференция “Достижения и перспективы развития фитохимии”, Караганда, Казахстан, 2015

16. **Семаков А.В.**, Пухов С.А., Глоба А.А. Этапы конструирования структуры молекулы антрациклинового антибиотика, сочетающего сразу несколько модификаций, для уменьшения кардиотоксичности // Материалы IX Всероссийской конференции по молекулярной онкологии 18–20 декабря 2024 г., Москва, журнал «Успехи молекулярной онкологии» 2024. Том 11. № 4. Приложение. 1–145. С.125

17. Глоба А.А., **Семаков А.В.**, Пухов С.А., Аникина Л.В., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Антипролиферативная активность даунорубицина, модифицированного по атому азота сесквитерпеновыми лактонами // 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021»: материалы конференции, Волгоград, 2022

18. Глоба А.А., **Семаков А.В.**, Пухов С.А., Аникина Л.В., Афанасьева С.В. Гистологическая оценка кардиотоксичности конъюгатов даунорубицина с эпоксиизоалантолактоном и дегидрокостуслактоном // Материалы VII Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 2022 г., журнал «Успехи молекулярной онкологии.» 2022. Том 9. № 4. Приложение. 1–150. С.96

19. Глоба А.А., **Семаков А.В.**, Пухов С.А., Аникина Л.В., Афанасьева С.В. Антипролиферативная активность и кардиотоксичность новых конъюгатов даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонами // I Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически Активных веществ: биохимические и медицинские аспекты», Казань, 18 - 22 сентября 2023 г, тезисы докладов. – Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, 2023. – 226 с., С.65

20. Глоба А.А., **Семаков А.В.**, Пухов С.А., Аникина Л.В., С. В. Афанасьева С.В. Состояние микроциркуляторного русла миокарда при гистологической оценке кардиотоксичности конъюгатов даунорубицина с дегидрокостуслактоном и эпоксиизоалантолактоном // Материалы IX Всероссийской конференции по молекулярной онкологии 20–22 декабря 2023 г., Москва, журнал «Успехи молекулярной онкологии» 2023. Том 10. № 4. Приложение. 1–155. С.99-100

21. Глоба А.А., **Семаков А.В.**, Пухов С.А., Афанасьева С.В., Аникина Л.В. Влияние конъюгатов даунорубицина с дегидрокостуслактоном и эпоксиизоалантолактоном на структурное состояние цитоскелета опухолевых клеток линии А549 // 6-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим 2024»: материалы конференции, Нижний Новгород, 1–14 июля, 2024; сборник тезисов 1–379. С.206

22. Аникина Л.В., Глоба А.А., Пухов С.А., **Семаков А.В.**, Афанасьева С.В. Конъюгаты даунорубицина и сесквитерпеновых лактонов — противоопухолевая активность и возможные механизмы действия // Экспериментальная и клиническая фармакология – 2023. – Vol.88, Is.11s, p.9. DOI: 10.30906/ekf-2023-86s-9

23. **Семаков А.В.** Синтез сесквитерпеновых лактонов с изомерными положениями двойной связи. // Сборник тезисов докладов Двенадцатой конференции молодых учёных ИФАН РАН. – Черногоровка: ФИЦ ПХФ и МХ РАН, 2022. – 24 с. С.15

24. **Семаков А.В.** Активируемые активными формами кислорода серусодержащие пролекарства на основе сесквитерпеновых лактонов. // Сборник тезисов докладов Восьмой Конференции Молодых Учёных ИФАВ РАН. – Черногоровка: «Редакционно-издательский отдел ИПХФ РАН», 2018. – 20 с. С.12

25. **Семаков А.В.** Синтез конъюгатов сесквитерпеновых лактонов с имино-аналогом даунорубицина. // Сборник тезисов докладов Одиннадцатой Конференции Молодых Ученых ИФАВ РАН. –2021. – 20 с. С.11

26. **Семаков А.В.** Оптимизация условий реакции с синглетным кислородом, ключевого этапа в препаративном синтезе артемизитена. // Сборник тезисов докладов Юбилейной Десятой Конференции Молодых Учёных ИФАВ РАН. – 2020. – 16 с. С.9

27. **Семаков А.В.** Выделение сесквитерпеновых лактонов из новых растительных источников. // VII конференция Молодых Учёных ИФАВ РАН. Тезисы докладов. – Черногоровка: «Редакционно-издательский отдел ИПХФ РАН», 2017. С.8