

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. Н.Н.ВОРОЖЦОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН

На правах рукописи

ЛУЗИНА
Ольга Анатольевна

Синтез биологически активных соединений
на основе усниновой кислоты

(02.00.03 – Органическая химия)

Диссертация на соискание учёной
степени доктора химических наук

Научный консультант
д.х.н., проф. Н.Ф. Салахутдинов

Новосибирск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| 1. ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| 2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ ПРОИЗВОДНЫХ (литературный обзор) | 11 |
| 2.1 Абсолютная конфигурация усниновой кислоты..... | 12 |
| 2.2 Антибактериальная активность усниновой кислоты и её производных..... | 13 |
| 2.3 Антимикобактериальная активность усниновой кислоты и её производных..... | 22 |
| 2.4 Фунгицидное действие усниновой кислоты и её производных..... | 25 |
| 2.5 Антипротозойное действие усниновой кислоты и её производных..... | 28 |
| 2.6 Антивирусное действие усниновой кислоты и её производных..... | 31 |
| 2.7 Альгицидная активность и фитотоксичность усниновой кислоты..... | 32 |
| 2.8 Инсектицидное действие усниновой кислоты и её производных..... | 37 |
| 2.9 Токсичность усниновой кислоты по отношению к животным..... | 38 |
| 2.10 Антимитотический эффект усниновой кислоты..... | 44 |
| 2.11 Генотоксический эффект усниновой кислоты..... | 46 |
| 2.12 Влияние усниновой кислоты на экспрессию генов..... | 47 |
| 2.13 Токсичность усниновой кислоты и её производных по отношению к раковым клеткам..... | 49 |
| 2.14 Аллергенные свойства усниновой кислоты..... | 57 |
| 2.15 Фармакокинетика усниновой кислоты..... | 58 |
| 2.16 Антиоксидантные свойства усниновой кислоты..... | 61 |
| 2.17 Ферментингибирующая активность усниновой кислоты и её производных..... | 64 |
| 2.18 Другие свойства усниновой кислоты..... | 66 |
| 2.19 Заключение..... | 67 |
| 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ | 70 |
| 3.1 Особенности строения и спектральные свойства усниновой кислоты..... | 71 |
| 3.2 Оптимизация процесса выделения усниновой кислоты..... | 74 |
| 3.3 Реакции усниновой кислоты с соединениями, содержащими аминогруппу | |
| 3.3.1 Реакция усниновой кислоты с первичными аминами..... | 75 |
| 3.3.2 Реакция усниновой кислоты с аминокислотами..... | 79 |
| 3.3.3 Реакция усниновой кислоты с гидразинами..... | 81 |
| 3.4 Синтез эфиров усниновой кислоты..... | 85 |
| 3.4.1 Синтез сложных эфиров усниновой кислоты..... | 85 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.2 Синтез простых эфиров усниновой кислоты..... | 86 |
| 3.4.2.1 <i>Взаимодействие усниновой кислоты и её производных с метилирующими агентами.....</i> | 87 |
| 3.4.2.2 <i>Синтез простых эфиров усниновой кислоты реакцией с перфторолефинами.....</i> | 93 |
| 3.4.2.3 <i>Синтез простых эфиров усниновой кислоты реакцией с перфторароматическими соединениями.....</i> | 95 |
| 3.5 Реакции взаимодействия усниновой кислоты с комплексными гидридами бора..... | 97 |
| 3.6 Реакции окисления усниновой кислоты и её производных..... | 102 |
| 3.7 Реакция Шмидта усниновой кислоты..... | 105 |
| 3.8 Бромирование усниновой кислоты и её производных..... | 106 |
| 3.9 Синтез новых соединений модификацией бромпроизводных усниновой кислоты..... | 109 |
| 3.9.1 Синтез серусодержащих производных усниновой кислоты и их модификация... | 109 |
| 3.9.1.1 <i>Синтез тиоэфиров на основе усниновой кислоты.....</i> | 109 |
| 3.9.1.2 <i>Синтез сульфонов на основе усниновой кислоты.....</i> | 112 |
| 3.9.1.3 <i>Синтез сульфоксидов на основе усниновой кислоты.....</i> | 113 |
| 3.9.1.4 <i>Синтез тиазолов на основе усниновой кислоты.....</i> | 116 |
| 3.9.2 Синтез кислородсодержащих производных усниновой кислоты..... | 119 |
| 3.9.3 Синтез азот-, углерод-, селен-содержащих производных усниновой кислоты.... | 122 |
| 3.10 Цианэтилирование усниновой кислоты и её производных..... | 125 |
| 3.11 Синтез флавоноидов на основе усниновой кислоты..... | 128 |
| 3.11.1 Синтез хальконов на основе усниновой кислоты..... | 128 |
| 3.11.2 Синтез дигидрофлавонолов, флавонолов и флаванонов на основе усниновой кислоты..... | 131 |
| 3.11.3 Синтез ауранов на основе усниновой кислоты..... | 133 |
| 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВЫХ КИСЛОТ..... | 137 |
| 4.1 Противовирусная активность производных усниновых кислот..... | 137 |
| 4.2 Цитотоксическая активность производных усниновой кислоты в отношении раковых клеток..... | 145 |
| 4.3 Влияние производных усниновых кислот на репарационные ферменты..... | 150 |
| 4.3.1 Влияние производных усниновых кислот на ПАРП1, ПАРП2 и β -полимеразу... | 150 |
| 4.3.2 Влияние производных усниновых кислот на Tdp1..... | 156 |
| 4.4 Антимикобактериальная активность производных усниновых кислот..... | 159 |

| | |
|--|------------|
| 4.5 Гиполипидемическая активность (+)-усниновой кислоты и её производных..... | 164 |
| 4.6 Инсектицидная активность усниновой кислоты и её производных..... | 168 |
| 4.7 Заключение..... | 171 |
| 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... | 173 |
| 6. ВЫВОДЫ..... | 290 |
| 7. ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 292 |
| 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 294 |
| 9. ПРИЛОЖЕНИЕ. МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ УСНИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ..... | 323 |

1. ВВЕДЕНИЕ

Важным направлением медицинской химии, позволяющим получать новые, эффективные препараты, является использование синтетических трансформаций природных соединений. Наиболее эффективным является вовлечение в синтез соединений, обладающих нативной биологической активностью и имеющих доступную сырьевую базу. Широкое распространение в качестве синтонов для синтеза лекарственных препаратов получили соединения класса терпеноидов и алкалоидов. В то же время соединения дибензофуранового ряда, принадлежащие к классу полифенолов, незаслуженно мало используются как основа для создания новых фармакологических агентов. Исследования последних десятилетий дали основания возлагать надежды на введение в терапию ряда социально значимых болезней препаратов на основе распространённого лишайникового метаболита класса дибензофуранов – усниновой кислоты. Широкое распространение её в разных видах лишайников, простота процедуры выделения из растительного сырья, высокая оптическая чистота извлекаемого соединения придаёт особую привлекательность этому соединению. Экономическую целесообразность использованию усниновой кислоты придаёт возможность выделения её из смеси лишайников, присутствующей в отходах лесопереработки. Диапазон биологической активности усниновой кислоты (противовоспалительная, противовирусная, противоопухолевая и т.д.) также привлекает к ней пристальный интерес исследователей, однако, ряд исследований выявил существенный токсический эффект усниновой кислоты в диапазоне эффективных концентраций, ассоциированный с гепатотоксичностью. Исходя из этих предпосылок, неоднократно предпринимались попытки провести химические модификации на её основе в том числе с целью уменьшить токсичность и получить новые фармакологические агенты. Совокупность данных по химическим модификациям усниновой кислоты приведена в обзоре с участием автора, по данным которого можно заметить, что спектр известных химических трансформаций усниновой кислоты достаточно узок. Очевидно, что широкому использованию усниновой кислоты в тонком органическом синтезе препятствует большой набор функциональных групп, высокая реакционная способность и взаимное влияние которых приводит к малопредсказуемым результатам и сложным реакционным смесям. В то же время, данные последних десятилетий по биологической активности усниновой кислоты и её производных, освещённые в литературном обзоре, говорят о большом, но далеко не исчерпанном, потенциале этой молекулы в качестве объекта для химических трансформаций, позволяющих получить препараты с высокой биологической активностью.

Цель настоящей работы – исследование синтетических трансформаций усниновой кислоты с целью получения её новых производных, обладающих ценными биологическими, свойствами.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) синтез новых производных усниновой кислоты с использованием литературных методик, модифицирование литературных методик для получения новых соединений.
- 2) изучение реакционной способности усниновой кислоты в реакциях окисления, восстановления, галогенирования.
- 3) разработка методов селективной химической модификации отдельных функциональных групп усниновой кислоты.
- 4) поиск и разработка новых методов химической модификации усниновой кислоты.
- 5) синтез библиотек структурнородственных производных усниновой кислоты для выявления их биологической активности. Отбор перспективных производных усниновой кислоты для проведения фармакологических испытаний.

В результате проведённого планомерного исследования выявлены закономерности реакционной способности усниновой кислоты и её производных в некоторых органических реакциях, обнаружены неизвестные ранее реакции усниновой кислоты, приводящие к широкому спектру оптически активных производных разнообразных структурных типов. Разработаны синтетические методы, позволяющие направленно вводить фармакофорные фрагменты в разные части молекулы усниновой кислоты.

Разработаны методы направленного синтеза эфиров усниновой кислоты по гидроксильным группам, позволяющие получать метиловый или полифторсодержащие эфиры усниновой кислоты селективно по гидроксильной группе у 7-го атома углерода. Показано, что образование метилового эфира по 9-ому фенольному гидроксилу происходит после разрушения связывающей его водородной связи при действии диазометана на соответствующие производные усниновой кислоты.

Изучено взаимодействие усниновой кислоты и некоторых её производных с диазометаном. Показано, что реакция протекает по нескольким направлениям, среди которых расширение цикла, образование оксиранового цикла по карбонильной группе и образование метилового эфира. Модификация условий реакции способствует более глубокому взаимодействию с вовлечением в реакцию пяти молекул диазометана и приводит к образованию соединений с аннелированными кольцу А усниновой кислоты пирановым и фурановым циклами. Установлено, что образование оксиранового цикла по карбонильной группе протекает стереоспецифично.

Показано, что восстановление карбонильных групп усниновой кислоты комплексными гидридами бора проходит последовательно. Наиболее реакционноспособна эндоциклическая карбонильная группа, восстановление её протекает стереоселективно. Карбонильная группа $C^{13}=O$ восстанавливается лишь при повышенной температуре и не стереоселективно. Изучение механизма реакции на примере взаимодействия пиразольного производного усниновой кислоты с боргидридом натрия в различных условиях позволяет предположить, что восстановление карбонильной группы $C^{13}=O$ протекает через образование парахинонметидного интермедиата.

Разработан новый метод окисления усниновой кислоты и ее производных органическими надкислотами. Показано, что взаимодействие происходит по кольцу А усниновой кислоты и сопровождается разрушением ароматической системы и образованием соединений, содержащих эпоксидные циклы. Установлено, что эпоксидирование двойной связи протекает стереоспецифично.

Разработан один из наиболее удобных и перспективных путей к дальнейшей функционализации усниновой кислоты - бромирование усниновой кислоты и её метилового эфира. Показано, что реакция протекает по ацетильной группе в кольце А усниновой кислоты. Установлено, что селективность бромирования определяется силой внутримолекулярных водородных связей, разрушение одной из них через синтез метилового эфира усниновой кислоты существенно облегчает реакцию электрофильного бромирования по соседней ацетильной группе.

Реакцией бромпроизводных усниновой кислоты и её метилового эфира с тиолами, тиоамидами, тиомочевинами и тиосемикарбазидами синтезированы библиотеки новых серусодержащих производных усниновой кислоты. Показано, что реакция протекает по пути нуклеофильного замещения атома брома серуцентрированными нуклеофилами. Реакцией с тиолами получены тиоэфиры, дальнейшее окисление которых ведёт к сульфонам и сульфоксидам. Изучены возможности энантиоселективного окисления тиоэфиров в сульфоксиды, исследовано влияние структуры тиоэфира на диастереомерный избыток сульфоксида. Реакцией с тиоамидами, замещёнными тиомочевинами и замещёнными тиосемикарбазидами синтезированы производные усниновой кислоты, содержащие тиазольный цикл с варьированием заместителя в нём.

Изучены реакции бромпроизводных усниновой кислоты и её метилового эфира с О-, N-, и С-центрированными нуклеофилами. Показано, что в зависимости от условий реакции взаимодействие с кислородцентрированными нуклеофилами протекает либо по пути внутримолекулярной циклизации, либо с нуклеофильным замещением атома брома и образованием эфиров, либо в случае дибромпроизводного усниновой кислоты по двум этим

направлениям одновременно. Установлено, что реакция бромпроизводного усниновой кислоты с N- и C-центрированными нуклеофилами приводит лишь к продукту внутримолекулярной циклизации, взаимодействие с образованием новых C-N и C-C связей возможно лишь в реакции нуклеофильного замещения брома в бромпроизводном метилового эфира усниновой кислоты.

Разработан метод цианэтилирования усниновой кислоты, показано, что реакция идёт селективно по пути C-алкилирования в одной из двух ацильных групп. На основе усниновой кислоты и её производных синтезированы новые соединения, содержащие по два цианэтильных фрагмента.

Разработаны методы получения соединений с флавоноидными остовами на основе усниновой кислоты. Осуществлен четырёхстадийный синтез на базе остова усниновой кислоты соединений, содержащих структурный фрагмент халконов. Дальнейшей модификацией халконов синтезированы флавонолы, дигидрофлавонолы и флавононы. Исходя из бромпроизводного усниновой кислоты, по реакции с ароматическими и алифатическими альдегидами синтезированы соединения, содержащие структурный фрагмент ауранов и подобные им соединения.

Синтезированы библиотеки производных с выявленной биологической активностью на основе обоих энантиомеров усниновой кислоты. В результате биотестирования новых производных усниновой кислоты впервые выявлены соединения с высокой противотуберкулёзной активностью, с цитотоксическими свойствами в отношении опухолевых линий клеток крови, с выдающейся ингибирующей способностью по отношению к ферментам репарации ДНК, с вирусингибирующими свойствами в отношении вируса гриппа А, с существенным гиполипидемическим потенциалом, а также соединения, проявляющие инсектицидную активность в комбинации с биоагентом. Для изучения зависимости «структура-активность» получены наборы соединений с различными параметрами заместителей, в том числе различающиеся длиной, объёмом, электронными эффектами и зарядом заместителя. Для многих тестированных на биологическую активность соединений синтезированы оба энантиомера на основе (+)- и (-)-усниновой кислот.

Практическая значимость выполненной работы заключается в разработке новых методов синтеза большого набора хиральных соединений на основе усниновой кислоты, многие из которых представляют интерес для фармакологических исследований. На часть практически важных результатов получены патентные свидетельства (8 патентов).

По теме диссертации опубликовано: 31 публикация (23 статьи, включая 1 обзор, в рецензируемых отечественных и международных журналах и 8 патентов), тезисы 20

докладов на российских и международных конференциях, созданы 2 лабораторных регламента.

Результаты работы докладывались на следующих конференциях:

2nd Annual Russian-Korean Conference «Current issues of natural products chemistry and biotechnology» (Новосибирск, 2010), XIII Молодежная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2010), Конференция с международным участием «Актуальные проблемы химии природных соединений» (Ташкент, 2010), XIV Молодежная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии» (Екатеринбург, 2011), «Current topics in organic chemistry» (Novosibirsk, 2011), VII Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар, 2011), V Всероссийская конференция с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2012), Международная конференция «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012), 3rd International Influenza Meeting (Münster, Germany, 2012), Кластер конференций по органической химии «Оргхим-2013» (Санкт-Петербург, 2013), X-th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Tashkent-Bukhara, Republic Uzbekistan, 2013), Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) (Москва, 2013), 26th International Conference on Antiviral Research (ICAR) (San Francisco, CA, 2013), Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск, 2013), Siberian winter conference “Current topic in organic chemistry” (Шерегеш, Россия, 2015), Вторая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2015) (Новосибирск, 2015), IX Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ» (Москва, 2015), Второй Междисциплинарной Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии – МедОргБиоХим2015 (МОБИ - Хим2015) (Крым, Новый свет, 2015).

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, главы о фармакологических исследованиях, экспериментальной части, выводов, перечня используемых сокращений и обозначений, списка литературы и приложения.

Автор выражает благодарность всем, с кем было связано появление настоящей диссертации. Прежде всего, автор глубоко благодарен научному консультанту профессору Нариману Фаридовичу Салахутдинову – мудрому Учителю, под руководством и при поддержке которого не только было выполнено данное исследование, но и сформировано научное мировоззрение автора. Искреннюю благодарность автор выражает к.х.н. Соколову Д.Н. за активное участие в экспериментальной работе и плодотворные научные дискуссии. Автор благодарна акад. Голстикову Г.А., д.х.н. Фурину Г.Г., к.х.н. Половинке М.П. за

научные консультации и сотрудничество, к.х.н. Нечепуренко И.В. за организацию и проведение полевых экспедиций по заготовке лишайников, к.х.н. Корчагиной Д.В. за установление строения некоторых полученных соединений с помощью ЯМР-спектроскопии, к.х.н. Шернюкову А.В. за установление строения ряда полученных соединений с помощью ЯМР-спектроскопии, конформационный анализ и квантово-химические расчеты DFT-методом, д.х.н. Гатилову Ю.В., д.х.н. Багрянской И.Ю., Рыбаловой Т.В. за проведение рентгеноструктурного анализа, Комаровой Н.И. за проведение анализов методом ВЭЖХ, инженеру-технологу Варламенко В.С. за вклад в работу по оптимизации выделения усниновых кислот. Автор благодарна коллегам за проведение фармакологических исследований производных усниновой кислоты: проф. Даниленко В.Н и к.б.н. Беккер О.Б. из Института общей генетики РАН, к.б.н. Зарубаеву В.В. и к.б.н. Штро А.А. из Института гриппа, чл.-корр. Лаврик О.И. и к.б.н. Захаренко А.Л. из Института химической биологии и фундаментальной медицины, к.б.н. Филипенко М.Л. и к.б.н. Боярских У.А., проф. Глупову В.В. и д.б.н. Крюкову В.Ю. из Института систематики и экологии животных, проф. Покровскому А.Г. и Покровскому М.А. из Новосибирского государственного университета.

Автор выражает признательность всем сотрудникам лаборатории физиологически активных веществ за творческую атмосферу в коллективе и доброжелательное отношение.

Работа была поддержана следующими грантами и программами: грант Российского фонда фундаментальных исследований № 13-03-00810 «Изучение фундаментальных закономерностей реакционной способности природных фенолов на примере усниновой кислоты. Получение новых хиральных производных», государственный контракт № 12411.1008799.13.002 от 25 апреля 2012 г. «Доклинические исследования противотуберкулезного лекарственного средства на основе полусинтетических производных усниновой кислоты», Шифр «2.1 Кислота 2012»; государственный контракт № 14.604.21.0018 от 17 июля 2014 г. на выполнение научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы «Разработка ингибиторов ферментов репарации ДНК в качестве прототипов лекарственных препаратов для социально значимых заболеваний», государственный контракт № 16.512.11.2241 «Анализ роли поли(АДФ-рибозо)полимеразы 2 в репарации ДНК и поиск ингибиторов, проявляющих селективность к поли(АДФ-рибозо)полимеразам 1 или 2» от 12 июля 2011 года.

В списке литературы публикации, содержащие материал диссертационной работы, выделены жирным шрифтом.

2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ ПРОИЗВОДНЫХ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).

Усниновая кислота (УК), мажорный вторичный метаболит ряда лишайников, привлекает интерес исследователей уже почти два столетия, со времени её выделения из лишайников в 1843 г, поскольку обладает широким спектром биологической активности. Исследования биологической активности претерпевали всплеск интереса в разные периоды. До открытия пенициллина, УК активно исследовалась как антибиотик широкого спектра действия. С окончания Второй мировой войны до конца 1950-х годов, большинство из научных публикаций по УК были связаны с её антимикробной активностью. После 1980-х годов интерес к антибактериальной активности УК был возобновлен из-за множества случаев лекарственной устойчивости, вызванной чрезмерным использованием синтетических антибиотиков. Суммируя результаты этих публикаций, были опубликованы два обзора примерно в одно и то же время (2002 г), достаточно представительно, но кратко представляющие спектр исследованных биологических возможностей УК^{1,2}. Широкое использование УК в биодобавках привело к ряду случаев к интоксикации, после чего исследования сконцентрировались на изучении аспектов её токсичности и в 2008 г опубликован обзор³, акцентированный на этой проблеме. Однако, несмотря на ограничения, накладываемые токсичными свойствами УК, в последние годы интерес к изучению биологических свойств этой молекулы не упал, а использование современных методов исследования позволило расширить сферу применения её биологических свойств и более глубоко и полно раскрыть биологические механизмы её действия. Синтез новых соединений на основе усниновой кислоты, освещённый в недавнем обзоре⁴, и изучение их биологической активности вносят вклад в изучение механизмов биологического действия и открывают новые перспективы использования этого замечательного соединения в фармакологии.

В обзоре биологической активности УК и её производных представлены суммирование данных публикаций последнего десятилетия, сравнение их с ранее опубликованными данными, привлечение неохваченных ранее областей применения усниновой кислоты. В обзор вовлечены новые данные о механизмах действия усниновой кислоты на живые организмы, показаны возможности изменения её биологической активности путём изменения её биодоступности. Особое внимание уделено перспективам использования её полусинтетических производных в качестве фармакологических агентов, проанализированы данные о влиянии энантиомерной чистоты УК на её биологическую активность.

Представленные в настоящем обзоре данные были недавно опубликованы нами в виде двух обзорных статей в журнале «Биоорганическая химия» (Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф.

Биологическая активность усниновой кислоты и ее производных. Часть 1. Активность в отношении одноклеточных организмов // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. - № 2. – С. 129-149; Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. Биологическая активность усниновой кислоты и ее производных. Часть 2. Действие усниновой кислоты и ее производных на высшие организмы, молекулярные и физико-химические аспекты биологической активности // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. - № 3. – DOI: 10.7868/S0132342316030106).

2.1 Абсолютная конфигурация усниновой кислоты

Прежде чем обсуждать в сравнении биологическую активность двух энантиомеров УК, существует необходимость осветить вопрос об определении абсолютной конфигурации асимметрического центра. В мировой литературе существуют разночтения по этому поводу. Исследователи разных лет приписывали или *S*-конфигурацию (+)-УК (серия работ 1976-1984 гг Кутней и соавт.⁵; он-лайн каталог Sigma-Aldrich⁶) или же вообще ее не указывали (серия работ Такахаши и соавт.⁷). Авторами работы⁸ с целью установления абсолютной конфигурации асимметрического центра УК было осуществлено взаимодействие (+)-УК ((+)-1) с *S*-1-фенилэтиламином и на основании результата эксперимента асимметрическому центру приписана *R*-конфигурация (соединение (+)-2, рис. 1). Однако, в публикации не были приведены данные рентгеноструктурного анализа.

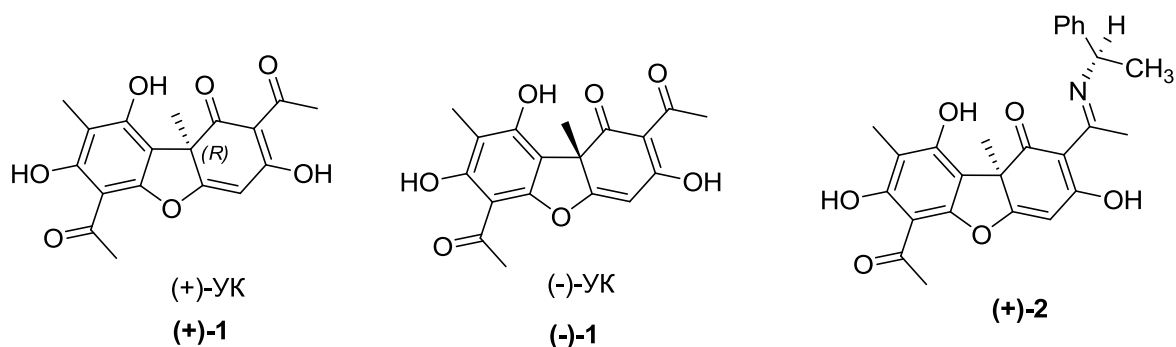


Рисунок 1. Абсолютная конфигурация энантиомеров усниновой кислоты и соединения (+)-2.

В работах⁹ опубликованы уже подтвержденные методом РСА данные. Авторы изображают (+)-УК с *R*-конфигурацией и публикуют рентгеноструктурные данные соответствующего продукта реакции (+)-УК с оптически активным циклогександиамином (соединение (+)-3, рис. 2).

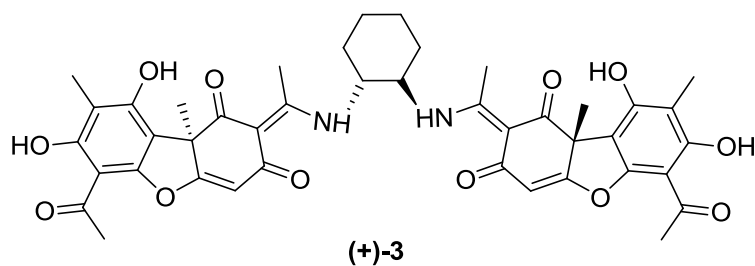


Рисунок 2. Абсолютная конфигурация соединения (+)-3.

Однако, несмотря на однозначность этих данных, до сих пор многие исследователи изображают (+)-УК и её производные с *S*-конфигурацией асимметрического центра, по-видимому, опираясь на ошибочное её изображение в каталоге Sigma-Aldrich. В данном обзоре по необходимости внесены коррективы в изображения структур, соотнеся структуру (+)-УК с *R*-конфигурацией асимметрического центра (рис. 1).

2.2 Антибактериальная активность усниновой кислоты и её производных

Антибактериальная активность УК широко известна, оба её энантиомера проявляют в разной, но сравнимой степени активность в отношении многих бактерий. Большинство исследователей сходятся в том, что УК заметно более активна в отношении грамположительных микроорганизмов. Подразделение бактерий по особенностям строения клеточной стенки связано с различной её проницаемостью и, следовательно, возможной вариабельностью их окраски в тот или иной цвет по методу Грама. Клеточная стенка грамположительных бактерий плотно прилегает к цитоплазматической мембране, массивна, её толщина находится в пределах 20—100 нм. Для нее характерно наличие тейхоевых кислот, они связаны с пептидогликаном и представляют собой полимеры трехатомного спирта — глицерина или пятиатомного спирта — рибита, остатки которых соединены фосфодиэфирными связями. Тейхоевые кислоты связывают ионы магния и участвуют в транспорте их в клетку. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее 14—17 нм. Внутренний слой — пептидогликан, который образует тонкую (2 нм) непрерывную сетку, окружающую клетку. Внешний слой клеточной стенки — наружная мембрана — состоит из фосфолипидов, липополисахарида, липопротеина и белков. В наружной мембране содержатся белки основы (матричные), они прочно связаны с пептидогликановым слоем. Одной из их функций является формирование в мембране гидрофильных пор, через которые осуществляется диффузия молекул.

Наиболее распространенные методы исследования антибактериальной активности — дискодиффузионный метод и метод серийных разведений. Чаще всего используется вариация дискодиффузионного метода - метод бумажных дисков (бумажный диск

пропитывается антибактериальным агентом в определённой концентрации и помещается на заражённую среду), этот метод позволяет получить качественные данные - ингибирует ли рост бактерий вещество в определённой концентрации. Количественно можно судить об антибактериальной активности по диаметру зоны ингибирования роста микроорганизмов вокруг бумажного диска, либо же при использовании набора дисков с различной концентрацией агента определить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК). Более современный метод серийных разведений позволяет непосредственно определить количественный показатель антибактериальной активности МИК для любой степени подавления роста бактерий. Разница в результатах тестирования антибактериальной активности УК зачастую зависит от используемого метода. Соответственно и данные в литературе приведены либо в величине диаметра ингибируемой зоны, либо в МИК с указанием степени ингибирования роста, либо же приведены в качественном виде в соответствии с используемыми авторами методами.

Серия работ по изучению антибактериальной активности УК проводилась в середине 20 века, к ним относятся публикации Шибата и соавт.¹⁰, Маршак и соавт.¹¹, Мёзе и соавт.¹², Клоза и соавт.^{13,14}. Тестирование проводили методом бумажных дисков, соответственно антибактериальная активность УК (как правило, тестировали неизвестный энантиомер) подтверждена скорее на качественном уровне. Данные этих исследований суммированы в обзорах^{1,2}. Исследованные бактерии – *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *E. coli*, ингибирующая активность отмечена только в отношении первых двух видов грамположительных микроорганизмов.

Следующую волну интереса к антибактериальной активности открыли публикации Гхионе и соавт.¹⁵, Грассо и соавт.¹⁶ и Лаутервейн и соавт.¹⁷. В этих работах определяли количественно МИК УК, авторы работ¹⁵ и ¹⁷ изучали активность обоих энантиомеров. Кроме того, в последней работе исследовано действие (+)- и (-)-УК в отношении штаммов *Staphylococcus aureus*, резистентных к метициллину и мупироцину, и подтверждена их чувствительность к действию УК. Последовавшие за этим публикации посвящены антибактериальной активности только одного, наиболее доступного и зачастую более активного, энантиомера (+)-УК: Таы и соавт.¹⁸, Юан и соавт.¹⁹, Паудел и соавт.²⁰, Ранкович и соавт.²¹, Кокубун и соавт.²², Манойлович и соавт.²³, Сегаторе и соавт.²⁴, Векессер и соавт.²⁵, Ело и соавт.²⁶, Зизович и соавт.²⁷, Иванова и соавт.²⁸, Султана и соавт.²⁹, Мациаг-Дорсзынска и соавт.³⁰. Целью этих работ было расширение спектра исследованных микроорганизмов и исследование действия (+)-УК в отношении антибиотико-устойчивых штаммов. Минимальная ингибирующая концентрация в отношении большинства бактерий варьировалась от 2 до 16 мкг/мл. Практически все антибиотикоустойчивые штаммы

Staphylococcus spp и *Streptococcus spp* оказались чувствительны к действию (+)-УК. Однако, в работе³¹ впервые выявлена устойчивость к действию (+)-УК метициллин-резистентного штамма стафилококка.

Среди чувствительных к действию УК грамположительных микроорганизмов бактерии рода *Staphylococcus*: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. pseudintermedius*, рода *Streptococcus*: *S. faecalis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. macedonicus*, рода *Enterococcus*: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. galenarum*, рода *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, рода *Corynebacterium*: *C. amycolatum*, *C. pseudodiphthericum*, фитопатогенная *C. michiganense*³², а также *Propionibacterium acnes*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Peptococcus magnus*, *Clostridium perfringens*. МИК (+)-УК для этих микроорганизмов от 1 до 16 мкг/мл.

В ряду грамотрицательных микроорганизмов чаще не наблюдается чувствительности к действию УК. Это, в первую очередь, условно патогенная *Esherichia coli*, а также ряд других микроорганизмов: синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa*, фитопатогенная *Pseudomonas syringae*³², *Pseudomonas maltophilia*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteridis*, *Veillonella parvula*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Vibrio harveyi*, *Klebsiella pneumonia*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Aeromonas hydrophila*, *Eubacterium rangiferina*.³³ Однако, обнаружены грамотрицательные бактерии, чувствительные к бактерицидному действию УК, среди них микроорганизмы рода *Bacteroides* (*B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ruminicola*, *B. loeschii*) (МИК 1-8 мкг/мл), *Proteus vulgaris* (МИК 36 мкМ), *Yersinia enterocolitica* (МИК 18 мкМ), палочка Плаута *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* (МИК (+)-УК для последних трёх 1-2 мкг/мл²⁵). Очень любопытно также, что УК оказывает значительное ингибирующее действие на грамотрицательную бактерию *Helicobacter pylori*³⁴. Сафак и соавт.³⁵ установили, что УК оказывает значительное дозозависимое действие на *Helicobacter pylori* с МИК₅₀ 0.064 мкг/мл, МИК₉₀ 4 мкг/мл.

Значительный ингибирующий эффект УК наблюдался в отношении термо- и кислотоустойчивых микроорганизмов рода *Sulfolobus*³⁶ - *S. acidocaldanius* и *S. solfataricus*. Эти организмы относятся к домену *Археи*, строение их клеточной стенки сильно отличается от стенок прокариот и эукариот наличием глицерин-эфирных липидов, с устойчивой к действию кислот и температуры эфирной связью. И (+)- и (-)-УК ингибируют рост этих археобактерий в концентрации 0.7 мкг/мл, что на порядок ниже ингибирующей концентрации, типичной для прокариот.

Работы по антибактериальной активности (-)-УК немногочисленны, что связано, по-видимому, с её меньшей природной распространённостью и, соответственно, меньшей

коммерческой доступностью. Наиболее представительной является работа¹⁷, где впервые проведено сравнение действия обоих энантиомеров УК в отношении широкого спектра анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Активность обоих энантиомеров была либо равной, либо незначительно активнее была (+)-УК. Грассо и соавт.¹⁶ испытывали на добровольцах зубную пасту, содержащую отдельно каждый из энантиомеров УК. Исследования показали, что (+)-УК эффективнее, чем левовращающий энантиомер, в отношении *Streptococcus mutans*. Работы^{37,38,39} также выявили неплохую ингибирующую активность (-)-УК в отношении и грамположительных, и грамотрицательных микроорганизмов. Особняком стоит работа³⁷, в которой определены очень низкие минимальные ингибирующие концентрации (-)-УК в отношении *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, и даже грамотрицательных *Proteus vulgaris* и *Aeromonas hydrophila*, но в публикации отсутствуют данные об активности правовращающего энантиомера.

Качественно новым этапом исследований стало изучение практического применения УК как антибиотика - воздействие на образование биоплёнок микроорганизмов *S. aureus*⁴⁰, *Cobetia marina* и *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*⁴¹. Исследования показали, что УК в концентрациях 30-40 мкг/мл препятствует формированию биоплёнок *S. aureus* и *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, но не оказывает влияния на *Cobetia marina*.

Франколини и соавт.⁴² тестировали антибактериальную активность УК в отношении биоплёнок ряда бактерий на медицинском полиуретане, Ким и соавт.⁴³ - биоплёнок метициллин устойчивого золотистого стафилококка на костном цементе, Грумезесцу и соавт.⁴⁴ - на титановых имплантатах, Лабиб и соавт.⁴⁵ - на полимерных имплантатах для барабанных перепонок. Во всех вышеупомянутых публикациях сообщено, что (+)-УК практически полностью подавляет рост биоплёнок *S. aureus*, однако, не препятствует росту грамотрицательных *Pseudomonas aeruginosa*⁴².

Ряд публикаций посвящён изучению совместного с антибиотиками действия УК. Лазар и соавт.⁴⁶ показали, что УК значительно снижает устойчивость микроорганизмов *S. aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам. И синергетическое, и антагонистическое действие УК наблюдали *in vitro* Сегаторе и соавт.²⁴ для антимикробной активности против метициллин-устойчивого клинического изолята золотистого стафилококка при использовании комбинации УК с пятью терапевтически доступными антибиотиками. Лабиб и соавт.⁴⁵ успешно использовали комбинацию ципрофлоксацина и (+)-УК для предотвращения роста биоплёнок на ушных имплантатах. Синергизм между УК и кларитромицином против штаммов грамотрицательного микроорганизма *H. pylori* наблюдали Сафак и соавт.³⁵. Отсутствие синергетического эффекта при действии (+)-УК в комбинации с пенициллином и тетрациклином на *S. aureus*, *S. epidermidis* и *Enterococcus faecalis* отметили в

работе⁴⁷, при этом в отношении *S. haemolyticus* наблюдалось антагонистическое действие (+)-УК и пенициллина.

Попытки улучшить антибактериальную активность УК предпринимались путём использования средств доставки агента. В качестве средств доставки авторы работы⁴⁸ использовали наноструктуры на основе магнетита (Fe_3O_4) и УК. Исследования, проводимые в отношении роста ряда бактериальных культур и развития биопленок *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E.coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, показали, что исследуемые наноконпозиты обладают более высокой в сравнении с УК антимикробной активностью в отношении *Enterococcus faecalis* и *E.coli*. Наноструктуры также проявляют значительное ингибирующее действие на биопленки, образованные золотистым стафилококком *S. aureus* и *Enterococcus faecalis* в широком диапазоне концентраций, тогда как в отношении грамотрицательных микробных штаммов действуют только при высоких концентрациях, либо вообще не проявляют ингибирующее действие (для биопленки синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*).

Комплексы включения УК в β -циклодекстрин⁴⁹, хотя повысили водорастворимость (авторы подразумевали и биодоступность), не показали увеличения антибактериальной активности в отношении золотистого стафилококка *S. aureus*. Хотя инкапсуляция этих комплексов в липосомы даёт эффект пролонгации антибактериального действия. Подтвердили отсутствие повышения антибактериальной активности при комплексообразовании с ЦД в работе⁵⁰. Растворимость в воде действительно улучшилась, однако, МИК по отношению к *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* и *E. faecalis* вырос в 2-4 раза, по отношению к *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* (последние три не чувствительны к действию УК) – величина МИК не изменилась. Коллоидные частицы на основе поливинилбензилхлорида, связанного с (+)-УК тестировали в отношении микроорганизмов *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* и *Klebsiella pneumonia* авторы работы⁵¹. Выявлена высокая антибактериальная активность, МИК достигает 0.12 мг коллоида/мл. Полимерные частицы активны даже в отношении *P. aeruginosa* и *E. coli*, нечувствительных к действию самой (+)-УК, минимальная бактерицидная концентрация (МБК) агента составила 0.94 и 3.75 мг коллоида/мл соответственно. Авторы предполагают, что коллоидная структура улучшает проницаемость бактериальной стенки микроорганизмов.

Безусловно, многие авторы проводили эксперименты по выяснению механизма антибактериальной активности УК. Ещё в 1950 г. Джонсон и соавт.⁵² было проведено исследование с целью выявить механизм антибактериального действия УК. В экспериментах

на клетках млекопитающих авторы установили, что УК действует аналогично другим разобщителям окислительного фосфорилирования, таким как динитрофенол и грамицидин, вызывая значительный ингибирующий эффект в концентрации 8×10^{-6} М. В то же время, в статье отмечается значительная разница в проницаемости для УК бактериальных клеток и клеток млекопитающих, что предполагает определённый терапевтический потенциал УК.

В работе⁵³ сообщалось, что УК ингибирует синтез М протеина грамположительных бактерий *Streptococcus spp* в той же концентрации (10 мкг/мл), в которой ингибирует их рост. М протеин, вырабатываемый бактерией, является основным фактором её вирулентности и помогает микроорганизму проникать в клетку хозяина. Результаты исследований, скорее всего, свидетельствуют о том, что ингибирование синтеза этого белка вносит существенный вклад в бактериостатическое действие УК. Наблюдается определённое влияние УК на содержание нуклеиновых кислот в бактериях. Миура и соавт.⁵⁴ сообщают о накоплении РНК в бактериальных клетках *S. pyogenes* (наблюдается бактериостатическое действие УК) и *E. coli* (нет эффекта). В работе³⁰ показано, что УК быстро и эффективно ингибирует синтез РНК и ДНК в грамположительных микроорганизмах *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, слабо ингибирует этот процесс, либо же не оказывает на него влияния в граммотрицательных *Vibrio harveyi* и *E. coli* соответственно. Гупта и соавт.³⁹ сообщают о разрушающем действии УК на бактериальную мембрану *Staphylococcus aureus*.

В последнее десятилетие были опубликованы исследования, сообщающие о ещё одном аспекте антибактериального действия УК. Лазар и соавт.⁴⁶ предполагают, что причиной бактерицидного действия УК наряду с повреждением клеточных стенок, является нарушение чувства кворума микроорганизмов. Франколини и соавт.⁴² также выдвигают теорию о влиянии УК на чувство кворума микроорганизмов. А авторы работы⁵⁵ использовали УК в качестве компонента ранозаживляющей повязки, предполагая именно такой (ингибитор чувства кворума) эффект её действия.

Суммируя опубликованные результаты, следует заметить, что наиболее выражена антибактериальная активность УК в отношении грамположительных микроорганизмов. Меньшая активность по отношению к граммотрицательным бактериям связана, видимо, с меньшей проницаемостью их мембран с гидрофильными каналами для липофильной УК. Действие обоих энантиомеров отличается незначительно, отмечена несколько большая активность (+)-УК. Основным механизмом бактерицидного действия УК исследователи, как правило, называют ингибирование окислительного фосфорилирования, среди факультативных способов влияния - повреждение клеточных стенок и нарушение чувства кворума микроорганизмов.

Поиск производных УК, обладающих улучшенной активностью в сравнении с самой УК, начался одновременно с изучением активности самой УК, в 50-х годах прошлого века. Изучение антибактериального действия таких соединений, в том числе, помогает понять механизмы биологической активности УК.

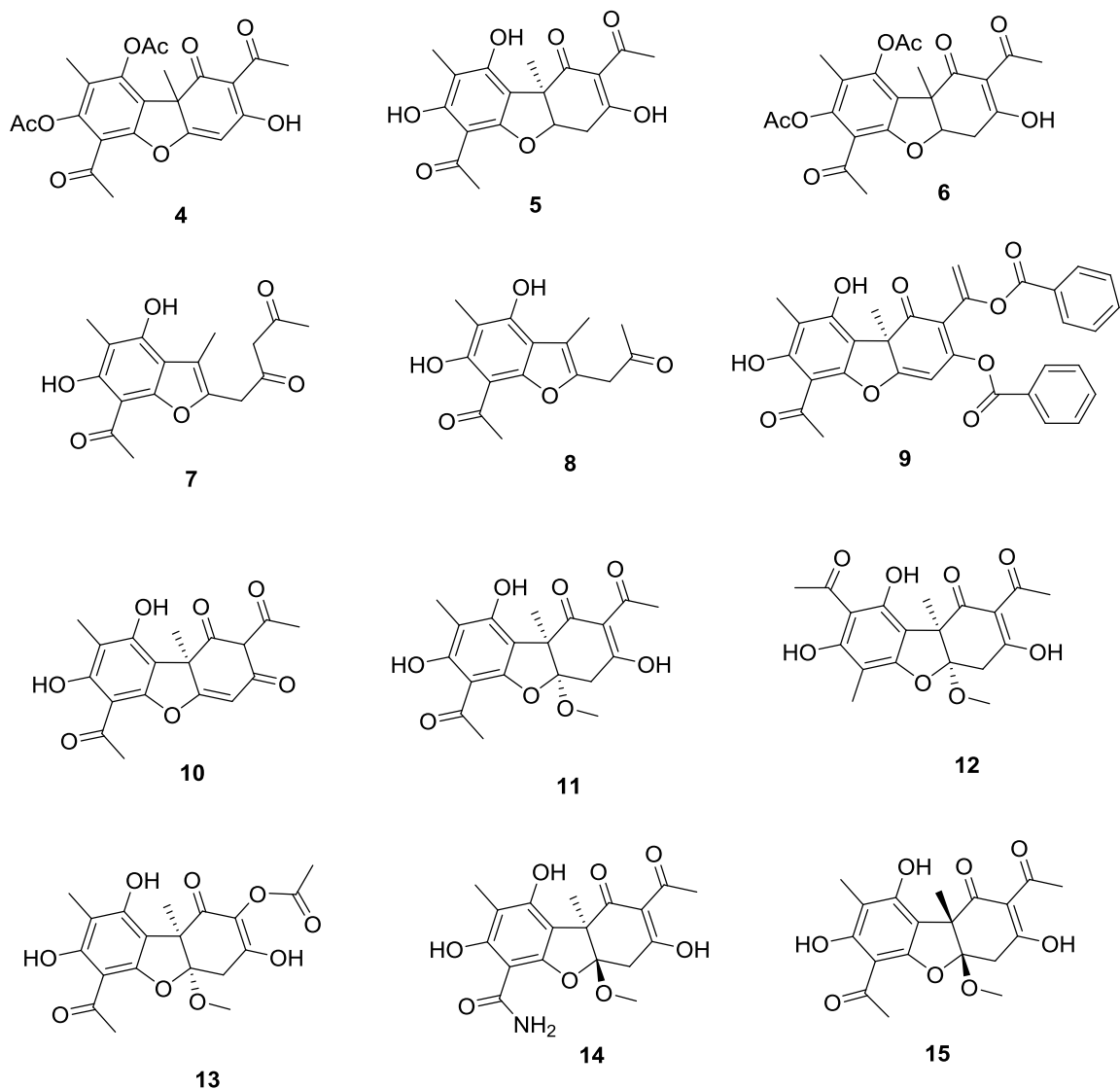


Рисунок 3. Производные усниновой кислоты, тестированные на антибактериальную активность.

Шибата и соавт.¹⁰ изучали активность в отношении *S. aureus* наряду с обоими энантиомерами УК ряда их производных: натриевых солей, диацетил- (4), дигидро- (5) и диацетилдигидроусниновых кислот (6), а также некоторых соединений, полученных деструкцией УК (8 и 9, рис. 3). Активность, сравнимую с активностью УК, показали только соответствующие натриевые соли, все другие соединения оказались значительно менее эффективны, их бактерицидное действие уменьшается на порядок, и даже на два для соединений с деструктурированным кольцом С.

Авторы работы⁵⁶ методом бумажных дисков подтвердили, что и дигидроусниновая кислота (**5**), и её диацетат (**6**) (рис. 3) значительно менее активны в отношении *S. aureus*. Также менее активна, чем УК, её дибензоат (**9**)⁵⁷. Другой структурный вариант с нарушением сопряжения в трикетонной системе кольца С проявил более высокую антибактериальную активность: природное близкородственное УК соединение уснон А (**10**)⁵⁸ показало значительное ингибирующее действие в отношении *Salmonella typhi* (в отношении которой УК не активна) и *Pseudomonas aeruginosa*.

Сасса и соавт.⁵⁹ выделили родственные УК соединения из фитопатогенного гриба *Mycosphaerella nawae*. Антибактериальная активность соединений **11** и **12** в отношении грамположительных бактерий *S. aureus*, *B. subtilis* одинакова (МИК 6.2 мкг/мл) и сравнима с активностью УК. Как и УК, они неактивны в отношении *E. coli*. Соединение **13**, сопряжение трикетонной системы в котором разрушено, оказалось неактивным в отношении всех исследованных бактериальных культур. Дибензофурановые соединения **14** и **15** (фомодион)⁶⁰ (рис. 3) также не отличаются по МИК от УК в отношении *E. coli* (> 500 мкг) и *S. aureus* (1.6-2.0 мкг/мл).

В серии статей 1954-1956 гг Виртанен и соавт.⁶¹ пытались подтвердить идею о том, что комбинация в одной молекуле двух антибактериальных фрагментов существенно увеличит целевую активность. Авторами синтезирован ряд производных, полученных взаимодействием экзоциклической карбонильной группы в кольце С УК с аминогруппой соединений, обладающих известной антибактериальной активностью. И, действительно, исследования авторов в отношении *S. aureus*, *Bacteroides spp*, *E. coli* в ряде случаев дали снижение действующей антибактериальной концентрации агента в несколько раз, по сравнению с концентрацией УК. Однако, следует отметить, что авторы не приводят данных по установлению структуры и чистоте новых соединений и потому невозможно определить, что является действующим началом - композиция ли веществ, либо же действительно полусинтетические производные.

Работа Томаси и соавт.⁶² касается синтеза конъюгатов (+)-УК с полиаминами, также проходящей с модификацией кольца С. Многие из полученных соединений **16-17** (рис. 4) оказались заметно активнее (+)-УК в отношении *S. aureus* и *Listeria monocytogenes*. Кроме того, авторами выявлена корреляция антибактериальной активности соединения с удлинением цепи заместителя – наиболее активны енамины с коротким линкером.

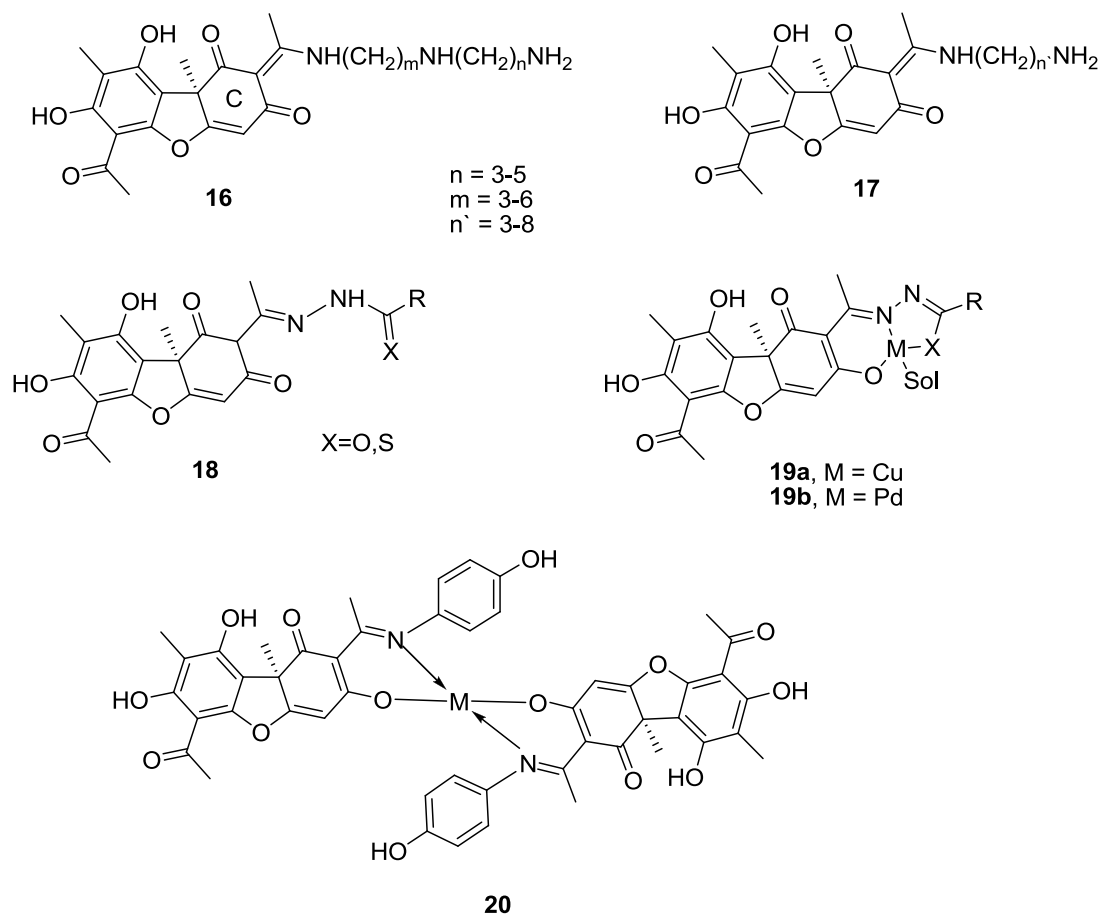


Рисунок 4. Производные усниновой кислоты, тестированные на антибактериальную активность.

С другой стороны, енаминопроизводные УК с гидразидами (**18**) (рис. 4) оказались в несколько раз менее активны, чем УК⁶³. Однако, Белянски и соавт.⁶⁴ установили, что антибактериальную активность этих соединений можно увеличить комплексообразованием с ионами металлов. Все производные УК с гидразидами могут служить тридентатными лигандами. Комплексы гидразидов (+)-УК с медью (**19a**) показали значительную активность в отношении *S. aureus* (МИК 6.5-7.3 мкМ/мл), существенно более высокую, чем свободные гидразиды **18**, и оказались в 2 раза активнее, чем сама (+)-УК. Ингибирующая активность в отношении грамотрицательной *E. coli* также увеличивается, но незначительно. Авторы предполагают, что увеличению активности способствует наличие у металла в структуре комплекса вакантной орбитали, способствующей связыванию с внутриклеточным лигандом, например, ДНК или белком.

Подобные же мономерные комплексы, в которых ионом металла наряду с медью выступал Pd (II) (**19b**), были синтезированы Натич и соавт.⁶⁵ и протестированы *in vitro* на ингибирующую рост микроорганизмов активность на культурах *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus subtilis*, в отношении которых (+)-УК неактивна. Авторы установили,

что все синтезированные комплексы обладают значительной антибактериальной активностью, но комплексы с палладием более активны, чем с медью.

Ещё один пример повышения антибактериальной активности производных путём образования металлокомплексных соединений приведён в работе⁶⁶. Авторами были синтезированы гидроксифенилиминопроизводные УК (*орто*-, *мета*- и *пара*-) и получены их комплексы с Cu, Co, Ni и Mn. При исследовании антибактериального действия соединений диско-диффузионным методом в отношении 8 патогенов (*Enterobacter aerogenes*, *Bacillus brevis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*) наибольшую активность проявили комплексы *пара*-гидроксифенилиминопроизводного УК с Cu и Mn (20). Повышение антибактериальной активности наблюдается также при переходе от свободного лиганда к комплексам в ряду *орто*- и *мета*-замещённых гидроксифенилиминопроизводных УК.

Таким образом, исследования антибактериальной активности родственных УК соединений свидетельствуют о важной роли трикетонной системы в механизме антибактериального действия УК; ее полное разрушение однозначно приводит к падению активности. С другой стороны, модификация этого фрагмента в дикетоненаминовый в ряде случаев позволяет синтезировать соединения с более высокой антибактериальной активностью, особенно при использовании комплексов этих производных с ионами переходных металлов.

2.3 Антимикобактериальная активность усниновой кислоты и её производных

Микобактерии не являются грамположительными бактериями с эмпирической точки зрения (то есть большая часть видов не прокрашивается достаточно хорошо), но они классифицируются как кислотоустойчивые грамположительные бактерии в связи с отсутствием у них внешней клеточной мембраны. Все виды рода *Mycobacterium* характеризуются особой клеточной стенкой, более тонкой, гидрофобной, с наличием в ее составе большого количества восков и липидов (до 60%), что предопределяет их устойчивость к дезинфицирующим веществам, солнечным лучам или к высушиванию. По своей устойчивости, после спорообразующих бактерий, они занимают лидирующее место в царстве прокариот. Наиболее известным представителем рода *Mycobacterium* является *M. tuberculosis*, вызывающая туберкулёз. Микобактерии туберкулёза устойчивы к органическим и неорганическим кислотам, щёлочам, многим окислителям, а также к ряду антисептических и дегидратирующих веществ, оказывающих губительное действие на другие патогенные микроорганизмы. Отмечено, что даже средства на основе четвертичного аммония не

проявляют антимикобактериальной активности⁶⁷. Всё это в комплексе позволяет считать поиск соединений с антимикобактериальными свойствами особо актуальным.

Первые данные, подтверждающие качественную активность УК в отношении *M. tuberculosis*, были приведены более 60 лет назад (Маршак и соавт.^{68, 69}, Шибата и соавт.¹⁰, Столл и соавт.⁷⁰, Клоза и соавт.⁷¹, Вартия и соавт.⁷², Столл и соавт.⁷³). Авторы работы⁷² сообщили об ингибирующем действии (-)-УК против штаммов туберкулезных бацилл и определили её действующую концентрацию, ингибирующее действие проявлялось в разведении 1:60 000, что соответствует концентрации 16.6 мкг/мл. Шибата и соавт.¹⁰ установили, что в отношении *M. tuberculosis* активны оба энантиомера УК, причём в большем разведении - 1/160000 (6.25 мкг/мл), также действуют и натриевые соли обоих энантиомеров УК. Столл и соавт.⁷³ расширили спектр видов исследованных микобактерий (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. spec.*, *M. phlei*) и показали, что и (+)-, и (-)-УК активны в отношении всех микобактерий в ещё большем разведении 1:400 000-1:200 000 (2.5-5 мкг/мл). Причём для разных штаммов микобактерий концентрации (+)- и (-)-УК незначительно различаются. Маршак и соавт.⁶⁹ проводили эксперименты *in vivo* на морских свинках, использованная доза УК составила 20 мг на животное (400 г). Авторы показали, что при совместном применении УК и стрептомицина (1-3 мг) наблюдается синергетический антимикобактериальный эффект и высказали предположение об ингибирующем действии УК на ДНКазу микобактерий.

Пересмотр этих данных с использованием более современных методов исследования провели в 1998 г. Ингольфсдоттир и соавт.⁷⁴. Было установлено, что (+)- УК проявляет активность в отношении *M. aurum*, непатогенного микроорганизма со сходным *M. tuberculosis* профилем чувствительности, при этом значение МИК составило 32 мкг/мл, что не согласуется с исследованиями середины 20 века (2.5-5 мкг/мл) и говорит о её весьма посредственной антимикобактериальной активности. Позднее, более оптимистичные данные получили Кёниг и соавт.⁷⁵ (сообщается о МИС (+)-УК в отношении *M. tuberculosis* H37Rv 16 мкг/мл), Тосун и соавт.⁷⁶ (12.5 мкг/мл) и Тасдемир и соавт.⁷⁷ (5.2 мкг/мл). Невысокое значение МИК УК в отношении *M. tuberculosis* H37Rv (62.5 мкг/мл) в сравнении с предыдущими исследованиями наблюдали авторы работы⁷⁸. Иванова и соавт.²⁸ сообщают, что в отношении *M. smegmatis*, непатогенного родственника *M. tuberculosis*, УК вообще неактивна. Большинство авторов объясняют наблюдаемые различия в измерениях использованием разных методов тестирования.

В связи с повсеместным распространением штаммов *M. tuberculosis*, устойчивых к широкому спектру известных противотуберкулёзных препаратов, в последние годы особое внимание привлекают публикации о соединениях, обладающих активностью в отношении

таких штаммов. Рамос и соавт.⁷⁹ тестировали антимикробную активность УК в отношении клинических изолятов *M. tuberculosis*, устойчивых к известным противотуберкулёзным препаратам - изониазиду (INH), стрептомицину (SMR) и рифампицину (RMP). МИК УК в отношении этих штаммов составил H37Rv 12.25 мкг/мл, INHr 1.56 мкг/мл, SMRr 6.25 мкг/мл, RMPr 12.5 мкг/мл соответственно. Особенно следует отметить высокую активность УК, почти на порядок превышающую активность к традиционному штамму, проявляемую по отношению к изониазидустойчивой *M. tuberculosis*. Кроме того, авторы провели исследования на четырёх других микобактериальных штаммах, которые приобрели широкую известность как инфекционные агенты в последние несколько лет. Среди них медленно растущие виды *M. avium* и *M. kansasii*, которые чаще всего связаны с распространением легочной инфекции среди иммуноослабленных и пожилых пациентов, и быстрорастущие *M. fortuitum* и *M. chelonae* (связаны с инфекцией мягких тканей и скелета). МИК УК составил от 12.5 до 100 мкг/мл, что, хотя и выше противотуберкулёзной действующей концентрации, но также имеет ценность, поскольку в традиционной медицине отсутствуют эффективные и хорошо переносимые антибиотики для лечения этих инфекций. В попытках определить механизм антимикобактериального действия УК авторы установили только факт, что УК не выводится из клеток эффлюкс-системами. Высокую антимикобактериальную активность (+)-УК в отношении ряда микобактерий также подтвердили Лукарини и соавт.⁸⁰. МИК (+)-УК против *M. tuberculosis* и *M. kansasii* составили 8 мкг/мл, в отношении *M. avium* - 16 мкг/мл.

Лира и соавт.⁴⁹, была предпринята попытка улучшить антимикобактериальную активность УК путём использования липосом в качестве средств доставки. Достигнутый эффект был незначительным, МИК в отношении *M. tuberculosis* H37Rv УК и УК-LIPO (УК, инкапсулированная в липосомы) составили 6,5 и 5,8 мкг/мл соответственно. Однако, авторам удалось снизить минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) в два раза с 32 до 16 мкг/мл.

Единственная попытка по тестированию антимикобактериальных свойств производных УК не увенчалась успехом. Шибата и соавт.¹⁰ установили, что диацетил- (4), дигидро- (5) и диацетилдигидро- (6) производные УК (рис. 3) теряют активность по отношению к *M. avium* в 2-16 раз в сравнении с УК.

Суммируя литературные данные, следует отметить, что УК действительно проявляет значительную антимикобактериальную активность, при этом существенных различий в действии её энантиомеров не отмечено. Высокая активность УК в отношении микобактерий может быть связана с её липофильностью, что косвенно подтверждается отрывочными данными об антимикобактериальном действии производных УК.

2.4 Фунгицидное действие усниновой кислоты и её производных

Поскольку известно, что УК продуцируется микобионтом водорослей⁸¹, то неудивительно, что фунгицидная активность УК невелика. Однако, некоторые из работ отмечают заметную биологическую активность УК в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

Одна из первых работ 1967 г.⁸² сообщает, что УК в дозах 60-200 мкг/мл подавляет рост грибов *Absidia blakesleeana*, *Basidiobolus ranarum*, *Ascoidea rubescens*, *Chaetomium globosum*, *Sordaria fimicola*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus clavatus*, *Botrytis cinerea* и не оказывает влияния на *Actinomucor repens*, *Circinella muscae*, *Conidiobolus villosus*, *Cunninghamella echinulata*, *Geopyxis cupularis*, *Morchella angusticeps*, *Taleromyces verniculatis*, *Corticium fuciforme* и *Lentinus lepideus*. Из анализа литературных данных очевидно, что результаты разных работ по активности в отношении, например, грибка, вызывающего молочницу - *Candida albicans*, существенно разнятся. Работы³⁷ и¹⁸ выявили хорошую фунгицидную активность (+)- и (-)-УК в отношении *Candida albicans* и *Candida glabrata*. Векесер и соавт.²⁵, наоборот, не обнаружили действия УК на грибы рода *Candida*, отметив лишь ингибирующее влияние (+)-УК на другой дрожжеподобный грибок *Malassezia furfur*. В работе²¹ также выявлена незначительная активность в отношении как дрожжеподобных грибов *Candida*, так и целого ряда плесневых *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*. Умеренное фунгицидное действие в отношении плесневого гриба *Fusarium* (100 мкг/мл УК – 51% ингибирования) отмечали Кардарелли и соавт.⁸³, в этой же работе никакого токсического эффекта УК на пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* в концентрациях до 300 мкг/мл не отмечалось. Авторы работы³¹ определили, что МИК УК в отношении *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Microsporum gypseum* превышает 250 мкг/мл. И лишь в отношении *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton mentagrophytes* минимальная ингибирующая концентрация ниже и составляет 100 и 200 мкг/мл соответственно.

УК из *Lecanora muralis* проявляет умеренное ингибирующее действие в дозе 50 мкг/образец на рост грибов *Ustilago violacea* (головневые грибы), *Mycotypha microspora*, *Eurotium repens*, но не оказывает влияния на *Fusarium oxysporum*⁷⁵. Ковальски и соавт.⁸⁴ сообщили, что УК также не влияет на рост фитопатогенных грибов *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *americana* и *Sclerotinia sclerotiorum*. Сообщается⁸⁵, что УК ингибирует рост дереворазрушающих грибов *Fomes pinicola*, но в отношении другого вида *Allescheria terrestris*,

наоборот, стимулирует деструктивное действие грибов в испытанных концентрациях. Одна из последних работ⁸⁶ приводит минимальные фунгицидные концентрации (+)-УК в отношении недавно открытых грибов рода *Candida* – *C. orthopsilosis* и *C. parapsilosis* - 125 мкг/мл и 250 мкг/мл соответственно. Следует отметить, что измеренные ингибирующие концентрации УК значительно ниже, МИК₅₀ составила 2 мкг/мл для обоих видов грибов *Candida*. Интересный эффект наблюдали авторы работы⁸⁷. (+)-УК в концентрациях 10-50 мг/л ингибирует рост *Pisolithus tinctorius*, однако в более высокой концентрации 100 мг/л уже не оказывает влияния на рост этого гриба.

Недавние исследования показали, что использование общепринятых методов доставки не увеличивает ингибирующую активность УК в отношении грибов *Candida*. При использовании комплекса УК с циклодекстрином для обработки двух штаммов гриба *Candida albicans* наблюдаемая активность снизилась, минимальная ингибирующая концентрация комплексов выросла в 2-4 раза⁵⁰. Незначительное увеличение ингибирующей активности наблюдали авторы работы⁵¹ при использовании в отношении грибов *Candida albicans* и *Candida glabrata* коллоидной системы на основе поливинилбензилхлорида с содержанием 10% (+)-УК. МИК (+)-УК при обработке обоих видов грибов составил 0.8 мг/л. Коллоид с содержанием (+)-УК 25% показывает более высокую ингибирующую активность со значениями МИК 0.12 и 0.47 мг/л соответственно.

Некоторые авторы отмечают, что из двух энантиомеров УК более активна (-)-УК. Так, в работе⁸⁸ отмечено, что (+)-УК неактивна в отношении *Penicillium frequentans* и *Verticillium albo-atrum*, а (-)-УК – ингибирует их рост, хотя и в высокой концентрации - 100 мкг/диск. Ту же тенденцию наблюдали Халама и соавт.⁸⁹. Оба энантиомера УК (используемая концентрация $0.5 \cdot 10^{-5}$ М) тестировали в отношении фитопатогенных грибов *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans* и *Ustilago maydis*. (-)-УК ингибирует рост *Phytophthora infestans* и *Ustilago maydis*, (+)-УК не оказывает такого эффекта. В отношении *Pythium ultimum* неактивны оба энантиомера.

Де Баттисти и соавт.⁹⁰ показали, что фунгицидная активность УК может оказаться полезной и для клинического использования. В исследовании пациентов с грибковым поражением *Tinea pedis*, 65 человек отметили значительный терапевтический эффект при обработке поражённых поверхностей УК-содержащим препаратом.

Многие авторы отмечают, что химические модификации УК могут заметно усилить противогрибковое действие. Так, авторы работы⁸⁸ заметили, что дигидроусниновая кислота (5, рис. 3) (диастереомерная смесь) показывает широкий спектр активности в отношении *Penicillium cyclopium*, *Penicillium frequentans*, *Talaromyces flavus* и *Trichosporon cutaneum*, тогда как в отношении большинства из этих грибов оба энантиомера УК индифферентны.

Соединения **9** и **10**, также с гидрированной двойной связью в кольце С, выделенные из гриба *Mycosphaerella nawae*⁵⁹, проявляют ингибирующее действие на *Trichophyton asteroides* и *T. rubrus* (МИК 25 мкг/мл). А вот родственное соединение **11** с нарушенным трикетонным фрагментом уже абсолютно не активно в отношении *Trichophyton*. Также не обладают фунгицидной активностью (*Penicillium cyclopium*, *Penicillium frequentans*, *Talaromyces flavus* и *Trichosporon cutaneum*) 1-фенил и 1-изоникотиноил гидразоны УК (**21**, рис 5)⁸⁸.

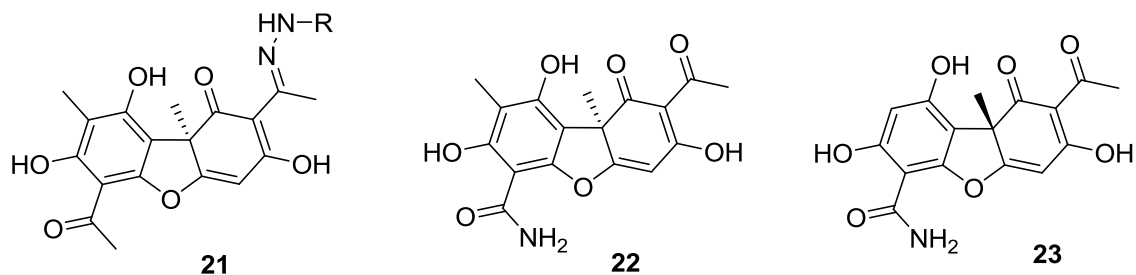


Рисунок 5. Производные усниновой кислоты, тестируемые на фунгицидную активность.

Более активно, чем оба энантиомера УК, в отношении ряда грибов соединение **22** (рис. 5), выделенное из грибов DSM 4431⁹¹. Авторы проводили поиск агентов для защиты листьев растений от фитопатогенных грибов. (+)- и (-)-УК в концентрациях 0.05% (водная суспензия) в отношении *Botrytis cinerea* (серая плесень) и *Pyrenophora teres* действуют одинаково, наблюдаемые поражения листьев составили по 40 и 20% соответственно. Соединение **22**, представляющее собой амид (+)-УК, проявляет более высокую ингибирующую активность, повреждение листьев грибами происходило лишь на 3 и 10% соответственно. Авторами показано, что эфиры этого амида по фенольным гидроксильным группам также обладают фунгицидной активностью.

Родственное УК соединение церкоспорамид (**23**, рис. 5) проявляет хорошую фунгицидную активность⁹². Это соединение заметно активнее и (+)-, и (-)-УК в отношении широкого спектра грибов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*), *Aspergillus sp* и *Saccharomyces cerevisiae* – МИК от 16 до 128 мкг/мл. Кроме того, церкоспорамид проявляет очень высокую активность по отношению к грибам *Trichophyton* (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*) с минимальной ингибирующей концентрацией от 1 до 6 мкг/мл. Амид УК (**22**), выделенный из *Cercosporidium henningsii*, активен только в отношении к грибам *Trichophyton* с МИК от 1 до 4 мкг/мл. Эффективная концентрация амида в отношении остальных исследованных грибов даже выше (больше 512 мкг/мл), чем для обоих энантиомеров УК (более 128 мкг/мл). Хоффман и соавт.⁶⁰ подтвердили, что церкоспорамид (**23**) оказывает ингибирующее влияние также на рост грибов *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *Rhizoctonium solani*. Кроме того авторы выделили дибензофурановое соединение фомодион (**15**, рис. 3) с выраженным фунгицидным

действием. МИК этих соединений в отношении исследованных грибов совпадает и составляет 3, 8 и 8 мкг/мл соответственно.

Некоторое повышение противогрибковой активности наблюдалось для комплексных производных УК с металлами. Так, среди ряда комплексов гидразидных производных УК с металлами, активным в отношении грибка *Aspergillus niger* оказалось лишь комплексное соединение **24** (рис. 6)⁶⁵. Комплексы с Cu, Co, Ni и Mn пара-гидроксифенилиминопроизводного (+)-УК (**20**)⁶⁶ проявили фунгицидную активность в отношении *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*, если же в качестве лиганда использовать производные УК с иным расположением гидроксильной группы (орто- и мета-), наблюдалась лишь незначительная активность.

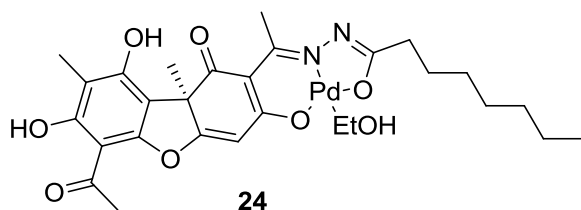


Рисунок 6. Комплексное производное усниновой кислоты, проявившее противогрибковую активность.

Таким образом, многочисленные исследования показали, что активность УК в отношении грибов в целом невысокая (МИК, как правило, больше 250 мкг/мл), в тех случаях, когда ингибирующая концентрация достаточно низкая, фунгицидная всё равно очень высокая. В ряде публикаций отмечена более высокая активность (-)-УК. Химические модификации различных фрагментов УК, как правило, позволяют существенно повысить фунгицидную активность соединений.

2.5 Антипротозойное действие усниновой кислоты и её производных

Очень ценным качеством УК, обнаруженным относительно недавно, является наличие антипротозойной активности, поскольку медикаментозный рынок таких препаратов очень ограничен, а разрешённые в медицине средства высокотоксичны.

В работе Ву и соавт.⁹³ описан сильный дозозависимый эффект (-)-УК *in vitro* на смертность *Trichomonas vaginalis*. Минимальная эффективная концентрация УК составила 0.4 мг/мл, что меньше соответствующей дозы противопротозойного препарата метронидазола (0.6 мг/мл). Исследования антипротозойной активности (+)-УК *in vivo* проводили Фоурнет и соавт.⁹⁴ на мышах, инфицированных тремя штаммами *Leishmania ssp.* Авторы обнаружили, что действие УК наблюдается только при введении дозы 25 мг/кг непосредственно в очаг поражения, пероральное и подкожное введение тех же доз не даёт

какого либо эффекта. Позднее авторы работы³¹ обнаружили, что 100%-ный лизис промастиготной формы *Leishmania amazonensis*, *L. brasiliensis* и *L. Infantum* достигается при действии УК в концентрации 100 мкг/мл.

Де Карвальо и соавт.⁹⁵ изучали влияние различных доз (+)-УК на рост трипаносом, паразитов, ответственных за возникновение сонной болезни и болезни Шагаса. Действие (+)-УК на *Trypanosoma cruzi* в эпимастиготной форме имеет место с дозы 5-30 мкг/мл. При этом наблюдается повреждение митохондрий с заметным увеличением объема кинетопластов и вакуолизация митохондрий. Обработка инфицированных макрофагов более концентрированным раствором (+)-УК (40 или 80 мкг/мл) индуцировала разрушение кинетопластов и митохондрий паразита, но без существенных повреждений клеток хозяина. Также восприимчива к лечению УК оказалась трипомастиготная форма паразита, для воздействия на амастиготную форму потребовались несколько более высокие дозы.

Особое внимание в литературе уделено действию УК в отношении возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*. В 1999 г. Кёниг и соавт.⁷⁵ сообщили об отсутствии антималярийной активности УК. Однако, позднее в работе⁹⁶ была установлена концентрация (+)-УК, ингибирующая рост плазмодия на 50%, она оказалась достаточно высокой и составила 26.1 мкг/мл, что соответствует 75 мкМ. Исследования⁹⁷ обоих энантиомеров УК выявили их заметную антималярийную активность и определили минимальные ингибирующие концентрации (+)-УК и (-)-УК в отношении *Plasmodium falciparum*, которые составили 15 мкМ и 16 мкМ соответственно. Суссманн и соавт.⁹⁸ также определили МИК₅₀ (+)-УК в отношении *Plasmodium falciparum* - 24 мкМ. Кроме того, авторами высказано предположение о механизме противопаразитарного действия. На основании того, что ингибирование роста *Plasmodium*, вызванное УК, может быть частично восстановлено добавлением α -токоферола, авторы предполагают, что при обработке паразитов УК ингибирует гидроксифенилпируватдиоксигеназу (HPPD), что индуцирует перекисное окисление липидов. А витамин Е (α -токоферол) выступает в качестве антиоксиданта, прерывая процесс окисления. Ингибирование биосинтеза витамина Е, необходимого для жизнедеятельности паразита, также может являться мишенью для действия УК.

На основании предположения о роли окислительных свойств УК в механизме её противопаразитарной активности, Бруно и соавт.⁹⁹ были синтезированы производные (+)-УК с изменённым трикетонным фрагментом (участвует в механизме цитотоксичности) и сохранённой фенольной частью, ответственной за окислительно-восстановительные свойства.

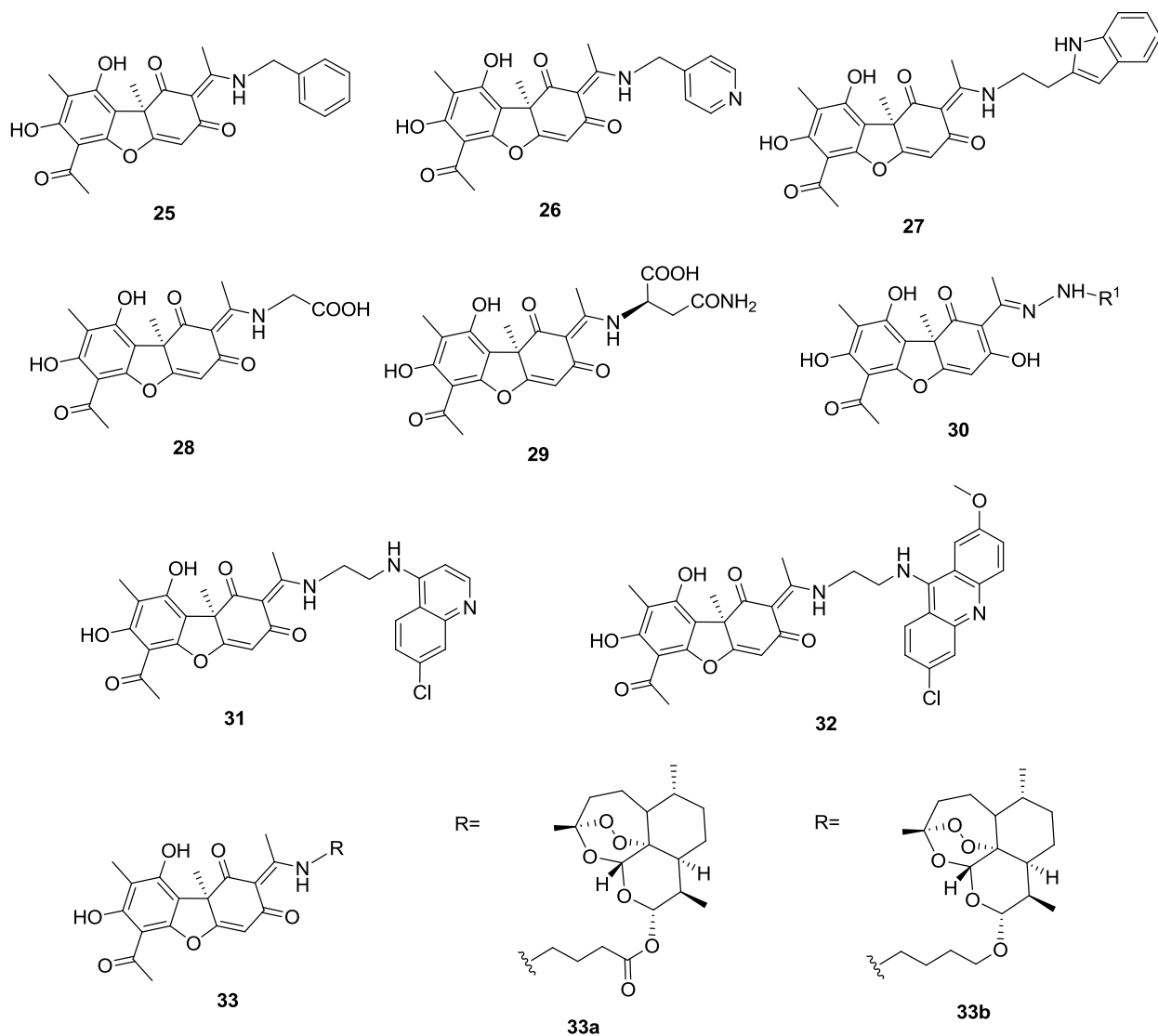


Рисунок 7. Производные усниновой кислоты, тестируемые на антималярийную активность.

Среди синтезированных соединений - конъюгаты (+)-УК с аминсоединениями, в том числе содержащими структурные фрагменты с антималярийным действием: енамины с бензильным (25), пиридинильным (26), индольным (27) и аминокислотными остатками (28 и 29), с хинолиновым (31) и акридиновым (32) фрагментами, гидразоны с ароматическими фрагментами (30). Кроме того, авторами синтезированы конъюгаты с дигидроартемизинином, присоединённым либо через аминобутанольный мостик (33b), либо через γ -аминомасляную кислоту (33a) (рис. 7). Минимальная ингибирующая концентрация (+)-УК, определённая в этой работе, 15 мкМ. Все синтезированные конъюгаты оказались активнее УК, МИК₅₀ соединений 25-32 составил от 0.05 до 12 мкМ. Но наиболее высокую антималярийную активность проявили производные с дигидроартемизининовыми фрагментами 33a и 33b, МИК₅₀ 0.001 и 0.01 мкМ соответственно. В первом соединении дигидроартемизининовый фрагмент связан с УК сложноэфирным мостиком, во втором – простой эфирной связью. Авторы предполагают, что активность 33a выше за счёт

возможности гидролиза и освобождения активного начала – дигидроартемизинина. Эту гипотезу проверили также на мышах, инфицированных *P. berdhei*. В дозах 3 мг/кг при введении перорально первое соединение ингибирует рост паразитов на 82%, тогда как второе абсолютно не проявляет ингибирующей активности, при введении внутривенно – разницы в действии соединений **33a** и **33b** не наблюдалось.

Таким образом, УК обладает заметной антипротозойной активностью, связанной, по всей видимости, с её свойствами индуктора перекисного окисления липидов. Не наблюдается разницы в действии энантиомеров УК, при этом химические модификации, основанные на введении фармакофорных фрагментов в кольцо С УК привели к очень перспективным антипротозойным агентам.

2.6 Антивирусное действие усниновой кислоты и её производных

Исследования противовирусной активности УК начались относительно недавно. В 1995 г Ямамото и соавт.¹⁰⁰ тестировали активность (+)-УК в отношении репликации канцерогенного вируса Эпштейна-Барра. Был выявлен ингибирующий эффект (+)-УК на вирус в концентрациях 1.0 мкг/мл, при этом (-)-УК оказалась менее активной, её эффективная концентрация составила 5.0 мкг/мл. В работе¹⁰¹ обнаружено, что коммерчески доступная (+)-УК ингибирует цитопатический эффект вируса герпеса 1 типа и полиомиелита 1 типа. Исследования проводились *in vitro* на инфицированных почечных клетках африканских зелёных мартышек. В том же 1999 году Скрипа и соавт.¹⁰² проводили клинические исследования на 100 пациентках на предмет влияния комплексного препарата сульфат цинка-УК на размножение папилломавируса. Обработка УК-содержащим препаратом значительно ускорила реэпителизацию после радиохирургического вмешательства (65% случаев полной реэпителизации через 1 месяц в сравнении с 28% в контрольной группе), в том числе, предполагают авторы, и за счёт ингибирующего действия УК на рост папилломавируса.

В работе¹⁰³ показано, что УК является мощным ингибитором пролиферации полиомы мыши. Ряд косвенных данных позволяет предполагать, что механизм активности связан со способностью этого соединения угнетать процесс вирусной транскрипции. Так, на примере вируса полиомы мышей было показано, что вирусингибирующая активность УК не была связана ни с адсорбцией вирионов на клетке, ни с проникновением их в цитоплазму. При этом количество вирусных транскриптов было существенно снижено по сравнению с контролем. По-видимому, специфической мишенью для УК являются вирусспецифические ферменты, обеспечивающие репликацию вирусных нуклеиновых кислот. Косвенно такой

механизм действия подтверждается данными публикации¹⁰⁴, в которой было продемонстрировано супрессивное действие УК на биосинтез РНК.

Фазио и соавт.¹⁰⁵ исследовали противовирусную активность УК в отношении аренавирусов JUNV (Junin, вызывает аргентинскую геморрагическую лихорадку) и TCRV (Tacaribe, непатогенный аренавирус, антигенно близкий JUNV). Пятидесятипроцентное ингибирование роста JUNV наблюдалось при использовании концентрации 9.9 мкМ УК, тогда как МИК₅₀ в отношении непатогенного вируса в два раза выше – 20.6 мкМ. Авторы также определили терапевтические индексы (отношение токсической концентрации к действующей) УК, которые составили 6.8 и 3.2 соответственно.

В работе Ву и соавт.¹⁰⁶ сообщается, что УК обладает антивирусным действием *in vivo* на культуры MDCK клеток и A549 клеток, зараженных вирусом гриппа (H5N1, H3N2). Действие УК на вирус приближается к действию лекарственного контроля, а именно амантадина. Кроме того, авторы наблюдали тормозящее влияние УК на воспалительные реакции, индуцированные вирусами гриппа. Малоэффективным оказалось действие УК в отношении респираторно-синцитиального вируса¹⁰⁷, МИК₅₀ 24.7 мкг/мл (71.7 мкМ), терапевтический индекс УК составил 0.6.

Родственные УК соединения **11** и **12** (рис. 3), выделенные из фитопатогенного грибка *Mycosphaerella nawae*⁵⁹, не проявили активность в отношении вируса гриппа В. Зато соединение **13** с выведенной из сопряжения экзоциклической кетонной группой в кольце С показало антивирусное действие, ЭД₇₀ составила 30 мкг/мл, цитотоксическая доза в отношении клеток MDCK (клетки почечного эпителия) составила ЦТД₅₀ 190 мкг/мл, соответственно терапевтический индекс этого соединения более 6.

Суммируя литературные данные, можно сказать, что, как правило, УК проявляет умеренную ингибирующую активность в отношении некоторых вирусов, возможно, что при этом активнее (+)-энантиомер УК. Предполагается, что механизм антивирусной активности этого соединения связан со его способностью угнетать процесс вирусной транскрипции. Данных по противовирусной активности производных недостаточно для выявления закономерностей и механизма действия. Однако, стоит отметить, что в отличие от снижения антибактериального действия производных УК при разрушении трикетонной системы кольца С, такая структурная модификация приводит к существенному повышению противовирусной активности соединения.

2.7 Альгицидная активность и фитотоксичность усниновой кислоты

Многие лишайниковые вещества проявляют аллелопатические свойства по отношению к растениям. Аллелопатическая активность выражается в ингибирующем действии на прорастание семян и/или на рост растений. Подобное действие УК наблюдали даже для водорослей, многие из которых являются фикобионтом, симбиотическим компонентом лишайника, тогда как УК синтезируется вторым компонентом - микобионтом.

Токсичность УК по отношению к несимбиотическим водорослям изучали в работе¹⁰⁸. Обнаружено, что в концентрации 10 мкг/мл УК подавляет рост одноклеточных зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* на 10-20 %. Обработка УК в концентрации 20 мкг/мл приводит к более полному ингибированию роста или даже летальности. Наблюдалось значительное снижение в скорости прорастания зигот (до 11 - 44%) при использовании низких доз УК. Авторы, однако, отмечают, что обработка УК не влияет на процесс гаметогенеза. В работе⁷⁵ сообщается, что УК в концентрации 50 мкг/мл не ингибирует рост другой зелёной водоросли - *Chlorella fusca*. Фитотоксический эффект УК наблюдался в отношении культуры свободноживущей водоросли *Scenedesmus quadricauda* класса зелёных водорослей¹⁰⁹. Ростингибирующее действие сопровождается увеличением размеров клеток, изменением пигментного состава, сильной деградацией хлорофилла А и увеличением активных форм кислорода (АФК) в клетках. Фитотоксичность УК на культурах водоросли-фитобионта *Trebouxia erici* была значительно ниже, чем для *Scenedesmus quadricauda*¹⁰⁹. Авторы высказывают предположение, что УК в лишайниках может действовать как аллелохемик, который контролирует деление клеток фитобионта, тем самым регулируя баланс между фитобионтом и микобионтом, образующими слоевища.

Отсутствие влияния УК на рост симбиотического фотобионта *Trebouxia jamesii* также показали Хагер и соавт.¹¹⁰. Однако, в работе¹¹¹ установлено, что УК фитотоксична в отношении водорослей *Trebouxia erici*, ингибирует рост, снижает жизнеспособность и флюоресценцию хлорофилла А этого фикобионта. Кроме того, авторы исследовали одновременное действие УК и меди на *Trebouxia erici*, и показали, что оба вещества являются фитотоксичными, не наблюдается ни синергетического, ни защитного (хелатирующего) эффекта УК при совместном действии. Таким образом, не подтверждается предположение о том, что хелатирующее действие УК по отношению к металлам является способом детоксикации лишайников от тяжёлых металлов. Авторы работы¹¹² установили, что натриевая соль УК влияет на проницаемость клеточных стенок в культуре клеток изолированного фитобионта *Trebouxia ruum*. Изменение проницаемости мембран водорослей *Trebouxia erici* для других органических соединений под действием свободной УК также наблюдали Вайнштейн и соавт.¹¹³.

Данные о влиянии УК на прорастание и рост высших растений, опубликованные в литературе, несколько противоречивы. Аллелопатическое ингибирующее действие (-)-УК в концентрациях 0.005-0.2 % на прорастание семян, рост и развитие ростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L) наблюдали авторы работы¹¹⁴. Далви и соавт.¹¹⁵ сообщили о ингибирующем действии УК (неизвестный энантиомер) на прорастание семян бобов маш и пшеницы. В то же время Нишитоба и соавт.¹¹⁶ обнаружили, что УК (неизвестный энантиомер) даже в высоких концентрациях не оказывает эффекта на проращивание семян салата-латука. Отсутствие токсического действия УК на прорастание сеянцев сосны наблюдали в работе¹¹⁷, УК также не влияет на поглощение азота проростками.

Ромагни и соавт.¹¹⁸ в экспериментах с семенами салата (*Lactuca sativa*) и лука (*Allium cepa*) обнаружили, что наблюдаются заметные различия в фитотоксическом действии энантиомеров УК. (-)-УК вызывает дозозависимое отбеливание семядольных тканей, связанное с уменьшением содержания хлорофиллов и каротиноидов в обработанных растениях. В то же время, (+)-энантиомер не оказывал никакого влияния на содержание пигментов. Использование разных энантиомеров либо же их смеси может объяснить и разницу в наблюдениях предыдущих авторов.

Кроме того, направление ингибирующего эффекта зависит от используемых концентраций. В более высоких концентрациях (до 1 г/л) УК ингибирует прорастание и рост пшеницы и чеснока, тогда как использование УК в малых концентрациях (0.5 мг/л) может даже увеличить скорость роста этих растений¹¹⁹. Дозозависимый фитотоксический эффект УК наблюдали также Кардарелли и соавт.⁸³. Диапазон концентраций УК от 0.05 до 0.1 мкг/мл оказывал стимулирующий эффект на деление мезофилльных протопластов табака *Nicotiana tabacum*. Концентрации до 2,5 мкг/мл УК мало влияют на жизнеспособность клеток (> 80%), в то время как концентрации от 5 до 20 мкг/мл уменьшают количество жизнеспособных протопластов до 40%. Более высокие дозы (100-200 мкг/мл) оказались токсичными для более чем 90% клеток. Дозы УК 50 мкг/мл достаточно, чтобы полностью ингибировать прорастание семян этого растения. Кроме того, Гарднер и соавт.¹²⁰ обнаружили, что токсический эффект УК на прорастание спор мха фунарии гигрометрической *Funaria hygrometrica* имеет рН-зависимый характер. Действие УК в концентрации $2.7 \cdot 10^{-3}$ М не оказывает влияния на споры при рН 5 и 6, а при значениях рН 7 и 8 – только 25 и 1% спор соответственно жизнеспособны. Возможно, считают авторы, проникновение в споры имеет место только в виде соли уснината.

Обработка взрослых растений УК также приводит к заметным фенотипическим изменениям¹²¹. У томатов, выращенных в среде с добавлением 40 мкМ (+)-УК, существенно уменьшаются длина побегов, корней и площадь листовой пластинки; содержание

макроэлементов снижается на 25-35%, 48-55%, 65-69% и 60-70% для кальция, азота, фосфора и калия, соответственно, по сравнению с контролем. Отмечен дозозависимый эффект - вычисленные показатели роста (шток в корнях, удельный вес листьев и относительная скорость роста) были обратно пропорциональны концентрации (+)-УК в среде. Морфологические изменения (карликовость и деформации) корневой системы проростков подсолнечника и кукурузы, индуцируемые УК в концентрации 50 мкМ, наблюдали Ласцеве и соавт.¹²². Сообщается, что УК вызывает закрытие устьиц в проростках сои и листьях ячменя, проростках подсолнечника и кукурузы¹²². Такой процесс ведёт к уменьшению потери воды на 40%, свидетельствуя о антитранспирантном действии УК. Латковска и соавт.¹²³ установили, что (-)-УК в концентрации 20-30 мМ угнетает фотосинтетическую (40%) и респираторную (до 80%) функции томатов (*Lycopersicon esculentum*), при этом наблюдается уменьшение количества внутриклеточных хлорофилла и каротиноидов.

Первоначально, одним из возможных механизмов ингибирующего рост растений эффекта называли увеличение проницаемости мембран (исследования на клетках лука) для других органических соединений¹²⁴. Эти же авторы¹²⁵ в другой работе об ингибирующем действии УК на укоренение черенков *Salix blanda*, *Abutilon striatum* (канатник) и *Hedera helix* (плющ обыкновенный), помимо изменения проницаемости мембран, указывали возможный антимитотический эффект УК. Однако, позднее Толедо Маранте и соавт.¹²⁶ показали, что УК практически не проникает в семена перца, капусты, томатов и салата, оценив наблюдаемую проницаемость как ничтожную. Авторы работы¹²⁷ также сообщили, что УК плохо проникает в изолированные хлоропласты листьев дуба (*Quercus rotundifolia*).

Сразу несколько работ свидетельствуют о токсическом действии УК на хлоропласты. При действии УК на листья *Quercus rotundifolia* (дуб круглолистный) наблюдалось полное подавление реакции Хилла хлоропластов¹²⁸. Это действие полностью обращалось добавлением $MnCl_2$ к суспензии хлоропластов. Поскольку известно, что ионы марганца переносят электроны, высвобождающиеся при фотолизе воды, на хлорофилл фотосистемы II P-680, то предполагается, что действие УК может быть связано с хелатированием марганца, что ведёт к уменьшению его содержания в среде и, следовательно, ингибированию транспорта электронов. Тот же механизм действия УК предполагают авторы работы¹²⁹. О фитотоксическом эффекте на хлоропласты шпината сообщается в работе¹³⁰. Позднее те же авторы¹³¹ показали, что фитотоксический эффект УК на изолированные хлоропласты шпината огородного *Spinacia oleracea* связан с ингибирующим действием УК на окислительные функции фотосистемы II, возможно, через связывание УК с вторичными донорами электронов. Авторы также отметили, что ингибирующее действие УК не обращается добавлением марганца в систему, что противоречит данным Орус и соавт.¹²⁸.

Авторы работы¹³² подтвердили отсутствие влияния марганца на действие УК в отношении хлоропластов коммелины обыкновенной *Commelina communis*. При этом, УК в концентрации 4 мкМ полностью ингибирует в мезофилльных протопластах обменные клеточные процессы с вовлечением кислорода. При повышении концентрации УК до 10 мкМ также подавляется темновое дыхание на 59%. Авторы предполагают, что УК угнетает клеточное дыхание двумя путями: первоначально ингибируя окислительное фосфорилирование, и позднее, ингибируя оксидазу.

Действие УК на фотосинтетические процессы в листьях шпината наблюдали Эндо и соавт.¹³³. Авторы показали, что УК ингибирует флюоресценцию хлорофилла А, при этом тормозится фотосинтез в тилакоидах (клеточные структуры в растениях, подобные по функциям митохондриям). Основной функцией тилакоидной мембраны и ее интегральных фотосистем является создание электрохимического потенциала. Переносчики электронов, участвующие в электронном транспорте, используют некоторую часть энергии электронов для перекачки протонов из стромы в просвет тилакоида. Протонный градиент в тилакоидах выше, чем в митохондриях, в 10 раз, создаётся в основном фотосистемой II. В мембране тилакоида УК ингибирует именно фотосистему II, отвечающую за синтез кислорода. Авторы установили предпочтительный сайт связывания - вероятно, восстанавливающий фрагмент первичного и вторичного хинонных акцепторов электронов, альтернативный сайт – окисляющий фрагмент хлорофилла Р680. В обоих случаях происходит необратимое связывание с сайтами, при этом связывания с кислородвыделяющим фрагментом фотосистемы II не наблюдается.

Разобщение тилакоидной мембраны и, следовательно, дестабилизация фотосинтетического аппарата отмечена под действием обоих энантиомеров УК в экспериментах с семенами салата (*Lactuca sativa*) и лука (*Allium cepa*)¹³⁴. Однако, наблюдаемые эффекты, вызванные разными энантиомерами УК, несколько различаются. (-)-УК вызывает дозозависимое отбеливание семядольных тканей, связанное с уменьшением содержания хлорофиллов и каротиноидов в обработанных растениях. В то же время, (+)-энантиомер не оказывает никакого влияния на содержание пигментов. Авторы предполагают, что разница в действии связана с избирательной ингибирующей активностью (-)-УК в отношении протофорфориноген оксидазы (МИК₅₀ 3 мкМ), МИК₅₀ (+)-УК в 20 раз выше – 60 мкМ. Авторы установили, что действие УК связано, по-видимому, также с ингибированием фермента протопорфориногеноксидазы (HPPD), МИК₅₀ (-)-УК составила 70 нМ, (+)-УК на порядок менее активна. Известно, что HPPD катализирует синтез пластохинонов, блокирование этого процесса действием УК приводит к ингибированию синтеза каротиноидов, которые в свою очередь гасят избыток активных форм кислорода

(АФК). То есть, обработка семян УК приводит к окислительному стрессу и дегенеративным процессам.

Ещё один из путей влияния УК на рост растений описали Легаз и соавт.¹³⁵. Авторы обнаружили, что УК связывается с ауксинами через сложноэфирную связь, что нарушает фитогормональную регуляцию роста листьев

Таким образом, УК практически не фитотоксична в отношении водорослей-симбионтов. Наблюдается умеренное фитотоксическое действие УК в отношении высших растений. Эффекты, вызванные действием УК, могут быть обусловлены изменением проницаемости мембран, нарушением процессов окислительного фосфорилирования и хелатирующим действием УК по отношению к некоторым катионам. Установлено, что УК более фитотоксична для фотосинтезирующих клеток, поскольку ингибирует флюоресценцию хлорофилла А. Механизм действия, в первую очередь, связан с ингибированием фотосистемы II путём разобщения мембраны тилакоидов. По-видимому, существуют заметные различия в активности двух энантиомеров, при этом отмечена более высокая токсичность (-)-УК. Наблюдаемое расхождение в результатах исследований фитотоксичности УК разными авторами объясняется, возможно, использованием УК непонятной оптической чистоты и особенностями обработки. В литературе отсутствуют данные об использовании производных УК для обработки растений.

2.8 Инсектицидное действие усниновой кислоты и её производных

Публикации о действии УК на насекомых и их личинки относятся к совсем недавнему времени. Эммерих и соавт.¹³⁶ в 1993 г. обнаружили, что оба энантиомера УК токсичны для личинок египетской хлопковой совки *Spodoptera littoralis*. Как (+)-, так и (-)-УК вызвали сильную смертность, а также значительную задержку роста и ярко выраженное затягивание личиночного периода в экспериментах длительного кормления новорожденных личинок в концентрациях, сопоставимых или даже значительно ниже их естественной концентрации в различных лишайниках, при этом (-)-УК оказалась на порядок токсичнее. Факторы, свидетельствующие об антифидантных свойствах, - доза вещества, вызывающая задержку роста насекомых на 50% (ЭД₅₀) и смертность личинок (ЛД₅₀), также различались для энантиомеров УК. Значительно более высокую антифидантную активность обнаружила (-)-УК. ЭД₅₀ составила 1.2 мкмоль для (-)-УК и 4.5 для (+)-УК, ЛД₅₀ 8.6 и 90.8 мкмоль на грамм сухого веса соответственно. Авторы определяли острую токсичность путем инъекции в гемолимфу личинок и показали, что эти данные коррелируют с антифидантной активностью (ЛД₅₀ (-)-УК 27.5 мг/кг, (+)-УК значительно менее токсична - 71.0 мг/кг). Авторы

предполагают, что оба фактора – антифидантные свойства и острая токсичность, влияют независимо, суммируя оказанное действие.

В работе¹³⁷ продемонстрировано, что оба энантиомера УК токсичны для личинок комара обыкновенного *Culex pipiens* в разной степени. И (-)-, и (+)-УК оказали сильное ларвицидное действие на третьей и четвёртых стадиях роста личинок, ЛК₁₀₀ составили 5 и 10 мкг/мл соответственно, а ЛК₅₀ 0.8 и 0.9 мкг/мл. Подобное действие (+)-УК наблюдалось также в отношении личинок moskitov *Culiseta longiareolata*¹³⁸. Ларвицидная активность против второй и третьей возрастной стадии личинок moskitov составила ЛК₅₀ 0.48 мкг/мл (ЛК₉₀ 1.54 мкг/мл).

Исследования *in vitro* акарицидной активности УК и её натриевой соли в отношении *Psoroptes cuniculi* проводились авторами работы¹³⁹. В публикации показано, что требуются довольно высокие дозы УК для того, чтобы вызвать гибель клещей. Смертность составила 91, 85 и 55% при применении УК в концентрациях of 250, 125 и 62.5 мкг/мл. Те же дозы натриевой соли УК были несколько эффективнее, вызывая 100, 100 и 60 %-ную смертность соответственно.

Интересно, что (+)-УК вызывает 100%-ную смертность взрослых червей *Schistosoma mansoni*, облигатных паразитов, вызывающих шистоматоз при обработке ей в концентрации 200 мкМ¹⁴⁰.

Таким образом, токсическое действие УК, оказываемое на насекомых, наблюдается, как правило, на личиночных стадиях, а не на стадии имаго. Антифидантное действие и острая токсичность являются основными факторами токсического действия УК. Исследования обоих энантиомеров УК показали, что (-)-УК значительно токсичнее (+)-изомера. Нет данных в литературе о действии на насекомых каких-либо производных УК.

2.9 Токсичность усниновой кислоты по отношению к животным

Сообщения о токсическом влиянии УК на животных появились вскоре после установления её структуры. Ещё в 1936 г Микошиба и соавт.¹⁴¹ определили (+)-УК как малотоксичное соединение и измерили ЛД₅₀ для млекопитающих - 25-30 мг/кг. В работе¹⁴² установлено, что уже при введении дозы 10 мг/кг кошкам внутривенно наблюдается ускорение метаболизма, а именно гипервентиляция, увеличенное потребление кислорода и повышение температуры тела. Публикация¹⁴³ приводит данные по ЛД₅₀ для мышей, крыс, кроликов и собак. Дозы при внутривенном введении составили 25, 30, 30 и 40 мг/кг соответственно. В базе данных по токсичности веществ Registry of Toxic Effects of Chemical

Substances (RTECS) указаны данные по острой токсичности УК для мышей и кроликов, ЛД₅₀ 838 и более 500 мг/кг соответственно.

Сведения об относительной токсичности УК для оленей приведены в работе¹⁴⁴. Сравнительными экспериментами по поеданию лишайника *Parmelia molliuscula*, содержащего 1.6% УК, авторы установили, что причиной отравления оленей была УК. Группа оленей, поедавшая лишайник после извлечения из него УК, не проявила признаки интоксикации. А вот улитки *Balea perversa*, *Chondrina clienta* и *Helicigona lapicida* не подвержены токсическому действию УК, поскольку, как выяснили авторы работы¹⁴⁵, они её абсолютно не усваивают, ни в каких тканях улиток УК не обнаружена, только в экскрементах. Сундсет и соавт.¹⁴⁶ сообщают, что УК в обычных пищевых дозах не оказывает токсического действия на северных оленей. Отсутствие токсического эффекта авторы объясняют особой микрофлорой пищеварительного тракта северного оленя, способной полностью метаболизировать УК. УК не обнаружена ни в пищеварительном тракте, ни в печени или почках, ни в экскрементах северных оленей после кормления, хотя животные ели лишайники, содержащие целых 9 мг УК на грамм пищи в течение 4 недель.

В 90-е годы 20 века УК стали активно использовать в качестве компонента пищевых добавок, предназначенных для похудения. После чего появились сообщения об отравлении этими биодобавками, в первую очередь ассоциированные с гепатотоксичностью^{147,148,149,150}. Наблюдаемые симптомы отравления – повышение уровней аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаргатаминотрансферазы (АСТ), билирубина, тёмная моча, миалгия, артралгия и даже гепатоцеллюлярный некроз. Исследование¹⁵¹ 2005 года суммировало данные по инцидентам и их последствиям. В публикации сообщается, что гепатотоксичность УК привела к тому, что один человек погиб, семь человек госпитализировано с печеночной недостаточностью, выявлено десять случаев химического гепатита и четыре мягкой печеночной токсичности. Эти данные инициировали активные исследования гепатотоксического действия УК на клеточном уровне.

В первую очередь исследователи обратили внимание на изменения, вызываемые УК, в процессе клеточного дыхания. Выделяемая в этом метаболическом процессе энергия используется для синтеза АТФ при окислительном фосфорилировании АДФ. Хорошо известны представления о пяти метаболических состояниях изолированных митохондрий, в каждом из которых поток электронов через дыхательную цепь лимитируется разными кинетическими причинами: либо снабжением субстратов окисления (состояние 1), либо концентрацией АДФ и фосфата, сопряженной с окислительным фосфорилированием (состояние 2), либо снабжением дыхательной цепи кислородом в случае его дефицита (состояние 5). При наличии всех необходимых ингредиентов кинетический контроль

дыхания осуществляется избытком внемитохондриального АДФ (состояние 3 — «активное»), после фосфорилирования которого устанавливается новое, более энергизованное состояние 4. Оно характеризуется дефицитом свободного АДФ, лимитирующего дыхание. Стационарные состояния дыхания описываются характерными изменениями скоростей потребления кислорода и фиксируются спектрофотометрически по соотношению окисленно-восстановленных форм дыхательных переносчиков.

Авторы работы¹⁵² в экспериментах на изолированных гепатоцитах печени мышей выяснили, что механизм токсического действия УК связан с разобщением окислительного фосфорилирования. УК в концентрации 0.75 мкМ ингибирует соотношение АДФ/О на 50%, вызывает максимальное стимулирование состояния 4 дыхания (100%) и повышает уровень АТФазы на 300%. Авторы считают, что УК может переносить протоны, минуя протонные каналы мембраны, т.е. выступает в качестве протоннофора. По сути, её действие связано с тем, что она делает мембрану проницаемой для протонов и тем самым ликвидирует протонный градиент. При этом скорость окисления даже усиливается, однако фосфорилирование не происходит. Таким образом, УК проявляет характеристики классического разобщающего агента для окислительного фосфорилирования. Минимальная концентрация, необходимая для обеспечения полного разобщения окислительного фосфорилирования 1 мкМ. В таком случае исчезает электрохимический потенциал и прекращается синтез АТФ. Это явление называют разобщением дыхания и фосфорилирования. Количество АТФ снижается, АДФ увеличивается, а энергия выделяется в виде теплоты. Накопление энергии в виде АТФ не происходит, отсюда наблюдаемый эффект УК как средства для похудения. Те же самые эффекты в изолированных митохондриях печени крыс наблюдали Прамиотин и соавт.¹⁵³. Разобщающий эффект на митохондрии вызвало действие (+)-УК в концентрациях 0.15-6 мкМ. Повышение концентрации (+)-УК (> 6 мкМ) приводит к потере дыхательного контроля и падению синтеза АТФ, что выражается в максимальной стимуляции состояния 4 дыхания (от трех до семи раз, в зависимости от субстратов) и в повышении уровня АТФазы (в 7 раз). Хан и соавт.¹⁵⁴ также проводили исследование и на гепатоцитах, и на изолированных митохондриях печени крыс. Авторы отмечают, что наблюдается резкий качественный скачок токсичности при переходе от дозы 2 мкМ (полностью сохраняется жизнеспособность гепатоцитов) к дозе 5 мкМ (практически летальная доза для гепатоцитов). Высказывают предположение, что УК в дозе 2 мкМ ингибирует состояние 3 митохондриального дыхания в гепатоцитах, а 5 мкМ оба состояния дыхания – 3 и 4, тем самым разрывается цепь окислительного фосфорилирования и происходит резкое падение уровня АТФ. Дозозависимый эффект гепатотоксического действия УК тестировали на изолированных

гепатоцитах крыс¹⁵⁵. Концентрация 1 мкМ не вызвала изменений жизнеспособности гепатоцитов в сравнении с контролем. Более высокие концентрации оказались токсичными, наблюдается снижение жизнеспособности. Уже при 1 и 5 мкМ активизируется окислительное фосфорилирование. Концентрация 10 мкМ, наоборот, сильно ингибирует и фосфорилирование и глюконеогенез. Авторы предполагают, что наблюдаемая активизация окислительного фосфорилирования это адаптивный ответ на угнетение митохондриальных функций.

Ключевые показатели активации апоптоза на гепатоцитах крыс оценивали авторы работы¹⁵⁶. Исследователи не наблюдали заметных изменений высвобождения лактат дегидрогеназы, активации каспазы 3 и фрагментации ДНК, что исключает апоптоз и предполагает некрозный путь гибели клетки. Также некрозный тип смерти гепатоцитов мышей был подтверждён в работе¹⁵⁴. Наблюдалось сегментирование ядер, а не ядерная фрагментация, характерная для апоптоза. Значительная гибель клеток наблюдалась уже через 8 ч после обработки УК в концентрации 5 мкМ (3 мкг/мл) и достигала 98% через 16 часов (только некроз).

Оказалось, что даже в низких дозах УК гепатотоксична, если оценивать совместное действие её с липополисахаридами¹⁵⁷. Оба агента действуют синергетически, вызывая ухудшение основных биохимических показателей клеток HepG2 (гепатобластома человека). Клетки чувствительны к воздействию УК в концентрациях до 100 мкМ, ЛК₅₀ составила 30 мкМ. При одновременном применении низких (нетоксичных) концентраций УК и липополисахаридов наблюдались множественные токсические эффекты (цитотоксичность, окислительный стресс, повреждение митохондрий). Бинарная смесь также изменяет экспрессию генов, отличных от тех, которые затрагиваются при индивидуальном действии УК и липополисахаридов. Кроме того, авторы установили, что обработка клеток УК увеличивает активность цитохрома P450 и вызывает митохондриальную дисфункцию.

Приблизили исследования токсичности УК к условиям *in vivo* Морейра и соавт.¹⁵⁸. Эксперименты проводились в изолированной, но перфузированной печени крыс, также авторами сделана количественная оценка метаболических эффектов УК. Установлено, что УК стимулирует потребление кислорода при низких концентрациях (2.5 мкМ), уменьшает уровень клеточного АТФ, увеличивает цитозольное, но уменьшает митохондриальное соотношение NADH/NAD⁺. УК сильно ингибирует глюконеогенез на трех различных субстратах (МИК₅₀ между 1,33 и 3,61 мкМ), стимулирует гликолиз, фруктолиз, гликогенолиз и аммониягенез и ингибирует уреагенез (МИК₅₀ = 2.69 мкМ). Последний эффект вообще не характерен для классических разобщителей окислительного фосфорилирования. По-видимому, эффект УК в концентрациях до 2,5 мкМ отражает предпочтительно её активность

в качестве разобщителя. При более высоких концентрациях, однако, некоторые другие эффекты становятся значительными, в том числе ингибирование митохондриального электронного потока и ингибирование окисления жирных кислот со средней длиной цепи. Таким образом, УК в качестве разобщителя стимулирует катаболические метаболические пути и ингибирует анаболические.

С другой стороны, токсичные концентрации *in vivo* очень сильно отличаются от таковых *in vitro*. Авторы работы¹⁵⁹ установили, что для проявления симптомов отравления мышей необходимы высокие дозы (+)-УК. ЛД₅₀ (+)-УК при пероральном введении составила 388 мг/кг. При потреблении сублетальных доз УК у мышей наблюдались типичные проявления отравления, такие как апатия, усиленная перистальтика, озноб, одышка, оцепенение и анорексия.

Прамиотин и соавт.¹⁵³ наблюдали очевидное морфологическое повреждение митохондрий и эндоплазматической сети после обработки животных высокой дозой (+)-УК (200 мг/кг в день, внутривенно) в течение 5 дней, но не отмечали существенных изменений в активности трансаминаз сыворотки. На основании этого авторы считают, что УК гепатотоксична в небольшой степени, поскольку для наблюдения изменений требуются как высокая доза УК, так и длительное время воздействия. Влияние УК на различные биохимические показатели метаболизма изучали Лу и соавт.¹⁶⁰ *in vivo* на крысах. Обнаружили, что при использовании доз 100, 200 и 240 мг/кг в день УК вызывает значительное увеличение уровня АЛТ и общего билирубина. В дозах выше 200 мг/кг наблюдалась отёчная дегенерация гепатоцитов. В экспериментах *in vivo* на мышях и крысах¹⁵⁴ показан высокий уровень связывания УК с белками плазмы. Если пациентам вводить 100 мкМ (на 70 кг), 99% УК связывается с белками, и только 1 мкМ доступен. Значит, для токсичного эффекта *in vivo* нужно постоянно пополнять уровень УК (например, постоянно потреблять биодобавку «Lipokinetix»), чтобы накопить токсическую дозу.

Тестирование токсического действия УК¹⁶¹ при длительном кормлении самцов крыс показало дозозависимые изменения гепатоцитов при их микроскопическом исследовании. Наблюдалось значительное увеличение липидных включений, набухание митохондрий, фрагментирование шероховатой эндоплазматической сети, обилие гладкой эндоплазматической сети и фокусное повреждение мембран гепатоцитов около желчных канальцев. Кроме того, существенные изменения претерпевали биохимические показатели. При действии относительно низкой дозы УК (100 мг/кг) отмечено значительное увеличение общего белка, альбумина, холестерина, липопротеинов высокой плотности и общего билирубина. При повышении дозы УК до 300 мг/кг помимо белка и билирубина возрастали

показатели АЛТ, АСТ, лактатдегидрогеназы, сахара и магния в крови. Уровень триглицеридов был увеличен незначительно.

Дейли и соавт.¹⁶² обнаружили, что не всегда гепатотоксичность является основным токсическим фактором, в экспериментах на овцах наблюдается в первую очередь миотоксический эффект. Авторы объясняют это тем, что ранее проводились эксперименты на животных с однокамерным желудком, у исследованных авторами жвачных несколько другая физиология, особая микрофлора, способная нейтрализовать микотоксины. В крови овец после употребления высоких доз УК были значительно повышены уровни креатинкиназы (СК), АСТ и лактат дегидрогеназы (LDH). Наблюдались заметные посмертные повреждения, в виде тяжелой дегенеративной миопатии аппендикулярного скелета. Средняя токсическая доза (ЛД₅₀) (+)-УК для домашних овец, по оценкам авторов, составляет от 485 до 647 мг/кг/день в течение 7 дней. Такая доза многократно превышает возможную для реального потребления.

Наличие миотоксического эффекта (+)-УК на крысах продемонстрировали авторы работы¹⁶³. По мнению исследователей, поскольку сердце, наряду с печенью, является органом, богатым митохондриями, оно также может являться одним из целевых органов действия УК. В экспериментах на взрослых самках крыс при потреблении дозы (+)-УК 30 мг/кг/день авторами не наблюдались изменения в уровнях АСТ, АЛТ и тропонина-Т, что говорит о меньшем токсическом эффекте, чем заявлено в предыдущих исследованиях. Эксперименты продемонстрировали, что УК преимущественно накапливается в печени и лёгких, содержание её в сердце относительно мало. На клеточном уровне наблюдается интенсивное увеличение гранул прогибитина, который регулирует кристаллическую структуру мембраны, и обычно локализуется в мембране митохондрий. Увеличение количества гранул, полагают авторы, вызывается дисбалансом окислительного фосфорилирования и избыточным образованием АФК. Относительно невысокий токсический эффект УК на клетки сердца крыс показали авторы работы¹⁵⁹ в исследовании токсичности УК на кардиофибробластах. МИК₅₀ (+)-УК составила 322 мкг/мл, что существенно выше гепатотоксической концентрации.

Таким образом, УК токсична для большинства животных и для человека. Высокая токсичность проявляется в экспериментах на клеточном уровне и заметно менее выражена в тестах *in vivo*, для интоксикации животного необходимо хроническое потребление УК в высоких дозах, при этом преимущественно поражаются энергопотребляющие органы. Основной механизм токсичности УК на клеточном уровне связан с её действием как митохондриального разобщителя. УК является липофильной слабой кислотой, которая может диффундировать через митохондриальные мембраны и вызвать утечку протонов

(разобщение мембраны). Липофильность УК и её аниона позволяет легкое прохождение обоих через митохондриальную мембрану путем пассивной диффузии. В матриксе УК ионизируется, выпустив протон. Полученный уснинат-анион может затем диффундировать обратно в межмембранное пространство, в котором он связывается с протоном на кислой стороне мембраны, возвращаясь к форме УК, которая снова может диффундировать обратно в матрикс в результате протон-челночного цикла. Этот процесс вызывает утечку протонов, что в конечном итоге может рассеивать протонный градиент через внутреннюю мембрану, тем самым нарушая жесткую связь между транспортом электронов и синтезом АТФ. На начальном этапе воздействия разобщители могут ускорять перенос электронов для компенсации утечки протонов, вызванной разобщением. Однако, при более высоких концентрациях и/или при долгосрочном упорном разобщении окислительного фосфорилирования их действие может привести к значительному АТФ истощению, что, в свою очередь, может привести к серьезной травме печени.

Совокупность результатов говорит о том, что окислительный стресс, возникающий при митохондриальном разобщении, занимает одно из центральных мест в индуцированной УК гепатотоксичности. Наиболее заметную роль в генерации активных форм кислорода после обработки УК играет увеличение выработки перекиси водорода митохондриями, вызванное торможением УК дыхательной цепи. Окислительный стресс, вызванный УК, может привести к нарушению энергетического метаболизма, метаболизма аминокислот, липидов и нуклеотидов. Под действием УК уменьшается продукция АТФ и ускоряется термогенез с повышенным потреблением калорий из-за разобщающего эффекта окислительного фосфорилирования.

Тщательные исследования токсичности УК проводились только для одного энантиомера – (+)-УК, в литературе нет данных о механизмах токсичности структурнородственных соединений или полусинтетических производных УК.

2.10 Антимитотический эффект усниновой кислоты

Многие метаболиты растений при определенной концентрации и определенном режиме их введения в организм прекращают деление (размножение) клеток. Эффект ингибирования деления клеток наблюдается при действии вещества на разные клеточные мишени - ДНК, различные ферменты (в частности, киназы) и другие белки. Как правило, антимитотический эффект характеризуют митотическим индексом, просчитав в поле зрения клетки с видимыми хромосомами и разделив это число на общее число клеток в поле зрения. Ещё в 1948 г авторы работы¹⁶⁴ заметили, что обработка УК ингибирует деление клеток икры морских

ежей. Более развёрнутые исследования¹⁶⁵ показали, что достаточно концентрации 10 мкг/мл уснината натрия чтобы полностью ингибировать репликацию ДНК, и, даже при использовании 1 мкг/мл, процесс частично подавляется. Происходит кроме того полное ингибирование образования аппарата веретена, хотя при воздействии на уже образованное веретено не наблюдается какого-либо влияния. Влияние (+)-УК на формирование аппарата веретена упоминается также в публикации¹⁰⁴. Авторы отмечают, что в исследовании, проведённом на мышах, после потребления мышами (+)-УК в разовой дозе 100 или 200 мг/кг не наблюдается изменения уровня ДНК при одновременном увеличении уровня микроядерных полихроматических эритроцитов. По-видимому, (+)-УК может блокировать процесс трансляции ДНК косвенно, путём нарушения биосинтеза РНК.

Антимитотический эффект УК продемонстрировала работа⁸³ в экспериментах на разнообразных клеточных культурах. Обнаружено, что УК резко тормозит пролиферацию протопластов *Nicotiana tabacum* (табака) даже при очень низких концентрациях, которые не являются токсичными для 90% клеток. В более высоких концентрациях (2,5-5 мкг/мл) УК полностью ингибирует способность протопластов к пролиферации. Однако, в концентрации в 5 раз меньшей, чем необходимо для достижения частичного ингибирования пролиферации (0,05 мкг/мл), УК обладает стимулирующим действием на способность протопластов к пролиферации. Антимитотический эффект наблюдался также в отношении опухолевых клеток человека. УК в концентрации 50 мкг/мл ингибирует пролиферацию всех испытанных клеточных линий, хотя и не полностью (40-70%). При увеличении экспозиции клеток к УК до 46 ч, процент ингибирования увеличивается до 70-90%. Как оказалось, клеточная культура Ishikawa подвергается 90%-ному подавлению роста и при воздействии на порядок меньшей дозы УК (5 мкг/мл), если время воздействия продлить до 46 ч.

Митотический индекс уменьшается при действии (+)-УК в концентрациях 100, 200, 300 мкг/мл¹⁶⁶. Авторы также подтвердили, что ингибирующий эффект усиливается и дозозависимо, и при увеличении времени обработки с 12 до 24 часов. В работе²⁸ сообщается об антипролиферативном эффекте УК в отношении клеточной культуры фибробластов мыши L-929, рост клеток ингибируется на 50% при воздействии УК в концентрации 5.5 мкг/мл. Ещё активнее УК подавляет рост опухолевых клеток К-562 (клеточная линия лейкемии человека) - МИК₅₀ 1.4 мкг/мл. О влиянии УК на образование и/или стабилизацию микротрубочек (белковая структура, участвующая в сегрегации хромосом во время митоза) сообщается в публикации¹⁶⁷. Авторы сообщают, что обработка клеток рака молочной железы MCF7 и рака легкого H1299 УК в дозе 29 мкМ не приводит к каким-либо морфологическим изменениям в микротрубочках или увеличению митотического индекса.

Кумар и соавт.¹⁶⁸ показали в экспериментах на линии кератиноцитов человека HaCaT, что воздействие (+)-УК на клеточную культуру связано с цитостатическим, а не цитотоксическим эффектом. Высвобождение лактатдегидрогеназы в культуральную среду осталось неизменным по сравнению с контрольной группой, что говорит о сохранении целостности мембраны. (+)-УК тормозит рост клеток с МИК₅₀ 2.1 мкМ, что свидетельствует о высокой антипролиферативной активности.

Суммируя данные публикаций, следует отметить явный дозо- и времязависимый антимитотический эффект УК в дозах ниже токсической (менее 5 мкг/мл), который, может быть связан с ингибированием образования аппарата веретена.

2.11 Генотоксический эффект усниновой кислоты

Ряд публикаций посвящён изучению способности УК воздействовать конкретно на ДНК, как клеточную мишень, в тестах на генотоксичность *in vitro*. Отсутствие генотоксичности УК подтвердили Шибамото и соавт.¹⁶⁹ в тесте Эймса (микросомный анализ на мутагенез), Леандро и соавт.¹⁷⁰ методом ДНК-комет на бактериях, Полат и соавт.¹⁷¹ методом хромосомных aberrаций и микроядерным тестом на культивированных человеческих клетках крови (5 линий) в различных концентрациях (0-200 мкг/мл). Майер и соавт.¹⁷² в экспериментах на ряде опухолевых клеточных культур человека также установили, что УК не повреждает ДНК. Результаты, полученные в работе¹⁷³ на лимфоцитах человека *in vitro* методом CBMN, показывают, что оба энантиомера УК не генотоксичны, о чём свидетельствует отсутствие индукции микроядер. Однако, результаты работы¹⁷⁰ продемонстрировали, что УК индуцирует повреждение ДНК в концентрации 60 и 120 мкг/мл в ДНК-комет исследовании *in vitro*. Хотя генотоксичный эффект не наблюдался авторами в микроядерном тесте на клетках V79 при тех же концентрациях УК.

Генотоксические эффекты не наблюдались *in vivo*¹⁷⁰ при потреблении мышами УК в дозах 25, 50, 100 и 200 мг/кг, контроль осуществлялся микроядерным и ДНК-комет тестами. Не обнаружено количественной разницы в содержании белков, РНК и ДНК в сперматозоидах мышей даже при длительном (35 дней) пероральном потреблении (+)-УК в дозах 200 мг/кг/день¹⁰⁴. Косвенно отсутствие генотоксического эффекта подтвердили Виеснер и соавт.¹⁷⁴. Авторы пытались снизить фертильность мышей добавлением в рацион УК, фертильность снизить не удалось, однако, в работе сообщается, что у следующего поколения генетических дефектов не наблюдалось.

Наряду с отсутствием генотоксического эффекта, УК проявляет сильный антимуtagenный эффект¹⁷⁰. При комбинированном введении УК и метилметансульфоната

(MMS, алкилирующий агент) значительно снижается частота образования микроядер и повреждений ДНК *in vitro* и *in vivo*, по сравнению с обработкой только алкилирующим агентом. Хотя механизмы, лежащие в основе защитного эффекта УК авторами не выяснены, защитный эффект этого метаболита против MMS-индуцированной генотоксичности может объяснить его антиоксидантная активность. Сильный антимуtagenный эффект проявили, кроме того, производные УК⁶⁶. Комплексы енаминов на основе УК (18) с медью, кобальтом, никелем и марганцем, а также сами свободные лиганды в дозах 20, 40, 60, 80 и 100 мкг/образец тестировались при воздействии на клеточные культуры известных мутагенов: азиды натрия, 9-аминоакридина и метилнитронитрозогуанидина.

В работе¹⁷⁵ отсутствие генотоксического эффекта было подтверждено теоретическими расчетами. Авторы показали, что энергии генерированного пульс-радиолизом триплетного состояния УК (142.6 кДж/М) недостаточно для генерирования триплета тимина (163.3 кДж/М), а значит и для повреждения ДНК.

Таким образом, отсутствие генотоксического действия УК было неоднократно подтверждено различными методами. Наличие антимуtagenного эффекта наряду с отсутствием генотоксичности может быть отнесено к ценным биологическим свойствам этого природного соединения.

2.12 Влияние усниновой кислоты на экспрессию генов

Воздействие УК на генетический аппарат организмов может выражаться опосредованно, путём изменения экспрессии генов. Ряд работ посвящён исследованию экспрессии генов при воздействии УК. В публикации¹⁶³ сообщается, что дозы УК 30 мг/кг/день недостаточно для влияния на регуляцию экспрессии генов крыс. Уровни экспрессии 542 генов, связанных с митохондриальной структурой и функцией печени самок мышей исследовался в работе¹⁷⁶. Значительное влияние УК на экспрессию нескольких генов имело место только в дозе 600 мкг/мл. Наблюдалась существенная индукция генов, ассоциированных с комплексами с I по IV цепи транспорта электронов. Кроме того, некоторые гены, участвующие в окислении жирных кислот, цикле Кребса, апоптозе, и мембранные транспортеры (гены транспорта через митохондриальную мембрану) были сверхэкспрессированы. Общий уровень апрегуляции 1.2-1.8. Однако, не наблюдалось изменения уровня экспрессии гена марганецсупероксиддисмутазы, индикатора окислительного стресса в митохондриях. Гены TFAM (транскрипционный фактор) и NRF-1 (ядерный респираторный фактор), обычно даунрегулируемые при митохондриальном биогенезе – процессе, запускаемом в ответ на окислительный стресс, также не были

затронуты. Таким образом, из-за ограниченных данных, трудно соотносить увеличение уровня экспрессии генов после обработки мышей УК с митохондриальным биогенезом. Апрегуляция генов комплексов I-IV может быть компенсаторным механизмом для поддержания протонного градиента внутренней митохондриальной мембраны. Кроме того, индукция окисления жирных кислот и цикла Кребса может быть адаптивным ответом на разобщение митохондрий.

Саху и соавт.¹⁵⁷ тестировали экспрессию 84 генов в ответ на воздействие УК. В публикации сообщается об апрегулировании генов CCL21 (воспалительный ответ), CCNC (пролиферация и карциногенез) и UGT1A4 (ДНК повреждения и репарация) и снижении экспрессии генов CSF2 (воспаление), CYP7A1 и CYP2E1 (оба ассоциированы с окислительным стрессом). Профили экспрессии дифференциально регулируемых и экспрессируемых белков в печени крыс после обработки УК анализировали авторы работы¹⁷⁷ с использованием доз УК от 100 до 240 мг/кг в день. Результаты экспериментов демонстрируют дифференциальную экспрессию 10 белков в крысах, обработанных УК, по сравнению с контролем. Эти белки связаны с окислительным стрессом, липидным обменом, а также несколькими другими молекулярными механизмами. Среди чувствительных к воздействию УК белков, шесть активируются, в том числе белки теплового шока HSP60, глюкозо-регулирующий белок 75 (Grp75), MAWDBP (белок, активируемый в ряде болезненных процессов), альбумин, белок Apo A-I, регулирующий уровень липопротеинов высокой плотности, и ферритин легкой цепи. В общей сложности четыре белка даунрегулируются, а именно транстиретин, обеспечивающий транспорт тироксина и ретинола (TTR), катехол-О-метилтрансфераза (COMT), белок-шаперон ERp29, белок стресса эндоплазматического ретикулума и пероксиредоксин (Prx4). На основании полученных данных авторы предполагают, что не только митохондрии, но и эндоплазматический ретикулум могут быть основными целями УК-индуцированной гепатотоксичности.

Таким образом, УК обладает сильным антимитотическим эффектом, ингибируя рост различных клеточных культур. Однако, эффект достигается не путём воздействия на ДНК. Отсутствие генотоксического эффекта подтверждено для обоих энантиомеров УК и для некоторых их производных. И на клеточном уровне, и в экспериментах на животных УК проявляет сильный антимутагенный эффект. Воздействие УК на генетический аппарат организмов выражается путём изменения экспрессии генов, связанных с окислительным стрессом и липидным обменом, профиль экспрессии подобен таковому известных митохондриальных ингибиторов.

2.13 Токсичность усниновой кислоты и её производных по отношению к раковым клеткам

Впервые противораковая активность УК была обнаружена в 1975 г. В поисках растительных источников противораковых веществ Купчан и соавт.¹⁷⁸ исследовали экстракт *Cladonia leptoclada*, обладающий такими свойствами. Мажорным компонентом экстракта оказалась (-)-УК. Эксперименты, проведенные на мышах с карциномой Льюиса, показали, что при потреблении (-)-УК, выделенной в индивидуальном виде, в дозах 20-200 мг/кг выживаемость мышей заметно повышается (135-152%).

Впоследствии эксперименты по изучению противораковых свойств УК проводили в основном *in vitro*. Так, авторы работы¹⁷⁹ установили, что (-)-УК обладает умеренным цитотоксическим действием на опухолевые клеточные культуры мыши и человека. IC₅₀ составила 6, 12.1, 15.8, 17.8, 8.2 и 6.8 мкг/мл для опухолевых линий L1210 (лимфолейкоз), 3LL (карцинома Льюиса), DU145 (карцинома простаты), MCF7 (аденокарцинома молочной железы), K-562 (хронический миелолейкоз) и U251(глиобластома). Практически такие же ингибирующие рост концентрации для (+)-энантиомера УК приведены в публикации¹²⁶. МИК₅₀ (+)-УК для линий U-937 и HL-60 (обе – моноцитарный лейкоз человека) составила 14.3 мкМ. Умеренную цитотоксическую активность против клеток саркомы 180 и опухолевых клеток Ehrlich проявила (+)-УК, выделенная из *Usnea fasciata*¹⁸⁰. В работе¹⁸¹ сообщается об действующих концентрациях (ИК₅₀) УК от 15 до 44 мкМ. (+)-УК также проявляет значительную противоопухолевую активность в отношении клеток HeLa (карцинома шейки матки) с ИК₅₀ 5.1 мкг/мл²⁸, к воздействию УК в концентрациях до 100 мкМ чувствительны опухолевые клетки гепатобластомы человека HepG2, ЛК₅₀ составила 30 мкМ¹⁵⁷.

Исследования авторов работы¹⁸² проводились на 9 линиях опухолевых клеток человека: A2780 (карцинома яичника), HeLa (аденокарцинома шейки матки), MCF-7, SK-BR-3 (обе - аденокарцинома груди), HT-29 (аденокарцинома толстой кишки), HCT-116 p53+/+, HCT-116 p53-/-, (карцинома толстой кишки человека p53 дикого типа, а также p53-ноль HCT-116 сублиния), HL-60 (промиелоцитарный лейкоз) и Jurkat (Т-клеточная лейкемия). ИК₅₀ УК для исследованных клеточных линий составила от 48.5 (HL-60) до 199.2 мкМ (SK-BR-3).

Во всех вышеописанных публикациях подтверждена цитотоксическая активность УК в отношении опухолевых клеток, но отсутствуют сравнительные данные о токсичности УК на здоровых клетках. Авторы работы¹⁸³ показали, что (+)-УК проявляет высокую токсичность не только в отношении опухолевых культур, ИК₅₀ для MM98 (злокачественная мезотелиома) варьировалась от 23 до 64 мкМ, для A431 (карцинома вульвы) от 39 до 72 мкМ, но и по

отношению к здоровым клеткам HaCaT (кератиноциты) колебалась в том же диапазоне 35-76 мкМ. То есть, токсичность УК для опухолевых и здоровых клетках сравнима. Та же тенденция наблюдалась в исследованиях¹⁸⁴. Авторы показали, что УК обладает цитотоксическим действием против клеточных линий меланомы UACC-62 и B16-F10. ИК₅₀ составили 91.5 и 137 мкМ соответственно. Но, поскольку здоровые клетки также показывают заметную чувствительность к УК (ИК₅₀ 120.2 мкМ), то, можно сказать, что (+)-УК явно не проявляет противораковую активность в отношении меланомы.

В пользу наличия противоракового эффекта УК свидетельствуют работа¹⁷³, в которой показано, что цитотоксические дозы УК в отношении здоровых клеток V79 заметно выше, чем для опухолевых A549 (эпителиальный рак легких человека). Ким и соавт.⁴³ также сообщают об отсутствии токсичности УК в клеточной культуре фибробластов кролика. В публикации¹⁸⁵ сообщается об эффективном действии УК на три линии клеток рака человека, MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HeLa (аденокарцинома шейки матки) и HCT-116 (рак толстой кишки). ИК₅₀ УК: MCF-7 - 75.7 мкМ, HeLa - 23.7 мкМ, HCT-116 - 17.7 мкМ. Авторами приведена для сравнения токсичность УК к нормальным клеткам линии NIH-3T3 (мышинные эмбриональные фибробласты), которая оказалась существенно ниже, ИК₅₀ более 100 мкМ.

Сравнительное исследование цитотоксичности энантиомеров УК проводили Копарал и соавт.¹⁷³. Авторами сообщается о значительном цитотоксическом и вызывающем апоптоз эффектах как в культуре лимфоцитов человека, так и на клеточных линиях V79 (линия клеток фибробластов легких китайского хомячка) и A549 (эпителиальный рак легких человека). МТТ-анализ на клеточной линии A549 показал, что (+)-УК относительно более токсична, чем (-)-УК (ЭД₅₀ 6.25 и 12.5 мкг/мл соответственно). Цитотоксичность обоих энантиомеров УК для клеточной культуры V79 (здоровые клетки) была относительно ниже, чем для A549. Дозы 6.25, 12.5 и 25 мкг/мл (-)-энантиомера УК не оказали цитотоксического действия, те же дозы (+)-УК оказались в небольшой степени, но токсичны на клетках V79. При этом, в работе приведены данные о том, что (-)-УК более эффективно вызывает апоптоз, чем (+)-энантиомер. При концентрации 10 мкг/мл частота апоптозных клеток для (+)-УК – 2.0 на 1000, для (-)-УК – 8.5 на 1000. При повышении концентрации УК растёт частота появления апоптозных клеток, но несколько нивелируется разница в действии энантиомеров УК. В исследованиях Хардардоттир и соавт.¹⁸⁶ и Эйнарсдоттир и соавт.¹⁸⁷ сообщается, что нет никакого существенного различия в потенциале двух энантиомеров УК в плане изучения биологических эффектов на человеческих раковых клетках. Исследовались две клеточные линии различного происхождения, одна из них с неактивным p53 - рак молочной железы T-47D, другая p53-зависимая - рак поджелудочной железы Саран-2. Авторами публикаций

установлено, что оба энантиомера УК являются эффективными действующими веществами с ИК₅₀ для (+) и (-)- УК соответственно 4,2 и 4,0 мкг/мл (Т -47D) и 5,3 и 5,0 мкг/мл (Сарап -2).

Исследование механизма противоракового действия УК проводилось в нескольких направлениях. Рядом исследователей изучалась активность УК в отношении транскрипции белка Р53. Эксперименты авторов работы¹⁷² на ряде опухолевых клеточных культур человека - клеток рака молочной железы MCF7 (активный р53), MDA-MB- 231(неактивный р53), H1299 (р53 независимый рак легкого) – показали, что активность транскрипции белка р53 не затрагивается. В MCF7 клетках, обработанных УК, хотя наблюдалось накопление белков р53 и р21, фосфорилирования р53 в Ser15 не было обнаружено, т.е. окислительный стресс и нарушение нормальных метаболических процессов в клетках, вызванных УК, не включают повреждение ДНК. Таким образом, УК является противораковым агентом, который работает р53-независимым образом. Несмотря на то, что Майер и соавт.¹⁷² считают, что УК действует р53 независимым образом, авторы работы¹⁸⁷ предполагают, что зависимость всё-таки есть, но она опосредована путём клеточной реакции на окислительный стресс, вызванный УК, и последующим фосфорилированием Ser20 в р53. Фосфорилирование р53 в Ser20 отличается от фосфорилирования р53 в Ser15 или Ser 46, отвечающих за индукцию апоптоза, и связано с клеточной реакцией на окислительный стресс при посредничестве протеинкиназы С и IκВ киназы α. В этой публикации¹⁸⁷ выявлена разница в воздействии УК на опухолевые клетки, некроз наблюдается в клеточной линии с функциональным р53 (Сарап -2) после выдержки с УК в течение 48 часов, а в клеточной линии с неактивным р53 (Т-47D) - нет. Бакорова и соавт.¹⁸⁸ также предполагают, что, по-видимому, хотя роль белка р53 не является решающей в гибели клеток после обработки УК, воздействие на него имеет место и может частично повлиять на общий результат. Авторы обнаружили, что экспрессия р53 сильно активируется в присутствии УК после первых 6 ч экспозиции А2780 раковых клеток.

Скорее всего, механизм цитотоксичности УК не связан с генерацией активных форм кислорода (АФК). Хотя Рабело и соавт.¹⁸⁹ предполагают причиной цитотоксического действия (+)-УК (20 мкг/мл) на клеточную линию SH-SY5Y (нейробластома человека) увеличение внутриклеточного производства АФК, Брисделли и соавт.¹⁸⁵, наоборот, наблюдали очень незначительное увеличение производства активных форм кислорода при действии УК на три линии клеток рака человека. В публикации¹⁵⁷ анализировали механизм цитотоксичности УК на опухолевых клетках гепатобластомы человека HepG2 через изменение ряда биохимических и токсикогеномных показателей. Авторы наблюдали увеличение активности Р450 цитохрома, кроме того, подтверждают, что УК вызывает окислительный стресс и митохондриальную дисфункцию.

Ещё об одном регуляторном механизме УК в отношении опухолей сообщили Сингх и соавт.¹⁹⁰. Исследователи показали, что одним из механизмов противоопухолевого действия УК является подавление образования клеточных колоний и уменьшение их размера. УК тестировалась на клеточной линии A549 (карцинома лёгких человека), сообщается, что использование дозы УК 25 мкМ при 24-часовом воздействии приводит к гибели 39% клеток, увеличение дозы до 100 мкМ и продление действия до 2 суток ведёт к 89% погибших клеток. Уменьшение дозы УК до 1-10 мкМ влияет на образование клеточных колоний, уменьшая их количество на 85% в сравнении с контролем. В публикации¹⁸² также подтверждается, что УК эффективно тормозит образование колоний клеток в концентрациях 100-200 мкМ. Исследования проводились на 9 линиях опухолевых клеток человека: A2780 (карцинома яичника), HeLa (аденокарцинома шейки матки), MCF-7, SK-BR-3 (обе - аденокарцинома груди), HT-29 (аденокарцинома толстой кишки), HCT-116 p53+/+, HCT-116 p53-/-, (карцинома толстой кишки человека p53 дикого типа, а также p53-ноль HCT-116 сублиния), HL-60 (промиелоцитарный лейкоз) и Jurkat (Т-клеточная лейкемия). ИК₅₀ УК составила от 48.5 (HL-60) до 199.2 мкМ (SK-BR-3).

Исследования по изучению влияния УК на процесс апоптоза опухолевых клеток проводились, в основном, в последнее десятилетие. Безивин и соавт.¹⁷⁹ установили, что для клеточной линии L1210 при действии УК выявляются морфологические изменения, характерные для апоптоза - конденсация ядерного хроматина, фрагментация ядер и образование апоптических тел. Показана способность вызывать апоптоз дозо- и времязависимо. При действии двукратной эффективной дозы (12 мкг/мл) в течение 2 суток наблюдается 63% апоптических клеток. Данные о индуцировании УК апоптоза подтверждаются в работе¹⁸², кроме того анализ распределения клеточного цикла также показал накопление клеток в S-фазе (синтез ДНК) при действии УК. Авторы работы¹⁹⁰ сообщили, что УК ингибирует рост клеток в G0/G1 фазе клеточного цикла, вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны, двукратно увеличивает число клеток с апоптозом и разрушает поли(АДФ-рибоза)-полимеразу (ПАРП), известный маркер митохондриального и каспаза-опосредованного апоптоза. По-видимому, УК вызывает апоптоз клеток через деполяризацию митохондриальной мембраны. Данные работы¹⁸⁸ свидетельствуют об индукции апоптоза при действии УК на клетках A2780 (карцинома яичника) и HT-29 (аденокарцинома толстой кишки), зафиксирована фрагментация геномной ДНК и активация каспазы-3. Расщепление ПАРП, которая, как известно, участвует в ряде клеточных процессов, например, репарации ДНК, коррелирует с наблюдаемой активацией каспазы-3. Авторы исследовали экспрессию и активацию митоген-активируемой протеинкиназы p38 MAPK, которая ответственна за различные стресс-стимулирующие

факторы, в том числе цитокины, ультрафиолетовое излучение, тепловой шок и осмотический шок, а также вовлечена в процесс апоптоза. УК стимулировала фосфорилирование p38 в HT-29 клетках, в A2780 – нет. Уровень антиапоптотических белков Bcl-2 снижался в клетках A2780, что свидетельствует о массовой гибели клеточных структур, в том числе митохондрий. По результатам комплексных исследований клетки A2780 более чувствительны к действию УК, чем клетки HT-29.

Классического апоптоза с фрагментацией ДНК не наблюдали авторы работы¹⁸⁷. Цитометрический анализ подтвердил, что одинаково чувствительны к значительному ингибирующему эффекту УК и рост клеток, и синтез ДНК, и вход в S-фазу клеточного цикла, однако, при этом выживание клеток не сильно менялось. В обеих клеточных линиях Саран-2 и T-47D воздействие УК привело к значительным потерям митохондриального мембранного потенциала. Некроз выявлен только в клеточной линии с функциональным p53 (Саран -2) после выдержки с УК в течение 48 часов.

В работе¹⁹¹ сообщалось о ещё одной клеточной мишени действия УК в опухолевых клетках. В исследованиях *in vitro* (концентрация УК 1 мкг/диск) и *in vivo* (50 мг/кг/день внутрибрюшинно) обнаружено, что УК сильно тормозит ангиогенез и рост опухоли молочной железы BCAP-37, не затрагивая массу тела мышей. *In vitro* показано, что УК не только значительно ингибирует пролиферацию эндотелиальных (HUVEC) и опухолевых (BCAP-37) клеток, миграцию клеток и формирование сосудистых трубок, но также индуцирует морфологические изменения и апоптоз в эндотелиальных клетках в концентрациях 10-50 мкМ дозозависимым образом. УК блокирует рецептор фактора роста эндотелия сосудов, опосредованно регулируя уровень внеклеточных протеинкиназ 1 и 2 (ERK1/2) и сигнального пути АКТ/P70S6K в эндотелиальных клетках. Авторы установили, что УК ингибирует активацию каскада ERK, ключевого сигнального пути в системе MAPK-сигнальных путей в опухолевом ангиогенезе.

Попытки улучшить терапевтическую активность УК путём использования средств доставки предприняты в исследовании¹⁹². Авторы использовали распространённый способ доставки - инкапсулирование УК в капсулы из биоразлагаемых полиэфиров - сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA). Свободную и инкапсулированную УК тестировали *in vitro* на клетках HEp-2 (плоскоклеточный рак гортани). Эффективная доза ингибирования роста клеточной культуры на 50% (ИК₅₀) составила 12.6 и 14.4 мкг/мл соответственно, что говорит об отсутствии желаемого эффекта. Однако, в экспериментах *in vivo* тех же авторов¹⁹² на мышах с саркомой-180 процент ингибирования роста опухоли инкапсулированной УК был выше (63%), чем свободной (42%). При этом наблюдалась существенная разница в гистологических срезах: при воздействии свободной УК возникает множество

некротических очагов в опухоли, инкапсулированной – некроз менее выражен. Аналогичные нанокапсулы использовали авторы работы¹⁹³ для уменьшения цитотоксичности УК в процессе лечения саркомы-180 у мышей. Инкапсуляция УК в PLGA-нанокапсулы на 26,4% сильнее ингибировала рост асцитной опухоли (саркома-180) по сравнению с обработкой свободной УК. Наблюдаемые морфологические изменения - вакуолизация гепатоцитов и лимфоцитарная инфильтрация – были менее выражены при использовании инкапсулированной УК.

Усилить цитотоксическую активность УК в отношении клеток K-562 (эритроцелочный лейкоз человека) путём повышения растворимости в воде пытались авторы работы¹⁹⁴, для чего использовали ряд комплексантов. Наилучшие результаты были получены при использовании для комплексообразования с УК полиэтиленгликоля 400 (PEG400) и 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина, ЭД₅₀ комплексов составили 3.0 и 4.7 мкг/мл соответственно. ЭД₅₀ определяли как количество вещества, требуемое для того, чтобы уменьшить поглощение тимидина 50% в сравнении с поглощением необработанной контрольной культурой.

С целью повысить цитотоксическую активность (-)-УК, обнаруженную Купчан и соавт.¹⁷⁸, авторы работы¹⁹⁵ синтезировали серию её производных. Ключевой стратегией синтеза было выбрано повышение биодоступности путём повышения водорастворимости. Эту цель авторы достигали разрывом внутримолекулярных водородных связей, в том числе получением эфиров по фенольным группам ароматического фрагмента (соединения **4**, **6** (рис. 3), **36**, **37** (рис. 8)), разрушением трикетонной системы (соединения **5**, **6** (рис. 3), **34**, **35**, **36** (рис. 8)).

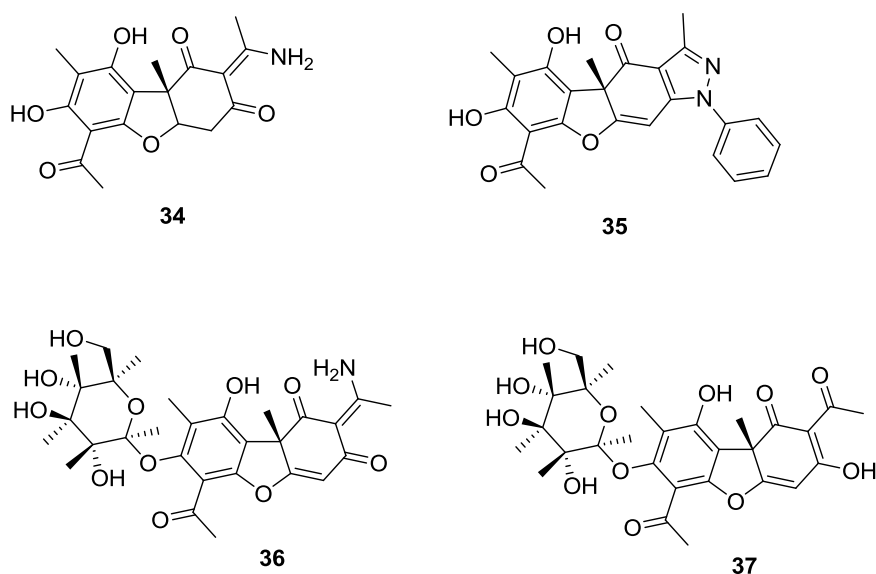


Рисунок 8. Производные усниновой кислоты, тестируемые на цитотоксическую активность.

Анализ структура - активность данных по цитотоксичности показал, что β -трикетонный фрагмент, а следовательно, и липофильные свойства УК, важны для цитотоксичности. Ни одно из тестируемых производных не показало активности на клетках карциномы Льюиса лёгких выше, чем сама (-)-УК. Помимо карциномы Льюиса, тестирование проводилось также в тест-системах лейкемии P388 и показало незначительное увеличение выживаемости подопытных животных по сравнению с контрольными группами.

Первая группа, в том числе УК **1**, ее ацетаты и близкие аналоги (**4-6**), почти полностью подавляет клеточный рост на уровне 14 мкМ. Несколько меньшую цитотоксичность имеют соединения **34** и **35**, производные УК с модификацией β -трикетонной части. Наиболее гидрофильные соединения в этом ряду (гликозиды **36** и **37**) составляют третью, и наименее цитотоксическую группу. Косвенно, важность трикетонного фрагмента в цитотоксичности подтвердили авторы работы⁵⁹. В ряду родственных УК дибензофуранов, соединение **13** (рис. 3), с нарушенной системой водородных связей в трикетонном фрагменте существенно теряет цитотоксичность в отношении клеток MDCK (клетки почечного эпителия), его IC_{50} составила 190 мкг/мл. В то время как соединения **11** и **12** (рис. 3) были намного более цитотоксичны, IC_{50} 4.6 и 3.6 мкг/мл соответственно. Также не удалось получить более цитотоксичные соединения модификацией трикетонного фрагмента УК авторам работы⁸⁸. Гидразоны ароматических кислот **21** (1-фенил и 1-изоникотиноил, рис. 5) получали на основе обоих энантиомеров УК, тестирование проводили *in vitro* на опухолевых клетках человека. Обнаружена незначительная цитотоксическая активность производных, также авторы отмечают, что правовращающие соединения активнее производных на основе (-)-УК.

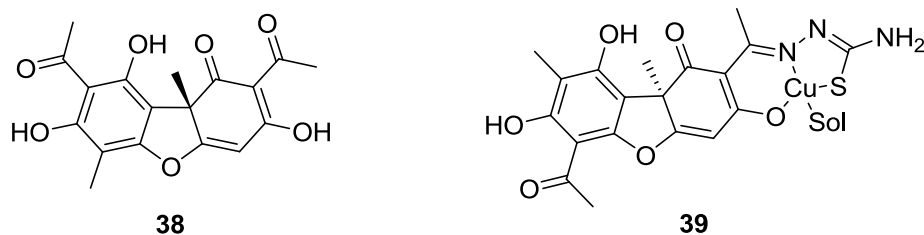


Рисунок 9. Производные усниновой кислоты, тестируемые на цитотоксическую активность.

Однако, не только наличие трикетонного фрагмента определяет цитотоксичность соединения. В публикации¹⁹⁶ сообщается, что (-)-изоусниновая кислота **38** (рис. 9), отличающаяся положением заместителей в фенольном фрагменте и обладающая трикетонной частью, не проявила цитотоксической активности в отличие от самой (-)-УК по отношению к опухолевым клеткам HT-29 (колоректальный рак человека).

Увеличение цитотоксической активности в ряду производных УК впервые наблюдали авторы работы⁶⁵. Комплексы ацилгидразидов УК с Pd (II) и Cu (II) были протестированы *in*

in vitro на клетках карциномы шейки матки HeLa. Все исследованные соединения проявили цитотоксическую активность в отношении HeLa с ИК₅₀ от 1.8 до 86.0 мкМ, но лишь некоторые оказались активнее самой УК (ИК₅₀ 14.9 мкМ). Например, комплекс тиосемикарбазида УК с медью **39** (рис. 9, ИК₅₀ 1.8 мкМ). Основываясь на данных о высокой активности полиаминной транспортной системы в раковых клетках авторы работы⁹ синтезировали девять аминопроизводных УК с синтетическими и природными полиаминами с целью их селективной и быстрой доставки в опухолевые клетки системой транспорта полиаминов. Конъюгаты были тестированы на мышиных и человеческих линиях раковых клеток: L1210 (лимфолейкоз), 3LL (карцинома Льюиса), DU145 (карцинома простаты), MCF7 (аденокарцинома молочной железы), K-562 (хронический миелолейкоз) и U251(глиобластома), а также на 2 опухолевых клеточных линиях хомяка. Некоторые производные показали значительную цитотоксичность в клетках L1210, однако их действие оказалось независимым от системы транспорта полиаминов. Наиболее активное 1,8-диаминооктан-производное **40** (рис.10) оказывает аналогичное действие на все линии раковых клеток и вызывает апоптоз. При сравнении апоптозиндуцирующей активности (+)-УК и ее 1,8-диаминооктан-производного **40** в клетках L1210 обнаружено, что процент апоптоза примерно одинаковый, а ингибирующая концентрация производного существенно ниже (ИК₅₀ 3-6 мкМ). Авторы отмечают, что присутствие первичной аминогруппы на конце алкильной цепи также имеет большое значение для цитотоксичности, что иллюстрируется отсутствием цитотоксической активности нониламинопроизводного **41** (ИК₅₀ на L1210 > 500 мкМ).

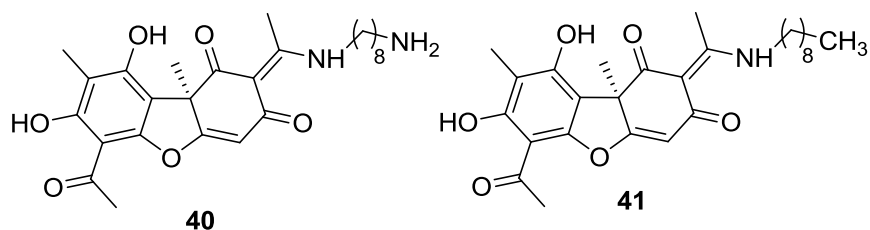


Рисунок 10. Производные урсниновой кислоты, тестированные на цитотоксическую активность.

В работе⁹⁹ показано, что производные (+)-УК с аминокислотами проявляют цитотоксичность в отношении клеточной линии HaCaT (иммортиализованные кератиноциты человека). Авторы установили, что ингибирующая концентрация сильно различается в зависимости от строения аминокислотного остатка. ИК₅₀ производного с γ -аминомасляной кислотой (ГАМК) **42** (рис. 11) – 150 мкг/мл, соединение с остатком глицина **28** (рис. 7) оказалось наиболее токсичным – 4.1 мкг/мл. Для сравнения токсичность по отношению к HaCaT самой (+)-УК – 24 мкг/мл.

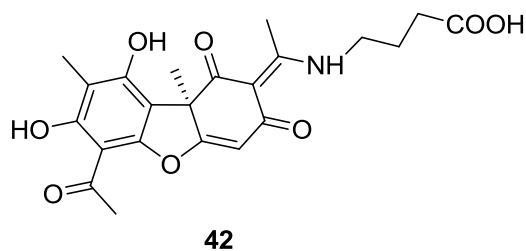


Рисунок 11. Производное усниновой кислоты, тестируемое на цитотоксическую активность

Таким образом, УК проявляет противораковые свойства в умеренной степени, действующие концентрации порядка 10^{-6} М и выше. При действии её на опухолевые клеточные линии наблюдаются общие цитотоксические эффекты: повышение уровня активных форм кислорода, окислительный стресс, некроз. Исследования ряда авторов позволяют предположить, что основным механизмом противоопухолевого действия УК является апоптоз, но не классический, а митохондриальный. Специфические пути воздействия УК на опухоли включают подавление роста клеточных колоний и ингибирование ангиогенеза в опухоли. Применение средств доставки незначительно улучшает противоопухолевое действие УК. Недостаточно сравнительных данных о противораковом действии энантиомеров УК, в ряде случаев можно говорить о большей эффективности (-)-энантиомера. Опубликованные данные о цитотоксичности производных УК говорят о перспективности синтеза противоопухолевых агентов на её основе. Исследования «структура-свойства» позволяют предположить, что цитотоксичность производных УК связана с их липофильностью, при этом важную роль играет трикетонная система кольца С УК.

2.14 Аллергенные свойства усниновой кислоты

Способность УК вызывать аллергическую реакцию известна довольно давно. Об аллергических свойствах самой УК, содержащих УК лишайников и парфюмерных композиций неоднократно сообщалось в ряде публикаций^{197,198,199,200,201,202}.

Однако, авторы работы²⁰³ продемонстрировали, что (+)-УК не вызывает аллергию у морских свинок. Исследования²⁰⁴ индивидуальных энантиомеров УК, проведённые на морских свинках методом FCA (Адьювант Фрейнда полный), показали, что оба энантиомера являются слабыми аллергенами, но при этом (-)-УК сенсибилизирует в 2 раза сильнее, чем (+)-УК.

Тесты на людях (3 пациента) еще в 1966 году показали, что более выраженным сенсибилизирующим действием обладает, наоборот, (+)-УК²⁰⁵. Позднее²⁰³, эти результаты

были подтверждены в исследовании на 7 пациентах-лесниках. Авторами использовались различные дозы УК в вазелине, показано, что в концентрации 0.1% (+)-УК приводит к развитию аллергии, а (-)-УК даже в концентрации 5% не сенсibiliзирует. Чувствительность к (+)-УК была подтверждена также Сало и соавт.²⁰⁶ на 9 пациентах. Авторы показали, что 1%-ный раствор (+)-УК в петролейном эфире вызвал дерматит у 5 пациентов, а такая же концентрация (-)-УК – только у трёх из них. Исследования^{200,201,202,207} подтвердили наличие у некоторых пациентов аллергии на (+)-УК. Авторы работы¹⁹⁷ позднее показали, что УК является наиболее вероятным действующим компонентом в развитии аллергии на парфюм «oak moss», 5 из 7 пациентов, имеющих аллергию на эту композицию, чувствительны к действию (+)-УК в концентрациях от 0.001 до 0.1%. То, что механизм аллергии каким-то образом связан с фоточувствительностью установили авторы работ^{208,209}.

Тестирование некоторых производных УК, модифицированных по разным фрагментам молекулы (изоусниновая кислота **38** (рис. 9), диацетилпроизводное **4**, дигидроусниновая кислота **5**, диацетилдигидроусниновая кислота **6**, соединения с разомкнутым кольцом **7** и **8**, все – рис. 3) показало отсутствие у них аллергического действия²⁰⁵.

Таким образом, согласно большинству опубликованных работ УК оказывает аллергическое действие на организмы. По-видимому, люди чувствительнее к (+)-УК, морские свинки к (-)-энантиомеру. Среди исследованных производных УК нет вызывающих аллергию соединений.

2.15 Фармакокинетика усниновой кислоты

Первое системное исследование фармакокинетики (+)-УК проводили в 1992 г. на кроликах при внутривенном (доза 5 мг/кг) и пероральном (доза 20 мг/кг) её введении²¹⁰. Следует отметить, что авторы использовали так называемую растворимую форму, а именно натриевую соль УК. Время полувыведения при внутривенном администрировании составило 4-17 часов. При пероральном введении значительно удлиняются время полужизни УК в плазме (18.9 часа против 11.4 часа для внутривенного) и период полувыведения. Пиковая концентрация УК в плазме (32 мкг/мл) достигается примерно через 12 часов, а биодоступность составляет 78%. Кроме того, авторы отмечают, что более чем необходимая концентрация для ингибирования роста микобактерий (8 мкг/мл) сохраняется при внутривенном введении в течение 12 ч, а при пероральном – 48 часов, что достаточно при использовании УК в лечении туберкулёза. По данным работы²¹¹ системный клиренс УК составил 12 мл/ч/кг. В публикации²¹² сообщается, что клиренс УК в первую очередь

определяется фазой I метаболизма, а время полужизни УК в микросомах печени человека составило 19.3 ± 0.58 мин.

Связывание (+)-УК с белками плазмы изучалось *in vitro* в работе²¹³. Авторами обнаружена высокая способность УК к связыванию с белками, достигающая 99% в диапазоне используемых концентраций УК 1-5 мкг/мл. Исследование показало наличие двух типов связывания с константами ассоциации $34.3 \cdot 10^{-4}$ и $1.43 \cdot 10^{-4}$ соответственно. Анализ распределения УК в тканях крыс проводили Кришна и соавт.²¹³ и установили, что при интраперитонеальном введении УК преобладает в хорошо кровоснабжаемых органах. У крыс, которые получили дозу 25 мг/кг, концентрации УК в печени, легких и крови были несколько выше, чем концентрации в плазме. В лёгких также наблюдается высокий уровень распределения ткань/плазма, что свидетельствует о хороших перспективах использования УК в лечении лёгочных болезней.

Данные о связывании УК с белками плазмы крови были подтверждены исследованием²¹², в котором установлено, что УК в концентрации 1 мкМ связывается с белками плазмы человека на 99.76% и на 99.49% в плазме крови крыс. Эти данные показывают, что связывание УК с белками может замедлить клиренс и будет значимым фактором при расчете воздействия лекарств или при выводе фармакокинетических параметров человека в доклинических исследованиях.

Помимо выведения в неизменном виде, УК также метаболизируется в организмах различными путями. Бандони и соавт.⁸² установили, что в растениях УК метаболизируется различными микроорганизмами, в том числе некоторыми видами грибов рода *Penicillium*, а также *Absidia coerulea*, *Mortierella pusilla*, *Rhizopus stolonifer* и *Mucor ramanianus*. Канадскими исследователями²¹⁴ выделены из микобионтов лишайников некоторые ферменты, метаболизирующие УК. Например, из мицелия *Mortierella isabellina* выделен фермент, метаболизирующий УК до дезацетилусниновой кислоты **43** (рис. 12).

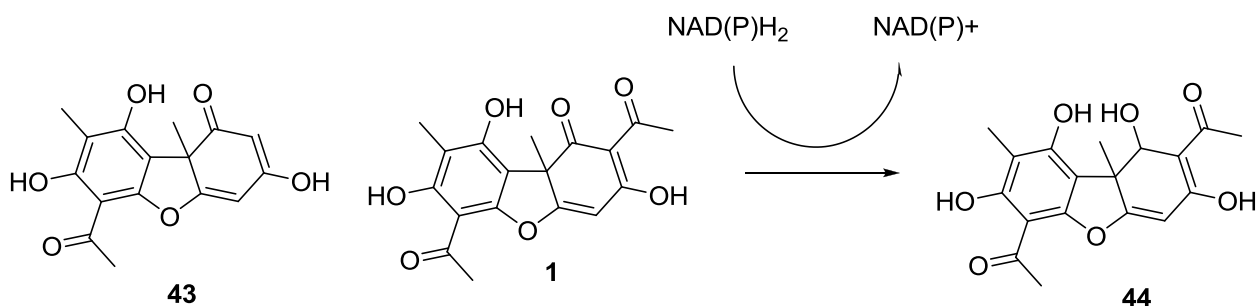


Рисунок 12. Структура дезацетилусниновой кислоты **43**. Метаболизм усниновой кислоты под действием ферментов D-УК дегидрогеназы и D,L-УК дегидрогеназы.

А из микобионта лишайника *Evernia prunastri*²¹⁵ выделены 2 фермента: D-УК дегидрогеназа и D,L-УК дегидрогеназа. Оба этих фермента катализируют восстановление карбонильной группы кольца С УК до гидроксильной (соединение **44**, рис. 12)²¹⁶. В работе²¹² методом хроматомасс-спектрометрии показано, что в микросомах печени УК метаболизируется с образованием трёх моногидроксилированных метаболитов (соединения **45** и **46** - предполагаемые авторами метаболиты, рис. 13) и двух региоизомерных конъюгатов её с глюкуронами.

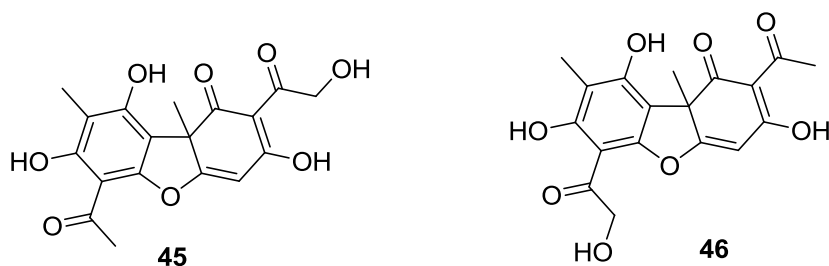


Рисунок 13. Предполагаемые структуры метаболитов усниновой кислоты.

Ряд работ посвящён возможным метаболическим путям УК в организмах млекопитающих. Авторы работы¹⁵³ показали, что уровень анилингидроксилазы CYP2E1 в цитохроме P450 увеличивается в присутствии (+)-УК, что говорит о возможном пути деградации УК через этот фермент. Другой метаболический путь наблюдали Фоти и соавт.²¹². В исследовании показано, что глюкуронидация УК протекает под действием дифосфатуридин-глюкуронозилтрансферазы BCT1A1 и UDP-глюкуронозилтрансферазы UGT1A3. А в присутствии фурафиллина, ингибитора CYP1A2, время полужизни УК возрастает в 10 раз, что означает, что окислительный метаболизм протекает в основном с участием цитохрома P450 CYP1A2. При этом УК выступает как сильный ингибитор некоторых ферментов CYP2C человека, не являясь индуктором основного человеческого P450. Этот эффект приобретает значимость при совместном действии лекарств, поскольку из-за мощного ингибирования ферментов CYP2C УК может участвовать в лекарственных взаимодействиях путем ингибирования клиренса нескольких важных классов препаратов, таких как ингибиторы протонной помпы, противосудорожные препараты, антикоагулянты, противодиабетические, блокаторы ангиотензина II и отдельные нестероидные противовоспалительные препараты.

Изучение метаболизма УК проводили Ши и соавт.²¹⁷ в исследовании *in vitro* на гепатоцитах крыс. В публикации сообщается, что цитотоксичность УК значительно возрастает при ингибировании цитохромов CYP1A или CYP3A. Уже через 2 ч воздействия ингибиторов CYP совместно с УК наблюдается угнетение клеточного дыхания, через 4 часа снижается уровень лактатдегидрогеназы и АТФ. Эти данные свидетельствуют о том, что УК

метаболизируется вероятно цитохромами СYP1A и 3A до менее токсичных, чем она сама, метаболитов. Ингибитор цитохрома СYP2B/2C не оказывал эффекта на метаболизм клеток.

Суммируя, следует отметить, что УК очень хорошо связывается в организме с белками плазмы, распределяется в хорошо снабжаемых кровью тканях, медленно выводится, а метаболизируется, по-видимому, путём гидроксирования и глюкуронидации при участии различных цитохромов.

2.16 Антиоксидантные свойства усниновой кислоты

Хорошо известно, что лишайники способны защищать себя от повреждений, вызываемых окислительным стрессом. Предполагается, что важную роль в защите таллуса от окисления играют фенольные лишайниковые вещества, способные гасить образующиеся радикальные частицы²¹⁸. Окислительный стресс (атака свободных радикалов) может привести к повреждению многих биологических молекул, таких как белки, ДНК, липиды клеточных мембран и т.д. Полифенолы растений, к классу которых относится и УК, хорошо известны своим антиокислительным действием. Они гасят свободные радикалы, тем самым нарушая цепную реакцию перекисного окисления липидов. Активные формы кислорода, такие как супероксид-анион, пероксид водорода, и гидроксильные радикалы, постоянно производятся во всех живых клетках и потенциально токсичны. Наиболее высокую мощность окислителя имеет гидроксильный радикал, и это, вероятно, наиболее реакционноспособный радикал. Он способен присоединиться к нуклеотидам ДНК и являться причиной поломки нити, что способствует канцерогенезу, мутагенезу и цитотоксичности. Кроме того, важную роль в развитии окислительного стресса играют другие активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА) и перекисное окисление липидов. Антиоксидантная активность любого соединения напрямую связана с его способностью гасить свободные радикалы. Антиоксидантная активность фенольных соединений, как правило, измеряется методом анализа перекисного окисления липидов.

То, что УК выступает в качестве защитного вещества при окислительном стрессе, предположили авторы работы²¹⁹, поскольку её содержание значительно (на 36%) выросло в лишайнике *Parmelia soredians* в ответ на действие гербицида «Paraquat», вызывающего окислительный стресс. Неоднократно отмечалось, что содержание УК значительно вырастает также в ответ на УФ облучение^{220,221,222,223}. Способность УК поглощать радикалы, генерируемые средневолновым УФ излучением (УФ-В), также наблюдали Ранцан и соавт.²²⁴. Причём фактор защиты, определённый авторами в экспериментах *in vivo*, составил 5, что сравнимо с коммерческими солнцезащитными агентами.

Антиоксидантное действие УК *in vivo* изучали Одабасоглу и соавт.²²⁵. Эксперименты проводились на крысах с язвой, индуцированной индометацином с использованием доз УК от 25 до 200 мг/кг массы тела. Во всех изученных дозах УК проявляет себя как антиоксидант, обращая окислительное действие индометацина. Известно, что введение индометацина снижает уровень супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (GPx) и восстановленного глутатиона (GSH), увеличивает уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), таким образом, повышая продукцию АФК. Введение всех доз УК обращает эту тенденцию. Авторы предполагают, что гастропротективный эффект УК может быть связан с её восстановительным влиянием на окислительные повреждения. Авторы работы²²⁶ установили, что при действии ультрафиолетового излучения УК в низких концентрациях (10^8 и 10^6 М) демонстрирует антиоксидантную активность в отношении клеток Т-лимфоцитов человека. Клетки крови повышают свою метаболическую активность и показывают хорошую выживаемость в сравнении с контролем. В работе¹⁷¹ в экспериментах на 5 культивированных человеческих линиях клеток крови также показано, что УК обладает антиоксидантными функциями. Окислительные эффекты УК оценивались по уровню биохимических показателей общая антиоксидантная емкость (TRAP) и общий окислительный статус (TOS). Низкие концентрации (1 и 5 мкг/мл) УК вызывают увеличение уровней TRAP в культурах клеток, при этом уровни TOS не менялись ($p > 0,05$) при использовании всех концентраций (до 200 мкг/мл) УК. Количественные исследования провели Бехера и соавт.²²⁷. Авторами определена концентрация УК, необходимая для гашения 50% свободных радикалов, которая варьировалась от 195 до 214 мкг/мл для разных радикальных частиц. Степень антиоксидантной активности менялась дозозависимо, процент ингибирования АФК составил 4.85% при концентрации 5 мкг/мл и 51.21% при 200 мкг/мл, подобные зависимости наблюдались также и для ингибирования NOS - от 23.46 до 52.19 % и для перекисного окисления липидов (24.44 - 46.57%).

Ряд публикаций посвящён способности УК содействовать перекисному окислению липидов. Авторы работы²²⁶ показали, что в концентрациях 10^4 М при жёстком облучении клеток УК выступает как прооксидант, ухудшая и выживаемость, и клеточный метаболизм. Аталай и соавт.²²⁸ подтвердили, что при использовании достаточно высокой концентрации УК (250 мкг/мл) антиоксидантного эффекта (+)-УК не наблюдается. В тесте на лецитинсодержащих липосомах не зафиксировано видимого эффекта, а при окислении другой липидной системы - эмульсии линолевой кислоты - наблюдается прооксидантное действие УК. Данные об отсутствии антиоксидантного действия (+)-УК сообщили Толедо Маранте и соавт.¹²⁶, в работе показано, что даже в высоких дозах 100 и 250 мкМ (+)-УК не ингибирует процесс перекисного окисления липидов. Брисделли и соавт.¹⁸⁵ в исследованиях

на трёх опухолевых клеточных линиях человека показали, что УК не проявляет способность гасить устойчивый свободный радикал DPPH вплоть до концентрации 800 мкМ, и хотя не увеличивает внутриклеточный уровень АФК, но и не предотвращает окислительное повреждение, вызванное трет-бутилгидропероксидом. Аналогичные результаты, подтверждающие отсутствие антиоксидантного действия УК по отношению к процессу перекисного окисления липидов, получили Кумар и соавт.²²⁹ в экспериментах на культуре клеток полиморфноядерных лейкоцитов. Интересно, что Сантос и соавт.²³⁰ сообщили о том, что (+)-УК вызывает высвобождение NO, а Йин и соавт.²³¹, что УК ингибирует продукцию NO с ИК₅₀ 4,7 мкМ.

Наиболее обстоятельно к исследованию окислительных свойств УК подошли Рабело и соавт.¹⁸⁹. Дабы прояснить вопрос – прооксидант или антиоксидант УК, авторы использовали несколько методов оценки окислительного действия и тестировали УК в концентрациях от 2 нг/мл до 20 мкг/мл. Кроме того, авторами рассчитана общая антиоксидантная емкость (TRAP), которая свидетельствует о значительной антиоксидантной способности УК в самых высоких концентрациях. В результате исследований *in vitro* на нейроноподобных клетках SH-SY5Y авторы работы¹⁸⁹ выяснили, что (+)-УК действует бифункциональным образом. А именно, в исследованном диапазоне концентраций эффективно гасит гидроксильные радикалы и окись азота, однако, в этом же диапазоне концентраций усиливает липопероксидацию. Последний эффект приводит к уменьшению жизнеспособности клеток при высокой концентрации УК (20 мкг/мл) через 1 ч и 4 ч, а при низкой (2 мкг/мл) - через 24 ч. Авторы считают, что при воздействии УК перекисное окисление липидов может происходить не только за счет опосредованного окисления свободными радикалами, но также и по пути ферментативного окисления. При изучении механизма действия установлено, что УК не проявляет защитного эффекта против H₂O₂-индуцированной гибели клеток. Исследования также показали, что УК вызывает изменения в морфологии клеток, что может являться следствием увеличения внутриклеточного производства АФК. В результате наблюдается снижение жизнеспособности клеток с последующей гибелью.

Изучение взаимодействия УК с различными радикальными частицами показало, что УК охотно реагирует с озоном. При этом УК сама не способна ни реагировать с синглетным кислородом, ни генерировать его даже в концентрации 10⁻³ M²³². Другие окисляющие радикалы (NO₂[•]; Br₂⁻; N₃⁻; OH[•] и SO₄⁻), как оказалось, также не реагируют с УК²³³. Измеренная антирадикальная сила УК, определённая в тестах по гашению радикалов DPPH, составила 0.1124. Этот показатель определяли как 1/ИК₅₀, где ИК₅₀ - концентрация УК, которая уменьшает уровень DPPH на 50%. Кроме того, авторы показали, что генерированное пульс-радиолизом триплетное состояние УК может гасить АФК, но его энергии (142.6

кДж/М) недостаточно для генерирования триплета тимина (163.3 кДж/М), а значит и для повреждения ДНК. В работе²³⁴ *in vitro* определена количественно способность УК гасить радикалы. Радикал-улавливающая активность УК в отношении АФК составила 59.9%, АФА - 56.9% и наблюдалось полное отсутствие активности по гашению радикалов DPPH.

Очевидно, что УК может проявлять переменные окислительно-восстановительные свойства в зависимости от дозы, условий и/или клеточного окружения (она и гасит АФК, и их генерирует в разных тестах), выступая как прооксидант или антиоксидант. Поскольку УК усиливает липопероксидацию, то более токсичное действие УК будет наблюдаться в богатых липидами системах.

2.17 Ферментингибирующая активность усниновой кислоты и её производных

Системного изучения взаимодействия УК с ферментами не проводилось. Большинство публикаций содержит отрывочные данные, как правило, полученные при исследованиях других аспектов её биологической активности.

В работе¹⁶⁵ высказано предположение, что причиной блокирования митоза в оплодотворённой икре морских ежей и в *M. tuberculosis* является ингибирование ДНКазы. Авторы считают, что УК участвует в ингибировании в виде комплекса с кобальтом, её действующая концентрация определена как 1-10 мкг/мл. Висенте и соавт.²³⁵ сообщают, что (-)-УК ингибирует активность ВИЧ-1 и ВИЧ-2 интегразы, топоизомеразы I млекопитающих и связывает фермент HRPD. Блокирование фермента HRPD при действии (-)-УК может приводить к ингибированию биосинтеза каротиноидов, отмечают авторы работы²³⁶. Есть данные, что УК ингибирует некоторые ферменты в микроорганизмах²³⁷ и оказывает влияние на концентрации фитогормонов в томатах²³⁸. При выращивании томатов в среде с добавлением 30 мкМ (+)-УК снижаются концентрации фитогормонов, например, уровень индол-3-уксусной кислоты составил 61% и 66% в листьях и корнях соответственно. В публикации²³⁹ показано, что (-)-УК образует комплекс с D-фруктоза-6-Р-аминотрансферазой в растворе. Авторами установлены два сайта связывания с высоким сродством к лиганду и шесть с низким.

Сообщается, что УК способна связывать уреазу, механизм ингибирования связан с образованием больших неактивных агрегатов УК и уреазы^{235,240}. Предполагается, что (-)-УК блокирует основные тиоловые (-SH) группы молекулы уреазы. Это предположение подтверждено тем, что L-цистеин частично обращает ингибирование уреазы путем конкурентного связывания с УК по его тиоловой группе²⁴¹. Исследования по влиянию УК на фермент аргиназу²⁴² показали, что УК имеет влияние на активность гликолизированной

аргиназы в концентрациях от 20 до 120 мкМ, возможно, воздействуя на её гидролиз, поскольку не обнаружено влияния УК на уровень активности индуцибельной (негликолизированной) аргиназы. В публикации²⁴³ сообщается, что УК ингибирует очищенную аргиназу, концентрация полного насыщения 0.14 мкМ, а количество сайтов связывания - 28. УК ингибирует ферменты 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазу (HMGR) и ангиотензин-превращающего фермент (ACE) в концентрации от 50 до 250 мкг/мл неконкурентоспособный путём¹⁸⁹.

Ряд публикаций сообщает примеры отсутствия фермент-УК взаимодействия. В экспериментах²⁴⁴ *in vitro* УК в концентрации 3.33-100 мкг/мл не проявила ингибиторной активности в отношении 12S-липоксигеназы тромбоцитов, фермента вовлекаемого в ангиогенез опухоли. (-)-УК даже является активатором некоторых ферментов, способствует секреции глюкозаминфосфата изомеразы и лактатдегидрогеназы²⁴⁵.

Работа²⁴⁶ сообщает о ферментингибирующей активности некоторых производных УК. Ряд производных УК с аминокислотами **47a,b** и **48** (рис. 14), также как и сама УК, умеренно ингибируют активность протеин-тирозин фосфатазы 1В (PTP1B) дозозависимым образом, величины ИК₅₀ были определены как 27.7, 23.2, 16.4 и 15.0 мкМ, соответственно, что сравнимо с ИК₅₀ известного ингибитора фосфатазы РК-682 (4.5 мкМ).

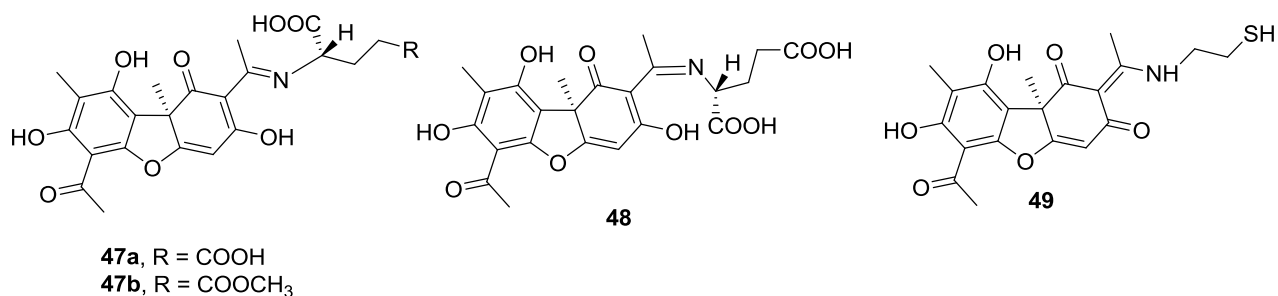


Рисунок 14. Производные усниновой кислоты, проявившие ингибирующую активность в отношении некоторых ферментов.

Ингибиторы PTP1B считаются потенциальными агентами для лечения диабета типа 2 и других метаболических синдромов. Возможный механизм процесса заживления ран производными УК **49** (рис. 14) и **42** (рис. 11) также связывают с ингибирующей активностью этих соединений в отношении ферментов гиалуронидазы и коллагеназы²⁴⁷. Степень ингибирования гиалуронидазы 25% и 40% при применении соединения **42** в дозах соответственно 50 и 100 мкг/мл. Для сравнения УК в таких же дозах ингибирует гиалуронидазу на 14 и 33%.

Итак, описано ингибирующее действие УК на ряд ферментов, проявляемое, как правило, в умеренных или же высоких дозах. Нет очевидных данных, свидетельствующих о разнице в действии энантиомеров УК. Модификация УК, приводящая к её енаминовым

производным, либо не меняет ингибирующий эффект, либо же позволяет незначительно увеличивать это действие в отношении некоторых ферментов.

2.18 Другие свойства усниновой кислоты

Заживление ран является предметом серьезного внимания при лечении многих патологий (постхирургических операций, ожогов, шрамов), что делает актуальным поиск новых химических веществ для терапии в этой области. Бурландо и соавт.¹⁸³ обнаружили, что (+)-УК в низкой, субтоксической дозе была эффективна в ускорении заживления ран. Эксперименты проводились на клеточной линии HaCaT, которая имитирует многие свойства нормальных кератиноцитов эпидермиса. При этом, сочетание (+)-усниновой и гирофоровой кислот проявило синергетическое действие, демонстрируя результаты, сравнимые по эффекту с медицинскими препаратами, используемыми для заживления ран. Эффекты УК на заживление ран коррелировали с её влиянием на миграцию клеток, в то время как не коррелировали со свойствами пролиферации и цитотоксичности. Эти данные предполагают, что заживление ран при применении УК происходит в результате стимуляции перистальтики, а не активации митоза. Позднее Бруно и соавт.²⁴⁷ описали ранозаживляющие свойства енаминопроизводных УК *in vitro* на клеточной линии кератиноцитов HaCaT. Соединения **49** (рис. 14) и **42** (рис. 11) совместили низкую цитотоксичность с высокой ранозаживляющей способностью, предлагая их возможное использование в качестве препаратов при заживлении ран или антивозрастной терапии. Тесты *in vitro* по определению прочности эпидермиса на разрыв показали, что обработка УК повышает прочность на 32%, соединением **49** на 35%, а енамином **42** на 47%. Авторы также изучали степень уменьшения раневой поверхности. В десятидневных экспериментах *in vivo* УК лучше заживает раны в сравнении с негативным контролем – на 59%, соединения **49** и **42** – на 64 и 83% соответственно.

Значительный дозозависимый противовоспалительный эффект проявила УК при испытании на крысах в дозах 100 мг/кг²⁴⁸. Авторы предполагают, что механизм действия (+)-УК, подобно другим нестероидным противовоспалительным препаратам, может включать ингибирование синтеза простагландинов. Противовоспалительный эффект УК был изучен на липополисахарид-стимулированной клеточной линии RAW264.7²⁴⁹. Действие УК на противовоспалительные цитокины определялось с использованием различных методов анализа (сэндвич ELISA, ПЦР, иммуноцитохимия и вестерн-блот анализ). Результаты показали, что противовоспалительный эффект УК проявляется посредством даунрегуляции индуцибельной NO синтазы (iNOS), циклооксигеназы-2 (COX-2),

интерлейкина 1 бета (IL-1 β), интерлейкина 6 (IL-6) и фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α). А также эффект УК выражается в экспрессии гена COX-2 через подавление активации ядерного фактора-kB (NF-kB) и повышение производства противовоспалительных цитокинов IL-10 и медиатора гемоксигеназы-1 (HO-1). Молекулярные механизмы, которые отвечают за противовоспалительный эффект УК, в LPS-активированных макрофагах RAW264.7 изучали авторы работы²³¹. Полученные данные говорят о том, что УК проявляет противовоспалительное действие, подавляя фактор некроза опухоли, экспрессию мРНК и синтез iNOS. УК дозозависимо снижала уровень фактора некроза опухоли в макрофагах, значение ИК₅₀ составила 12.8 мкМ.

В тестах на мышах «уксусные корчи» и «хвост давления» УК проявила обезболивающее действие и жаропонижающий эффект на модели ЛПС-индуцированной гипертермии у мышей²⁵⁰.

УК уменьшает степень сокращения гладких мышц аорты крысы и продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки, индуцированное KCl и фенилэфрином, на 63-67% для аорты крыс и 81-85% для морских свинок²⁵¹. Авторы предполагают, что механизм действия УК связан с ингибированием притока ионов кальция (Ca²⁺) в клетку.

Фибринолитическую активность определяли в работе¹⁸⁹ по размеру зоны гидролиза фибриногена в присутствии УК. При использовании концентрации УК 100 мкг/мл зона гидролиза составила от 0.8 до 1.4 см². Сравнение с положительным стандартом (в концентрации 12.5 мкг/мл - зона гидролиза 1.6 см²) показывает, что УК имеет очень плохой фибринолитический потенциал.

2.19 Заключение

Несомненно, усниновая кислота – молекула с неординарными и разноплановыми биологическими свойствами, включающими антибактериальную, противовирусную, противоопухолевую, фунгицидную, антиоксидантную, инсектицидную и другие виды активности. Два наиболее распространённых пути её влияния на живые системы – токсическое действие (антибактериальное и цитотоксическое) и антиоксидантное. За реализацию этих взаимодействий, скорее всего, отвечают разные структурные фрагменты УК. Антиокислительным действием УК обязана фенольному фрагменту структуры, ответственному за гашение свободных радикалов. Токсичность УК проявляется в экспериментах на клеточном уровне и заметно менее выражена в тестах *in vivo*, для интоксикации организма необходимо хроническое потребление УК в высоких дозах, при этом преимущественно поражаются энергопотребляющие органы. Механизм как

цитотоксического, так и антибактериального действия схож и заключается в разобщении цепи окислительного фосфорилирования путём нарушения мембранного потенциала как у эукариотов в митохондриях, так и в грамположительных бактериях, где нет митохондрий, но есть мезосомы сходных функций. Потерю митохондриального потенциала обеспечивает трикетонный фрагмент, благодаря кислым свойствам которого УК может диффундировать через митохондриальные мембраны и вызвать утечку протонов. Липофильность УК и её аниона позволяет им проходить через митохондриальную мембрану путем пассивной диффузии. Как цитотоксический, так и антибактериальный механизмы действия УК не зависят от строения асимметрического центра, а, следовательно, в тех процессах, где они являются основными, различие в действии энантимеров УК незначительное. Значительный эффект должен наблюдаться в случаях, если происходит специфическое связывание УК с субстратом, например белками, ферментами. Что и отмечается в работах о противовирусном и сенсibiliзирующем действии УК, а также угадывается в публикациях, в которых наблюдалось УК-ферментное взаимодействие. Отметим, что не все наблюдаемые клеточные эффекты могут быть объяснены действием УК в качестве разобщителя мембран, при этом данные о её действии на уровне молекулярных взаимодействий практически отсутствуют. Исследования, направленные на выяснение механизмов действия УК и её производных в вирусных микроорганизмах и взаимодействия их с клеточными рецепторами, пока либо не дают однозначных ответов, либо исключают некоторые общеизвестные механизмы. С другой стороны, массовое возникновение множественной лекарственной устойчивости к традиционным лекарствам диктует необходимость разработки новых кандидатов в лекарства среди соединений, показавших новый механизм действия, и среди них далеко не на последнем месте полусинтетические производные на базе природных веществ.

Изучение биологической активности родственных УК соединений и её полусинтетических производных играет свою роль в понимании некоторых механизмов действия УК и позволяет получить соединения с более высокой цитотоксической, противораковой и антибактериальной активностями. Многие работы, посвящённые биологической активности УК, содержат рекомендации поиска её новых синтетических производных, сохраняющих или улучшающих биологическое действие, но ослабляющих нежелательные эффекты (прежде всего, токсичность). Кроме того, УК и её производные, обладая широким спектром разноплановой активности, могут рассматриваться как препараты комплексного механизма действия, направленные как на собственно патогенетический процесс, так и на сопутствующие аспекты проявления патогенеза. В заключение следует отметить, что, несомненно, рассмотренные в обзоре результаты

позволяют рассматривать УК как потенциального предшественника для новых перспективных химиотерапевтических агентов.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку все этапы получения новых соединений проводились собственными силами, включая сбор, доставку сырья, содержащего УК, и извлечение из него УК, то на первом этапе исследований были изучены возможности более полного извлечения обоих энантиомеров УК из заготовленного сырья. Эта часть работы освещена в разделе 3.2.

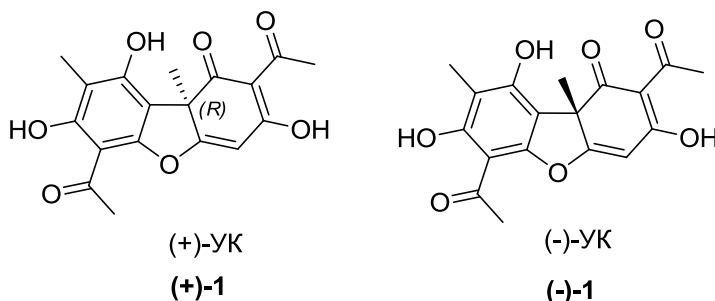
Синтез новых соединений на основе УК, планировался и разрабатывался на основании совокупности данных по известным химическим модификациям УК. Обзор, написанный с участием автора⁴, опубликованный в журнале «Успехи химии», позволяет заметить, что спектр известных химических трансформаций УК достаточно узок. Для синтеза новых соединений при этом используются в основном два направления – реакция карбонильных групп УК с аминами и получение эфиров по ее гидроксильным группам. Немногочисленные реакции других направлений в большинстве своем не являются ценными в препаративном плане. В связи с тем, что производные УК, синтезированные с использованием традиционных методов, уже доказали перспективность получения соединений с высокой биологической активностью, часть работы посвящена расширению этого подхода для синтеза новых соединений на основе УК, а также модификации литературных и разработке новых методик получения подобных производных (главы 3.3 и 3.4).

С другой стороны, на основании анализа работ последних лет по механизму биологического действия УК и её производных становится очевидно, что возникает необходимость синтеза новых соединений на основе УК либо с более глубоким изменением природного остова, либо с направленным введением фармакофорных фрагментов в иные части молекулы УК. Поэтому в следующей части работы (главы 3.5 – 3.11) нами предложены новые перспективные подходы к функционализации УК с вовлечением в трансформацию её остова, галогенированием УК и с созданием новых гетероциклических производных.

Все описанные в работе химические превращения проведены, как правило, как для (+)-энантиомера УК, так и для (-)-энантиомера. В общей части приведены схемы реакций на примере (+)-энантиомера УК, но, поскольку описанные модификации не затрагивают хиральный центр, то схемы применимы и для реакций (-)-энантиомера. В экспериментальной части, наряду со спектральными данными соединений, полученных из (+)-УК, приведены физико-химические характеристики веществ, синтезированных на основе (-)-энантиомера УК.

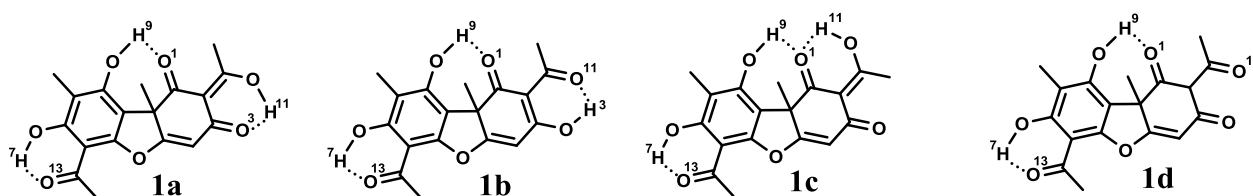
3.1 Особенности строения и спектральные свойства усниновой кислоты

УК – кристаллическое соединение желтого цвета, по своему строению относится к производным дибензофурана и существует в виде двух энантиомеров, различающихся конфигурацией метильной группы у атома C^{9b}.



Абсолютная конфигурация энантиомеров усниновой кислоты.

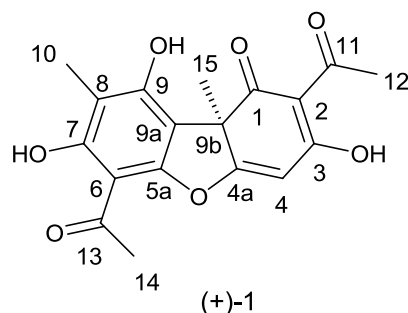
Гидроксильные и карбонильные группы УК участвуют в образовании сильных внутримолекулярных водородных связей. Авторами работы²⁵² были произведены расчеты стабильности возможных таутомеров УК методом AM1. Расчеты по методу AM1 показали, что наиболее вероятно равновесие между тремя стабильными таутомерами УК **1a-c**, из которых **1b** самый стабильный. Расчетная энергия водородных связей в **1a** составила: 32.66 кДж/моль (H¹¹-O³), 19.07 кДж/моль (H⁷-O¹³), 14.10 кДж/моль (H⁹-O¹). Сравнение между расчетными и экспериментальными кривыми поглощения в УФ-спектре шло в пользу **1b** как преобладающего таутомера, с небольшим вкладом **1a** и **1c**.



Молекулярные формулы возможных таутомеров усниновой кислоты.

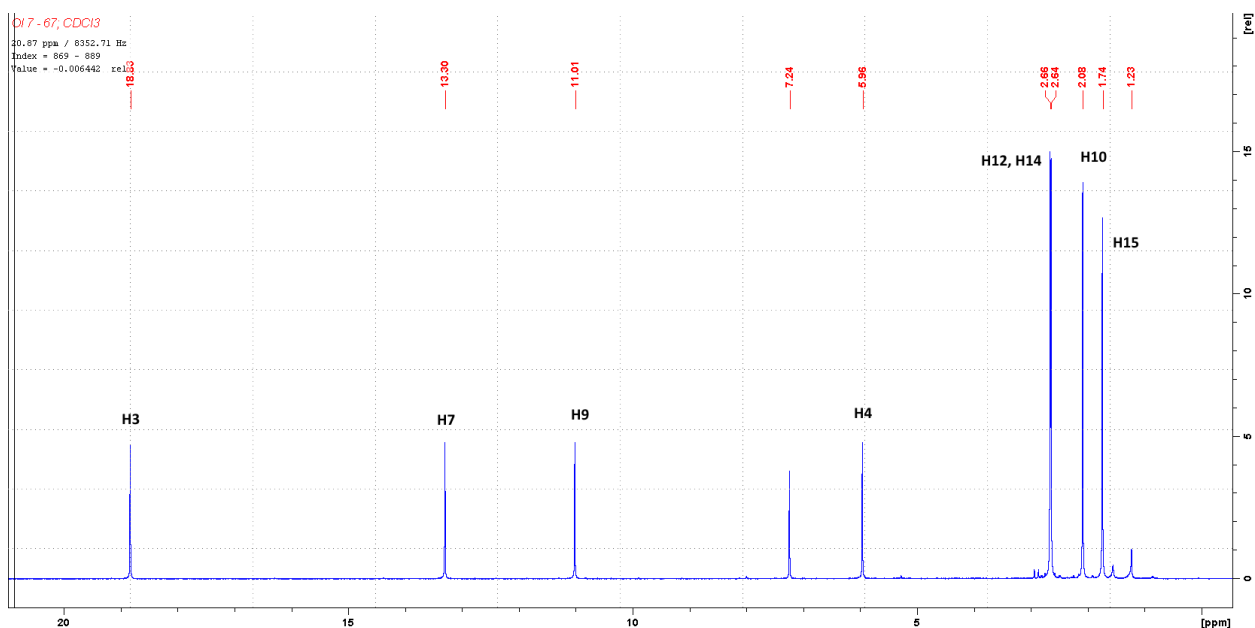
В более поздней работе²⁵³ молекулярная структура УК исследовалась с помощью теории функционала плотности (DFT). Два таутомера – **1a** и **1b** оказались почти изоэнергетическими и наиболее устойчивыми из других предполагаемых таутомеров, авторами была также предложена таутомерная форма **1d**, как одна из возможных. Таутомер **1b** и в этом методе расчета оказался наиболее стабильным (на 0.20 кДж/моль, чем **1a**). Взаимный переход **1a**↔**1b** согласно расчетам имеет барьер 0.78 кДж/моль и осуществляется при комнатной температуре. Авторами этой работы была также рассчитана энергия внутримолекулярных водородных связей. Расчетные значения энергий O^{••}H-O, полученные

по DFT имели небольшие отличия от рассчитанных по методу AM1. Для **1b** получены следующие значения: 36.6 кДж/моль (H^3-O^{11}), 20.1 кДж/моль (H^7-O^{13}), 13,1 кДж/моль (H^9-O^1). Энергия водородных связей в **1a** составила: 37.7 кДж/моль ($H^{11}-O^3$), 20.3 кДж/моль (H^7-O^{13}), 12.7 кДж/моль (H^9-O^1).



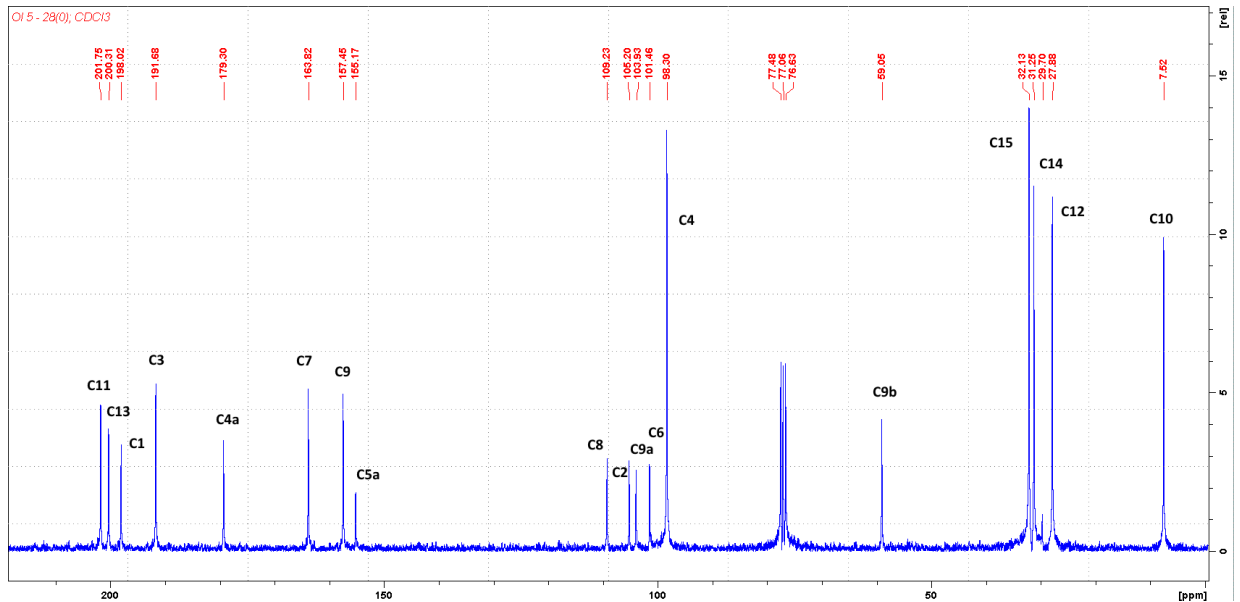
Нумерация атомов в молекуле усниновой кислоты

В ЯМР 1H спектре раствора усниновой кислоты в дейтерохлороформе присутствуют три узких сигнала протонов гидроксильных групп, химические сдвиги которых резко отличаются между собой и практически совпадают с рассчитанными авторами работы²⁵³ для таутомеров **1a** и **1b** и составляют 18.84 (3-OH), 13.31 (7-OH) и 11.02 (9-OH).



Спектр ЯМР 1H усниновой кислоты (собственные данные).

Спектр ЯМР ^{13}C содержит один набор из всех 18 сигналов атомов углерода УК. Форма сигналов и значения химических сдвигов атомов углерода и водорода в спектрах ЯМР указывают на быстрый (в шкале времени метода) химический обмен между таутомерами **1a** и **1b**, полностью исключая из рассмотрения высокоэнергетические таутомеры **1d** и **1c**.



Спектр ЯМР ^{13}C усниновой кислоты (собственные данные).

Отличительной особенностью усниновой кислоты является разница в химических сдвигах не только протонов гидроксильных групп но и углеродов карбонильных групп (198.1 - C^1 , 191.8 - C^3 (кето или енольная группа), 201.8 - C^{11} и 200.4 - C^{13}), которая коррелирует с их дифференциальной реакционной способностью во многих химических превращениях.

С другой стороны, константы диссоциации гидроксильных групп УК, определенные спектрофотометрически²⁵⁴, не коррелируют с силой водородных связей в этих группах. Так, их кислотность падает в следующем порядке: $\text{pK}_{\text{a}1}$ 4.4 (3-ОН), $\text{pK}_{\text{a}2}$ 8.8 (7-ОН), $\text{pK}_{\text{a}3}$ 10.7 (9-ОН). Наиболее кислый характер имеет енольная гидроксильная группа 3-ОН, поскольку соответствующая анионная форма значительно стабилизирована делокализацией заряда в кольце С УК.

3.2 Оптимизация процесса выделения усниновой кислоты

Исходное сырье для получения (+)-УК – смеси лишайников рода *Usnea* - заготавливалось на Алтае, собиралось на ветках пихты, ели, на участках леса, имеющих потенциальную ценность для лесозаготовок. Сырьё для получения (-)-УК – лишайник *Cladonia Stellaris* - собиралось на участках высокогорной тундры Алтая.

Методика извлечения УК из лишайников, разработанная и запатентованная коллективом авторов²⁵⁵, позволяет выделять (+)-УК из смеси лишайников рода *Usnea* и (-)-УК из лишайника *Cladonia stellaris*²⁵⁶ с выходами от массы воздушно-сухого сырья 1.72 и 1.03% соответственно.

Данную методику мы подвергли оптимизации, которая заключалась в различных вариантах измельчения растительного сырья, производимого для улучшения процесса экстракции и увеличения выхода УК. Измельчение сырья способствовало повышению выхода (-)-УК из лишайников вида *Cladonia stellaris* с 1.03% (описанного в патенте²⁵⁵) до 1.78%, а (+)-УК из смеси лишайников рода *Usnea* с 1.72 до 3.57%.

Кроме того, было проведено масштабирование процесса до опытно-промышленных масштабов в опытном химическом производстве Новосибирского института органической химии СО РАН (ОХП НИОХ СО РАН). Показано, что в условиях ОХП можно выделять УК при загрузках сырья до 10 кг включительно.

Таким образом, в условиях ОХП НИОХ СО РАН была модифицирована методика выделения УК.

3.3 Реакции усниновой кислоты с соединениями, содержащими аминогруппу

3.3.1 Реакция усниновой кислоты с первичными аминами

Хорошо известно, что введение в структуру органических веществ аминных фрагментов различного строения часто приводит к возникновению или усилению биологических свойств соединений. Синтез аминопроизводных на основе УК описан ранее и широко используется исследователями в качестве наиболее доступного метода функционализации этой молекулы с целью повысить её биологическую активность.

Одними из первых исследователей, описавших продукты конденсации УК с первичными аминами, были Манактала и соавт.²⁵⁷. Авторы сообщили, что первоначально в реакцию вступает кетогруппа ($C^{11}=O$), в результате чего образуется имин **50**, вторая молекула амина реагирует по положению C^3 , по кетогруппе одного из возможных таутомеров соединения **50**, и также с образованием имиона (соединение **51**) (схема 1).

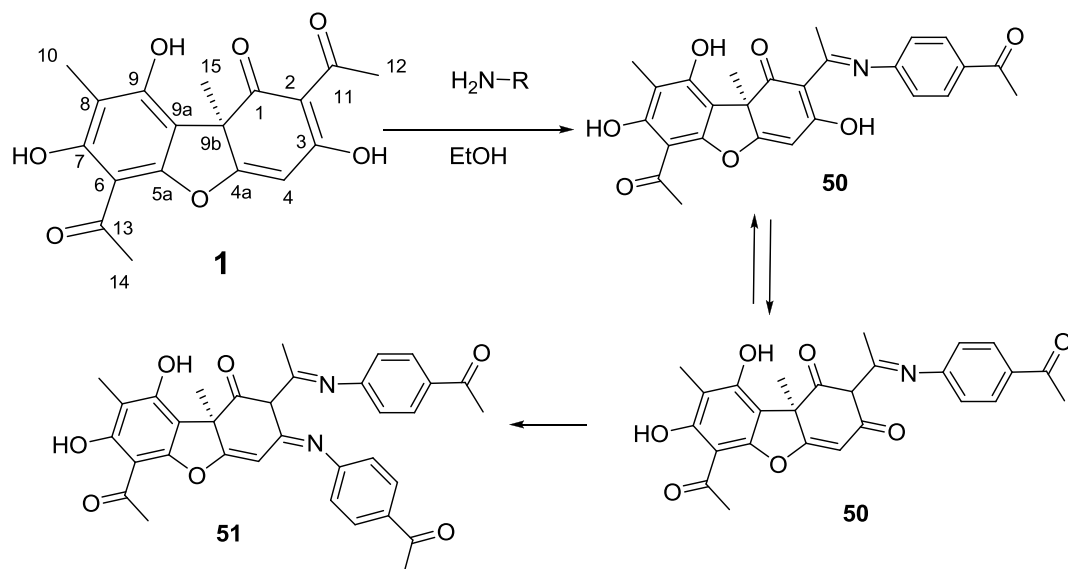


Схема 1. Взаимодействие усниновой кислоты с *para*-аминоацетофеноном (литературные данные).

Позднее, в работе⁵ было показано, что при взаимодействии УК с первичными аминами, в качестве продуктов реакции образуются не соответствующие имины, а енамины **52a-d** (схема 2). Данное предположение было сделано авторами на основании анализа комплекса спектральных данных и подтверждено данными рентгеноструктурного анализа одного из продуктов реакции. В случае алифатических аминов возможно присоединение второй молекулы амина по карбонильной группе ацетофенонового фрагмента УК ($C^{13}=O$) в более жёстких условиях (температура, длительность реакции) с образованием классического основания Шиффа (соединения **53b,c**). Амины, использованные в этих публикациях^{5,257},

относятся к тривиальным представителям алифатического ряда – метиламин и этиламин, ароматические амины были представлены орто-фенилендиамином (схема 2) и пара-аминоацетофеноном (схема 1).

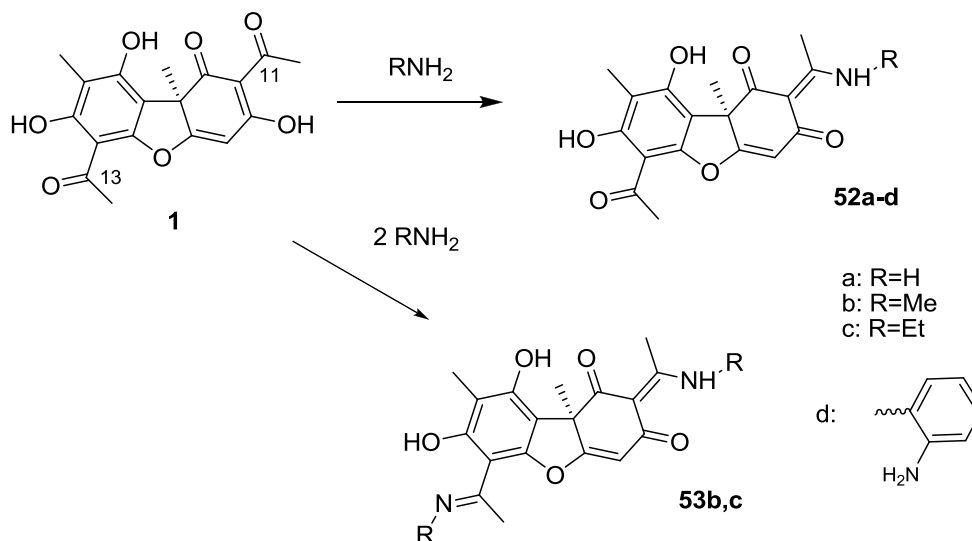


Схема 2. Взаимодействие усниновой кислоты с первичными аминами (литературные данные).

Исследователи, использовавшие данную модификацию позднее для синтеза биологически активных соединений^{9, 99, 195}, также приписывают продуктам структуру енамина и отмечают высокую биологическую активность полученных соединений, определяемую, в том числе, и структурой введённого заместителя. Среди синтезированных производных – соединения, обладающие значительной биологической активностью. Так, в работе⁹ показано, что полусинтетические аминопроизводные УК обладают высокой противораковой активностью. Природные аминопроизводные УК, выделенные из антарктического лишайника *Stereocaulon*, являются, по данным работы²⁴⁶, перспективными фармакологическими агентами для лечения диабета второго типа и других метаболических синдромов.

Таким образом, енаминовые производные УК зарекомендовали себя как перспективные биоактивные соединения, синтез которых актуален. Исходя из этих предпосылок, нами были синтезированы новые производные обоих энантиомеров УК взаимодействием их с серией аминов. Выбор аминов обуславливался следующими факторами: фармакофорность вводимого заместителя и подбор ряда структурно подобных аминов, варьирование расположения, количества и типа заместителей, длины линкера в которых позволяет проследить зависимость «структура-активность».

4-(3-Аминопропил)-2,6-ди-трет-бутилфенол и 4-(3-аминоэтил)-2,6-ди-трет-бутилфенол содержат пространственно затруднённую фенольную группу, являющуюся одной из лучших антиоксидантных групп²⁵⁸. 4-Аминоантипирин обладает фрагментом, с которым соотносят

болеутоляющее, жаропонижающее и противовоспалительное действие²⁵⁹. 2,2,3,3-Тетрафторпропан-1-амин относится к фторорганическим соединениям, а модификация молекулы фторсодержащими фрагментами зачастую приводит к повышению биологической активности или увеличению продолжительности действия биоактивного агента. В диаминах **54a-d** (рис. 15) присутствуют фрагменты, усиливающие антибактериальную активность в отношении *S. aureus* и *Listeria monocytogenes*²⁶⁰, варьируются длина линкера между атомами азота, заместители при атоме азота и их объём. Кроме того, они имеют предрасположенные к кватернизации третичные атомы азота.

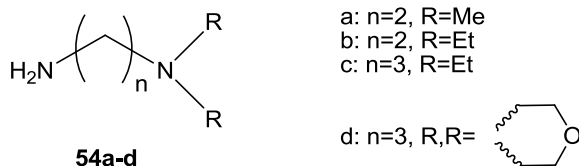


Рисунок 15. Диамины, вводимые в реакцию с усниновой кислотой

Взаимодействием УК с аминами, взятыми в эквимольных количествах, кипячением в этиловом спирте в течение 2 часов, что соответствует условиям реакции, описанным в работе⁵, нами синтезированы соединения **55-63** с выходами 72-98% (схема 3). Соединения **55-63**, по аналогии с авторами работ^{5, 9, 99, 195}, мы изображаем в форме енаминов.

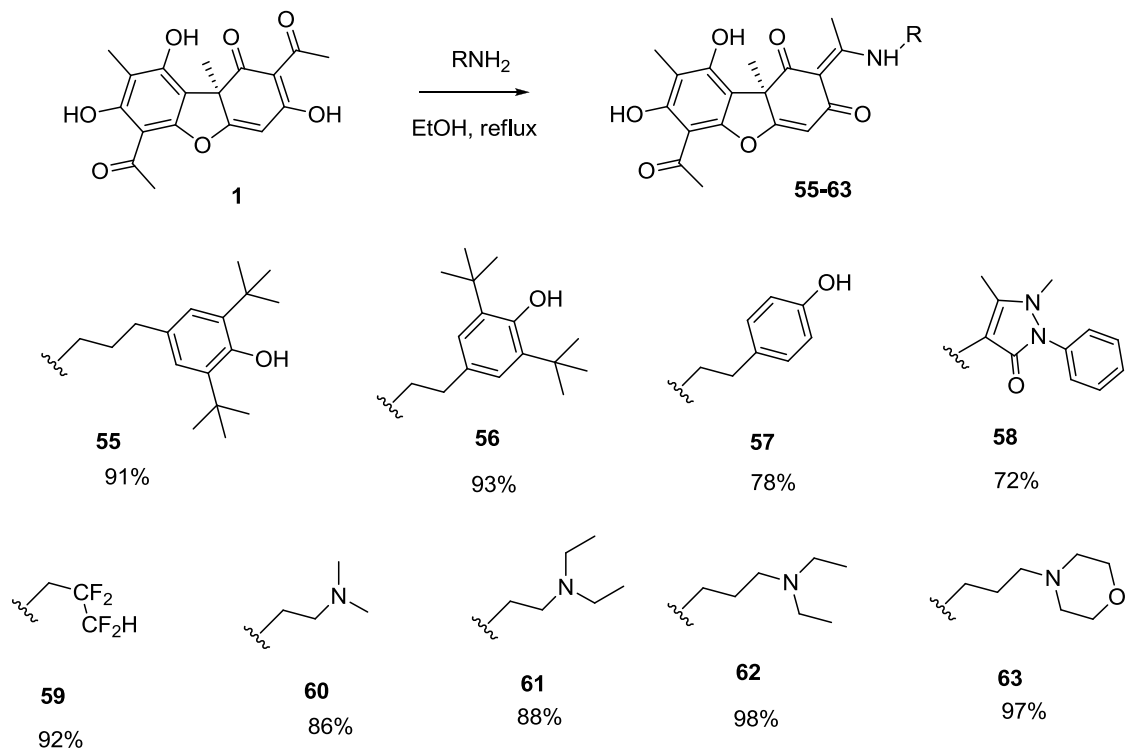


Схема 3. Синтез енаминовых производных усниновой кислоты.

Косвенно енаминовое строение продуктов реакции подтверждается из данных спектров ЯМР ¹H соединений **55, 56, 60-63**, в которых наблюдается прямое взаимодействие протонов соседней с азотом метиленовой группы с протоном при атоме азота. Из данных спектров ЯМР также видно, что образуется лишь один изомер енамина, отнесение конфигурации

двойной связи в соединениях **55-63** проведено по аналогии с соединением **52a**, для которого в работе Кутней и соавт.⁵ приведены данные рентгеноструктурного анализа.

Второй атом азота в енаминовых производных **60-63** предрасположен к кватернизации. Известно, что кватернизованный атом азота, содержащийся как в нативных алкалоидах, так и полученный путём синтетических трансформаций органических соединений, придаёт молекуле ряд важных и интересных биологических активностей. С целью получения новых биологически активных соединений и изучения взаимосвязи «структура-активность» был синтезирован набор структурноподобных кватернизованных соединений **64-68**. Взаимодействие соответствующих аминов **60-63** (схема 3) с алкилгалогенидами (CH_3I или EtBr) протекает в хлористом метиле при комнатной температуре, соединения **64-68** выделены с выходами 42-88% после перекристаллизации (рис. 16).

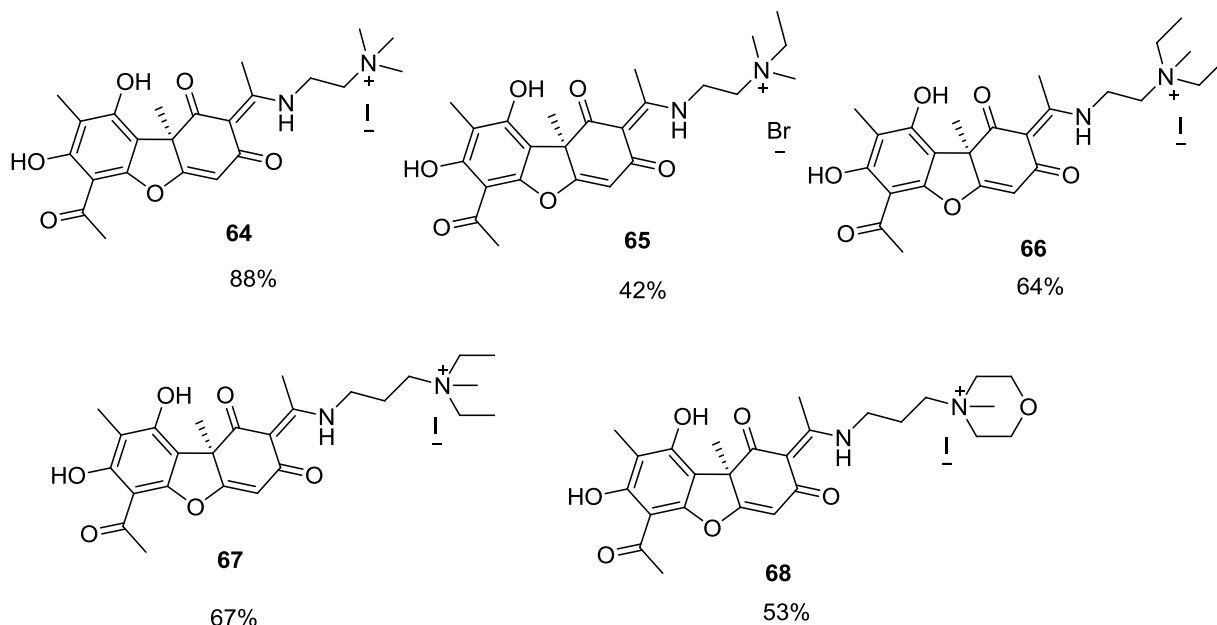


Рисунок 16. Производные усниновой кислоты, содержащие кватернизованный атом азота.

Нами были синтезированы новые производные УК **69-74** взаимодействием УК замещёнными анилинами с варьированием заместителей в ароматическом кольце, в том числе единичных атомов галогена, гидроксигрупп и метоксигрупп. Известно, что введение в молекулу субстрата единичных атомов галогена может существенно увеличивать биологическую активность²⁶¹. Как будет показано в главе 4.2, среди производных УК, полученных реакцией с анилинами, значительный интерес представили енамины с галоидзамещённым бензольным кольцом, обнаружившие ингибирующую активность в отношении репарационных ферментов. По этой причине синтезирован ряд соответствующих производных **70-74** с варьированием не только природы галогена, но и его расположения в ароматическом кольце (схема 4).

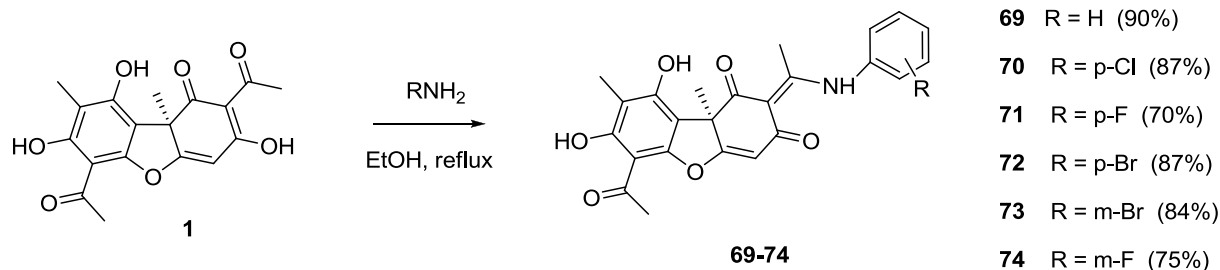


Схема 4. Реакция усниновой кислоты с замещёнными анилинами.

Также как и авторы работы⁵, мы обнаружили, что взаимодействие второй карбонильной группы ($C^{13}=O$) с амином имеет место только в реакции с алифатическими аминами и протекает после завершения реакции карбонильной группы ($C^{11}=O$).

Продукты взаимодействия УК с двумя эквивалентами (4-(3-аминопропил)-2,6-ди-трет-бутилфенола и 4-(3-аминоэтил)-2,6-ди-трет-бутилфенола были синтезированы нами с выходами 22% и 20% соответственно. Образование соединений **75** и **76** (схема 5), в согласии с данными работы⁵ протекает с формированием имина при присоединении второй молекулы амина по карбонильной группе ($C^{13}=O$).

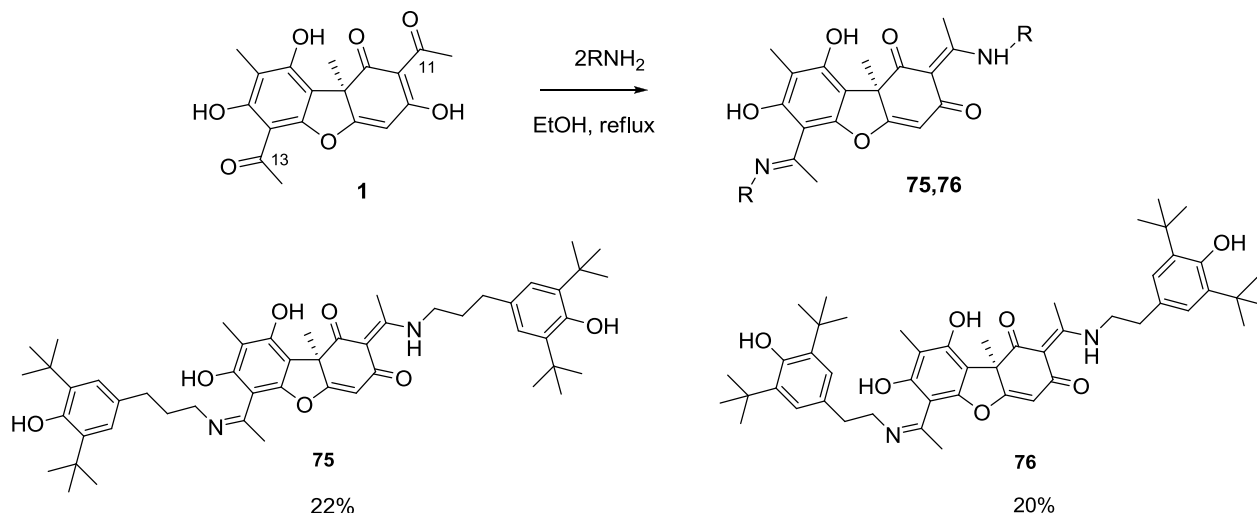


Схема 5. Реакция усниновой кислоты с двумя молями аминов

3.3.2 Реакция усниновой кислоты с аминокислотами

Среди аминосоединений, конденсация которых с УК может представлять особый интерес, стоит обратить внимание на аминокислоты. Помимо того, что модификация молекулы субстрата аминокислотным фрагментом может существенно увеличивать биологическую активность, введение в молекулу исходного соединения в реакции с аминокислотами новой функциональной группы, карбоксильной, расширит возможности для дальнейших синтетических трансформаций, а также, возможно, увеличит растворимость в

водных средах, что немаловажно для биопрепаратов. Реакции взаимодействия УК с аминокислотами до наших исследований не проводились. Нами установлено, что в отличие от взаимодействия с первичными аминами, когда реакция протекает при совместном кипячении реагентов в этиловом спирте, аминокислоты в таких условиях не вступают в реакцию. Нами разработана методика, позволяющая провести целевое взаимодействие, основанная на применении катализа основаниями. На примере реакции с глицином, L-фенилаланином, β -аланином, L-лейцином, L-валином и установлено, что образование соединений **28**, **77-80** протекает при кипячении в водно-спиртовом растворе в присутствии щёлочи с выходами 55-88% (схема 6). Продукты взаимодействия УК с L-метионином и L-серином, соединения **81** и **82**, были получены с невысокими выходами (17 и 29% соответственно), по этой причине методика была изменена путём замены основания KOH на триэтиламин. С использованием катализа триэтиламином нами были получены соединения **81** и **83** с выходами 79 и 86%.

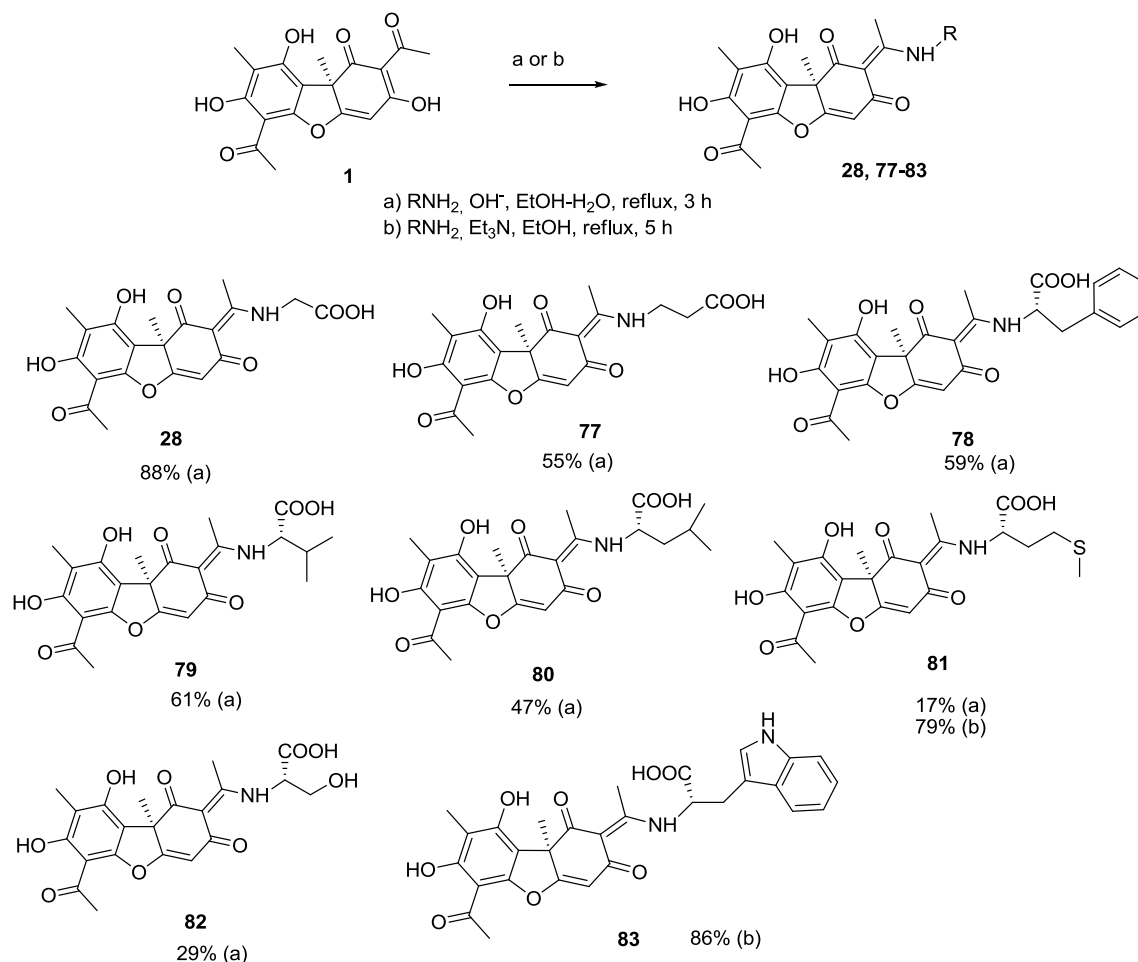


Схема 6. Реакция усниновой кислоты с аминокислотами.

Соединение **77**, продукт конъюгации УК с β -аланином, обнаружило существенные противовирусные свойства в отношении вируса гриппа в сочетании с низкой токсичностью (глава 4.4). Для выявления влияния особенностей структуры заместителя нами были

синтезированы сходные по структуре с β -аланиновым производным **77** соединения **84-89** (рис. 17) по реакции УК с эфирами и амидами β -аланина и этанол- и пропаноламинами для скрининга на активность в отношении вируса гриппа. Эфиры β -аланина были синтезированы из β -аланина реакцией с тионилхлоридом в растворе соответствующего спирта, амиды получены из метилового эфира β -аланина взаимодействием либо с водным аммиаком, либо с водным раствором метиламина.

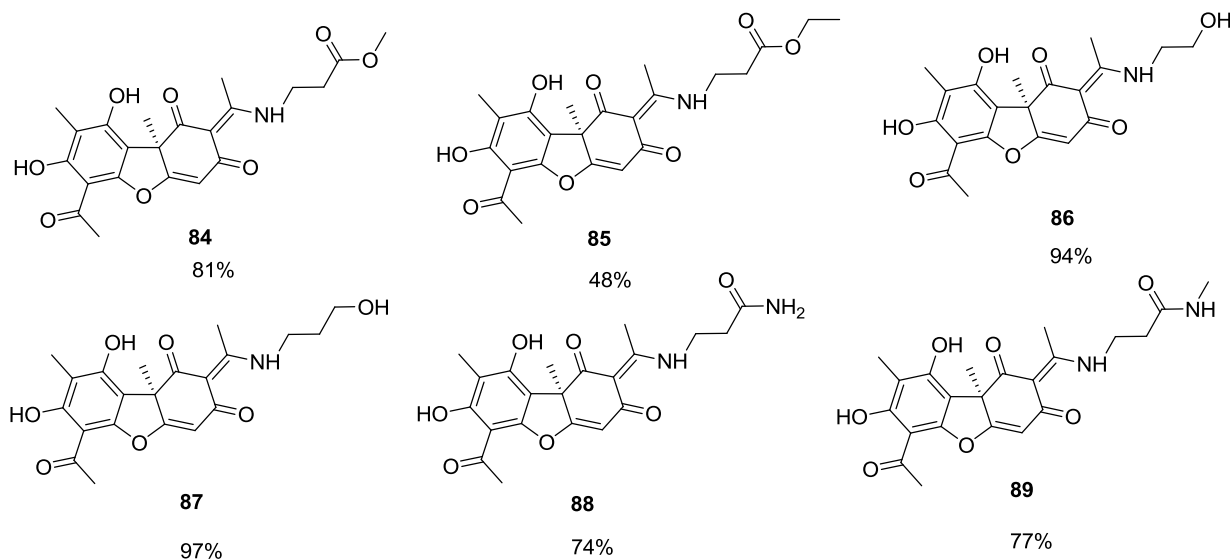


Рисунок 17. Производные усниновой кислоты, структурноподобные соединению **77**.

3.2.3 Реакция усниновой кислоты с гидразинами

Ещё одна известная реакция модификации УК азотсодержащими нуклеофилами, носящая препаративный характер, это синтез пиразольных производных **90** и **35** взаимодействием (+)-УК соответственно с метил-¹⁹⁵ и фенил-²⁵⁷ гидразинами (схема 7). Также как и взаимодействие с первичными аминами, реакция первоначально идёт по карбонильной группе ($C^{11}=O$), после чего протекает внутримолекулярная гетероциклизация и образование пиразольного кольца. Присоединение второй молекулы гидразина по карбонильной группе ($C^{13}=O$) происходит без гетероциклизации с образованием гидразона **91** или **92**. Известно, что продукт взаимодействия УК с фенилгидразином **35** проявил противотуберкулёзную активность, сравнимую с таковой УК²⁵⁷.

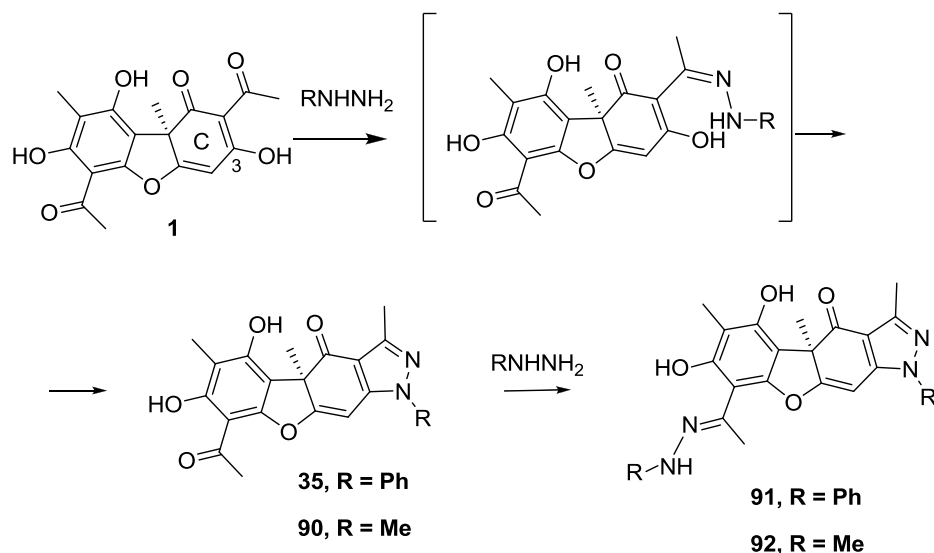


Схема 7. Реакция усниновой кислоты с гидразинами (литературные данные).

Из анализа биологической активности УК и её производных (литературный обзор) можно предположить, что исчезновение енольного гидроксила ($\text{C}^3\text{-OH}$) и нарушение трикетонной системы кольца С УК, ответственной за проникновение в клетку и нарушение мембранного потенциала³, с одной стороны может уменьшать антибактериальную активность пиразольных производных в сравнении с активностью УК. С другой стороны, за счёт тех же структурных перестроек должна существенно снижаться токсичность соединений, что перспективно для эволюции других биологических свойств. Потому синтез новых соединений этого ряда и изучение их биологических свойств представляет интерес и является актуальным.

Нами показано, что в согласии с литературными данными²⁵⁷ при взаимодействии УК с одним эквивалентом галоген, метил- или алкокси-замещённых фенилгидразинов происходит образование пиразольных производных **93-101** (схема 8).

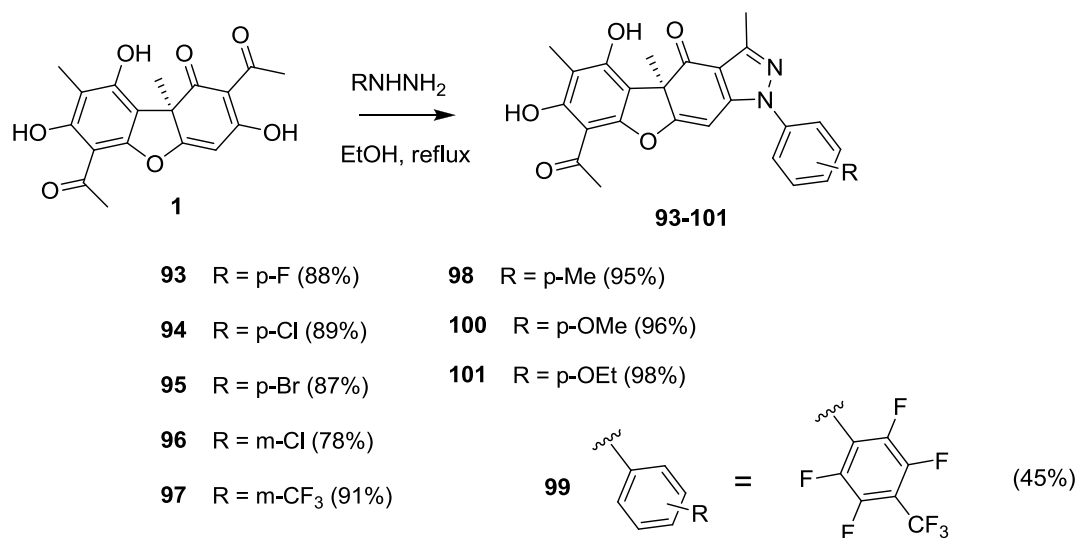


Схема 8. Реакция усниновой кислоты с замещёнными фенилгидразинами.

При введении в реакцию двух и более эквивалентов вторая молекула фенилгидразина реагирует с образованием гидразонов **102-108** (схема 9), однако реакционная способность второй карбонильной группы значительно ниже, и в большинстве случаев даже при значительном избытке фенилгидразина не удалось полностью перевести УК в гидразоны. Соединения **102-108** получают в виде единственного изомера. Поскольку, судя по молекулярным моделям, образование *Z*-изомеров представляется маловероятным, по-видимому, они представляют собой *E*-изомеры фенилгидразонов. Метокси и этоксизамещённые гидразины в данных условиях не образуют гидразонов по карбонильной группе ($C^{13}=O$) УК.

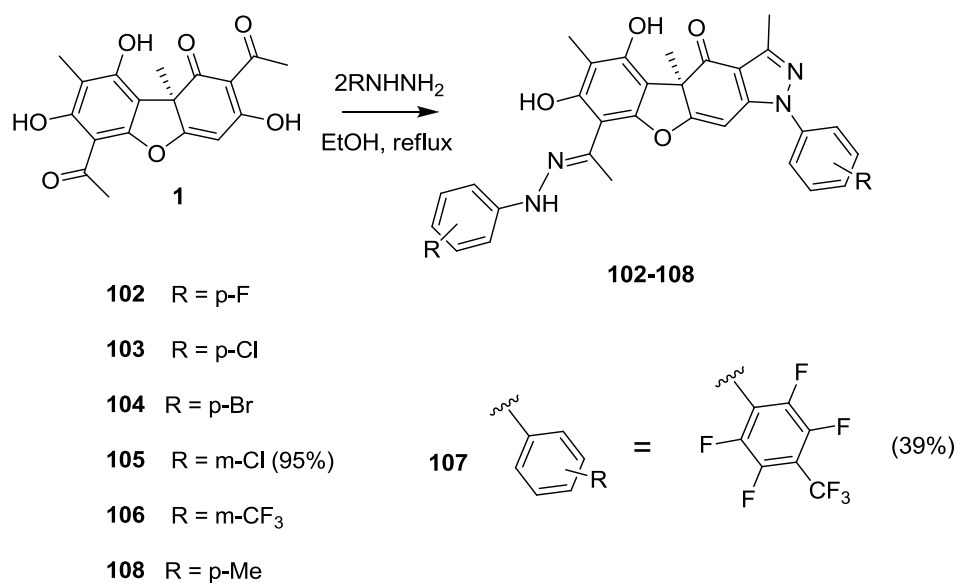


Схема 9. Реакция усниновой кислоты с 2 молями замещённых фенилгидразинов.

Кроме того, нами были проведены реакции с нитрозамещёнными фенилгидразинами. Нитрогруппы существенно расширяют возможности дальнейших синтетических трансформаций. Нами обнаружено, что реакция с 4-нитро- и 2,4-динитро-замещёнными фенилгидразинами протекает несколько иначе, чем взаимодействие с галогензамещёнными фенилгидразинами. Не только не наблюдается взаимодействия со второй карбонильной группой, но и по группе ($C^{11}=O$) реакция протекает без замыкания пиразольного кольца с образованием соединений **109** и **110** (схема 10). Отсутствие циклизации, по-видимому, объясняется пониженной нуклеофильностью атома азота, обусловленной электроноакцепторным действием нитрогрупп в *пара*- и *орто*- положениях бензольного кольца.

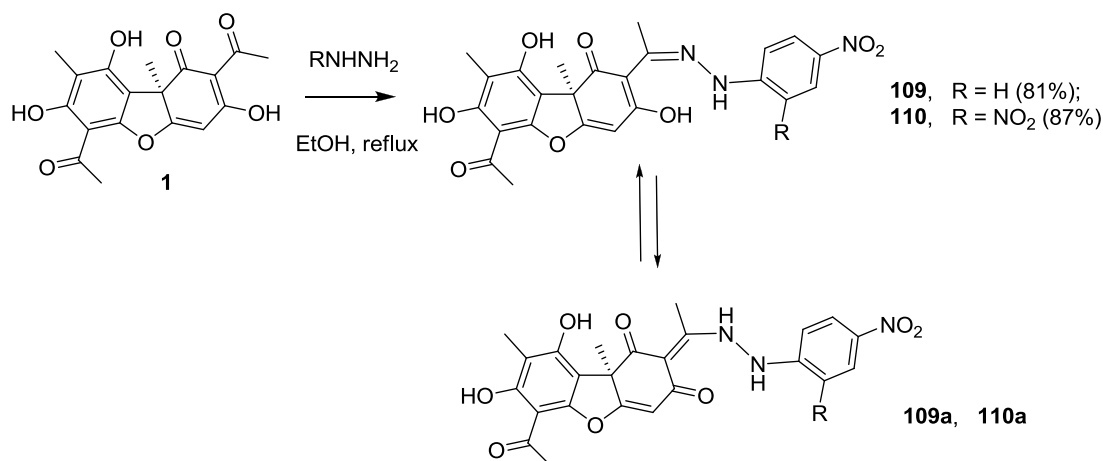


Схема 10. Реакция усниновой кислоты с 4-нитро- и 2,4-динитрофенилгидразинами.

На основании полученных спектральных данных нельзя определить происходит ли характерная для реакций УК с аминами перегруппировка в енамины. Возможно, соединения **109**, **110** существуют в виде гидразонов, что косвенно подтверждается отсутствием прямого взаимодействия между протонами при соседних атомах азота (**109a**, **110a**) в спектрах ЯМР ¹H.

Аналогично реакции с нитрозамещёнными гидразинами (без замыкания пиразольного кольца) протекает реакция УК с изониазидом, гидразидом изоникотиновой кислоты. Изониазид является одним из противотуберкулёзных препаратов первого поколения, широко применяется в медицине, однако, в связи с формированием устойчивых к нему штаммов туберкулёза, поиск новых антимикобактериальных агентов на его основе остаётся актуальным. Реакция УК с изониазидом протекает в обычных условиях (кипячение в спирте), продукт **111** образуется с выходом 74% после перекристаллизации (рис. 18).

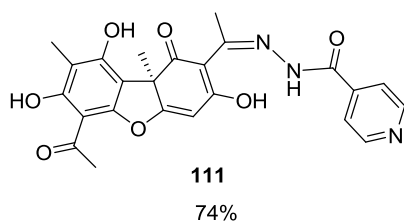


Рисунок 18. Производное усниновой кислоты, полученное по реакции с изониазидом.

Таким образом, с использованием реакции взаимодействия карбонильных групп УК с соединениями, содержащими первичную аминогруппу, синтезировано около 60 новых соединений, относящихся к структурным классам енаминов, гидразонов и пиразолов. Для выявления взаимосвязи «структура-активность» синтезированы ряды структурноподобных соединений. Предложена методика, позволяющая получать конъюгаты УК с аминокислотами.

Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы нами в следующих публикациях: ²⁶², ²⁶³, ²⁶⁴, ²⁶⁵, ²⁶⁶.

3.4 Синтез эфиров усниновой кислоты

В литературе, посвящённой биологической активности УК, предполагается, что фенольная часть УК ответственна за её окислительно-восстановительные свойства^{99,189}. Модификация этого фрагмента, таким образом, также будет влиять на биологические свойства соединений, в том числе их качества как анти- или про-оксидантов. Кроме того получение эфиров УК по фенольным группам зачастую необходимо в качестве обеспечения устойчивости остова. Как известно, резорциновая система цикла **A** как в УК **1**, так и в ее производных, очень лабильна в основных условиях⁴, что осложняет проведение химических модификаций, поэтому защита фенольных гидроксильных групп УК для проведения реакций в основных условиях особенно актуальна.

3.4.1 Синтез сложных эфиров усниновой кислоты

В литературе разработаны методы получения сложных эфиров по гидроксильным группам УК. Реакция этерификации протекает либо по обеим гидроксильным группам ароматического цикла (в реакции с уксусным ангидридом образуется диацетат **4**²⁶⁷, либо в реакции с ароматическими хлорангидридами первоначально наблюдается образование эфиров енолов в цикле **C** (соединение **9**), и лишь затем образуются эфиры в цикле **A** с получением в итоге тетразамещенных производных **112**²⁶⁸ (рисунок 19).

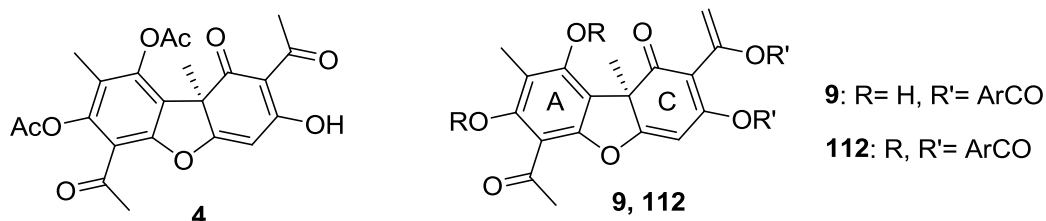


Рисунок 19. Сложные эфиры усниновой кислоты (литературные данные).

Нами синтезированы новые сложные эфиры УК **113-115** с использованием условий реакции, аналогичных описанным в работе²⁶⁷, по реакции с хлорангидридами: орто-бромбензойной кислоты (представитель ароматического ряда), изомаляной и метакриловой кислот (алифатические хлорангидриды). При проведении взаимодействия соответствующих хлорангидридов кислот с (+)-УК в присутствии пиридина при комнатной температуре в течение 3-4 часов нами было показано, что реакция протекает с образованием диэфиров исключительно по фенольным гидроксилам, причём соединения **113-115** образуются с невысокими выходами (до 20%). При подборе более эффективных условий реакции нами обнаружено, что небольшая модификация литературной методики заменой пиридина на

триэтиламин и добавлением диметиламинопиридина (DMAP) в качестве катализатора позволяет получать целевые диэфиры **113-115** с выходами 63-69% (схема 11).

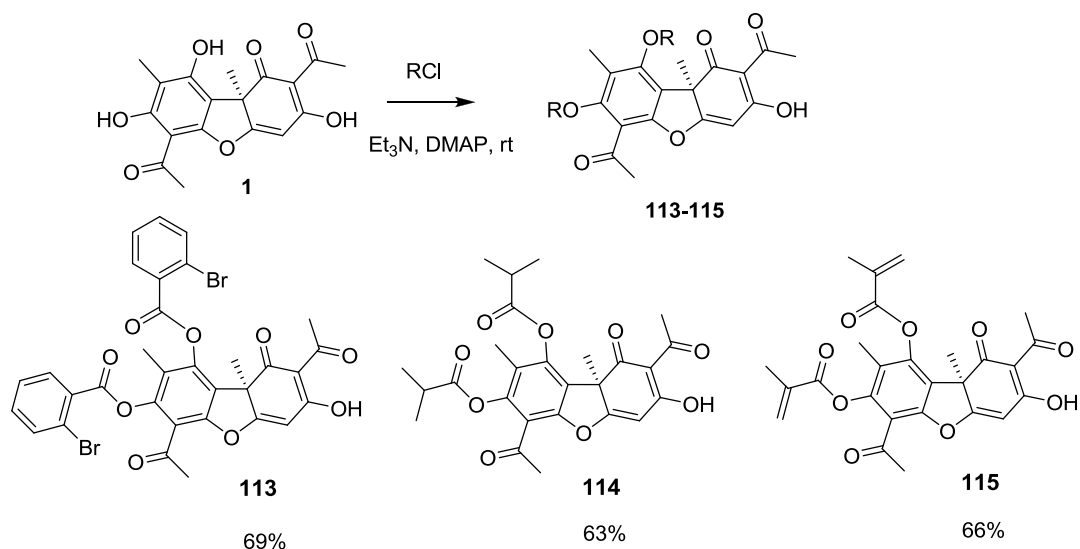


Схема 11. Реакция усниновой кислоты с хлорангидридами кислот.

В аналогичных условиях нами была проведена реакция (+)-УК и её пиразольного производного **35** с Woc_2O – распространенным реагентом для защиты фенольных групп *трет*-бутилоксикарбонильными, устойчивыми к гидролизу в щелочной среде, которая с практически количественным выходом привела к образованию соединений **116** и **117** соответственно с эфирными группами на фенольных гидроксилах (рис. 20).

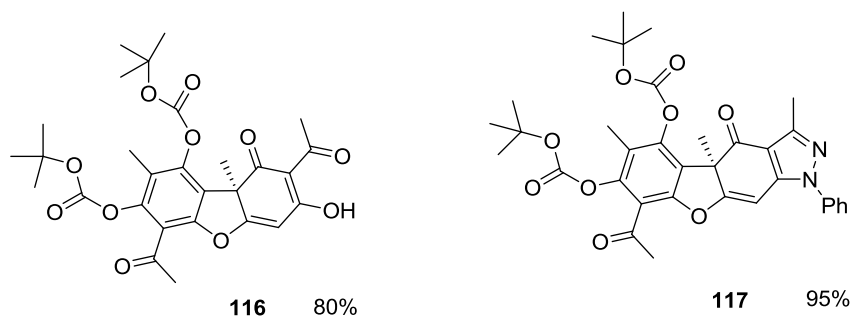


Рисунок 20. Производные усниновой кислоты с Woc -защитными группами на фенольных гидроксильных группах.

Таким образом, нами показано, что реакция УК как с ароматическими и алифатическими хлорангидридами, так и с ангидридом (ди-трет-бутилпирокарбонатом) приводит к образованию диэфиров по фенольным гидроксильным группам УК.

3.4.2 Синтез простых эфиров усниновой кислоты

Получение простых эфиров по гидроксильным группам УК хотя и не является классическим методом защиты этих групп, но часто необходимо в тех случаях, когда неэффективна защита сложноэфирными группами.

3.4.2.1 Взаимодействие усниновой кислоты и её производных с метилирующими агентами

В литературе неоднократно предпринимались попытки синтеза метилового эфира УК, целевой продукт **118** был получен авторами работы²⁶⁹ по реакции (+)-УК с иодистым метилом в кипящем ацетоне в присутствии K_2CO_3 с выходом 11% (рис. 27). Попытка получить метиловый эфир УК с помощью реакции (+)-УК с диметилсульфатом привела лишь к образованию соединения **119** с метильной группой в положении 8 кольца А⁷, а с диазومتаном – соединения **120**, содержащего аннелированный с кольцом С УК фурановый цикл, с небольшим выходом 14%²⁶⁹ (рис. 21).

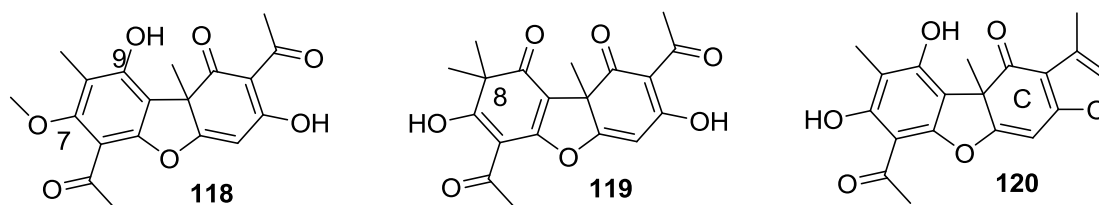


Рисунок 21. Производные усниновой кислоты, полученные при действии метилирующих агентов (литературные данные).

Нами была предложена модифицированная методика метилирования УК иодистым метилом. Реакцию проводили в ДМФА при комнатной температуре следующим образом. Сначала действием K_2CO_3 генерировали фенолят-анион УК в ДМФА при интенсивном перемешивании в течение двух часов. Признаком его образования служило постепенное изменение окраски раствора с желтого до зеленого. После чего добавляли многократный избыток йодистого метила и последующим перемешиванием в течение двух суток получали продукт **118** с выходом 82%.

Известный агент для получения метиловых эфиров – диазометан, как уже упоминалось ранее, при действии на УК при комнатной температуре даёт с небольшим выходом 14% соединение **120** при полной конверсии исходного соединения (рис. 21). Для выявления других продуктов реакции и с целью поиска условий для получения метиловых эфиров УК по другим её гидроксильным группам нами было исследовано взаимодействие (+)-УК с диазометаном при более низкой температуре.

При обработке (+)-УК эфирным раствором диазометана в течение 5 часов при температуре $-35\text{ }^\circ\text{C}$ происходит бурная реакция с образованием сложной смеси продуктов, из которой были выделены соединения **120** и **121** с выходами 8% и 7% (схема 12). Один из продуктов оказался уже известным (соединение **120**), другой образовался в результате метилирования енольного гидроксила и расширения цикла С – соединение **121**.

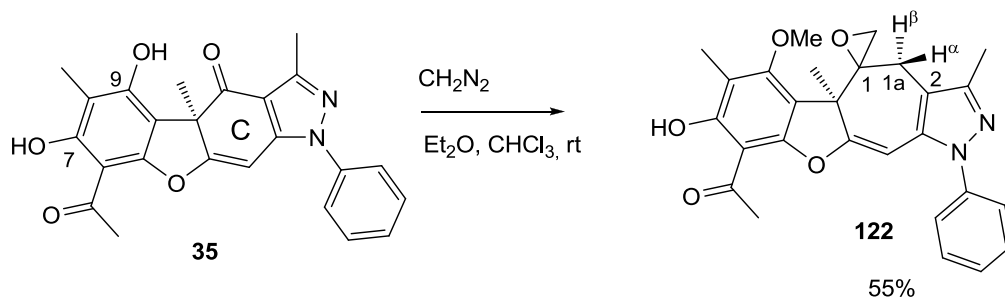


Схема 13. Взаимодействие соединения **35** с диазометаном в среде диэтиловый эфир-хлороформ.

Сравнение спектров ЯМР ^1H исходного соединения **35** и полученного из него соединения **122** показало, что в спектре последнего не наблюдается сигнал ОН-группы при ~ 11 м.д., но появляется сигнал ОМе-группы при 3.93 м.д., что свидетельствует о метилировании гидроксильной группы у атома C^9 . В спектре ЯМР ^{13}C полученного соединения **122** наблюдается исчезновение сигнала карбонильной группы ($\text{C}^1=\text{O}$) и появление двух сигналов метиленовых групп при 30.17 м.д. и 50.84 м.д. и одного сигнала четвертичного атома углерода при 58.15 м.д. Величины химических сдвигов 50.84 м.д. и 58.15 м.д., и величина прямой константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) ^{13}C - ^1H сигнала CH_2 -фрагмента при 50.84 м.д. ($^1J_{\text{C,H}} = 174.7$ Гц), полученная из спектра монорезонанса, свидетельствуют о принадлежности соответствующих углеродов к эпоксидному циклу. Наблюдающуюся в спектрах ЯМР ^1H КССВ между одним из протонов появившейся CH_2 -группы эпоксидного цикла при 2.14 м.д. и одним из протонов CH_2 -группы при 3.66 м.д. ($J_{\text{H,H}} = 2.0$ Гц) можно объяснить дальним W-взаимодействием, из чего следует, что оксирановый цикл и CH_2 -группа находятся в соседнем положении.

Реакцию соединения **35** с эфирным раствором диазометана в хлороформе проводили при большом избытке диазометана, поскольку попытка снизить соотношение реагента и субстрата даже до значения 10:1 привела также к образованию соединения **122** при неполной конверсии субстрата. Стоит отметить, что даже в условиях большого избытка диазометана фенольный гидроксил при C^7 не метилируется. Исходя из литературных данных⁷⁵, можно предположить, что наличие близкорасположенной карбонильной группы ($\text{C}^{13}=\text{O}$), с атомом кислорода которой образуется сильная водородная связь, затрудняет реакцию метилирования C^7 -ОН диазометаном. Поскольку фенольный гидроксил при C^9 в соединении **35** также участвует в образовании водородной связи и при этом метилируется в ходе реакции, и на основании механизма взаимодействия диазометана с циклическими карбонильными соединениями можно сделать предположение, что первоначально происходит расширение цикла **C** в соединении **35**, затем образование оксирана из карбонильной группы ($\text{C}^1=\text{O}$). После чего беспрепятственно происходит метилирование

фенольного гидроксила при C^9 . Таким образом, под действием диазометана в одной молекуле последовательно протекают три различных реакции, что является достаточно необычным. Кроме того, реакции протекают стереоселективно, в результате образуется один стереоизомер соединения **122**.

Как известно, образование гомологов и/или оксиранов из карбонильных соединений под действием диазометана зависит от структуры субстрата и условий реакции. Эти реакции можно подавлять или инициировать, варьируя растворители или применяя различные реагенты. В частности, на результат взаимодействия диазометана с карбонильным соединением влияет добавление метанола^{270, 271} в реакционную смесь.

Реакция соединения **35** с эфирным раствором диазометана в смеси хлороформа и метанола (1:1) привела к образованию в качестве основных продуктов соединений **123** и **124** (выделены в виде смеси, соотношение 3:2 по спектру ЯМР 1H) с суммарным выходом около 50% (Схема 14).

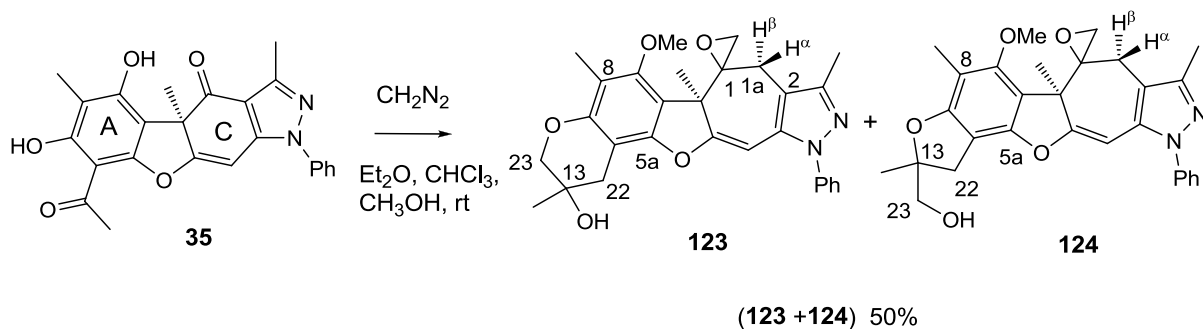


Схема 14. Взаимодействие соединения **35** с диазометаном в среде диэтиловый эфир-хлороформ-метанол.

Помимо метилирования фенольного гидроксила C^9 -ОН, расширения цикла **C** и образования оксирана из карбонильной группы ($C^1=O$), с диазометаном прореагировал ацетофеноновый фрагмент соединения **35** с образованием аннелированных пиранового и фуранового циклов – соединения **123** и **124** соответственно. Следует отметить, что в результате реакции соединения **123** и **124** также образуются в качестве единственных стереоизомеров. Спектры ЯМР соединений **123** и **124** довольно близки по химическим сдвигам сигналов. Максимальные различия в химических сдвигах в спектре ЯМР ^{13}C наблюдаются для атомов $C^{5a} - C^8$ резорцинового цикла и для атомов углерода C^{13}, C^{22}, C^{23} . Наличие и положение гидроксильных групп в образовавшихся пирановом (соединение **123**) и фурановом (соединение **124**) циклах подтверждено спектром ЯМР ^{13}C для раствора смеси веществ в $CDCl_3$ с добавлением D_2O . При замене протона гидроксильной группы на дейтерий за счет изотопного эффекта в спектре наблюдается сильнопольное смещение синглетного сигнала при 64.94 м.д. ($\Delta\delta = 0.12$ м.д.) и триплетного сигнала при 67.97 м.д. ($\Delta\delta$

= 0.15 м.д.), отнесенных к атому C^{13} в структуре **123** и атому C^{23} в структуре **124** соответственно. Конфигурация асимметрических центров при C^{13} не установлена.

Образование пиранового и фуранового циклов в соединениях **123** и **124** можно объяснить, предположив следующую схему превращений (Схема 15). Первоначально происходит внедрение CH_2 -фрагмента между карбонильной группой ($C^{13}=O$) и ароматическим циклом **A**. В дальнейшем при взаимодействии с диазометаном карбонильной группы ($C^{13}=O$) образуется оксирановый цикл, который раскрывается в результате атаки внутреннего нуклеофила – атома кислорода гидроксильной группы – с последующей гетероциклизацией и образованием соединения **123** (путь А) и соединения **124** (путь В). Образование соединений **123** и **124**, таким образом, возможно при взаимодействии с пиразолом **35** пяти молекул диазометана.

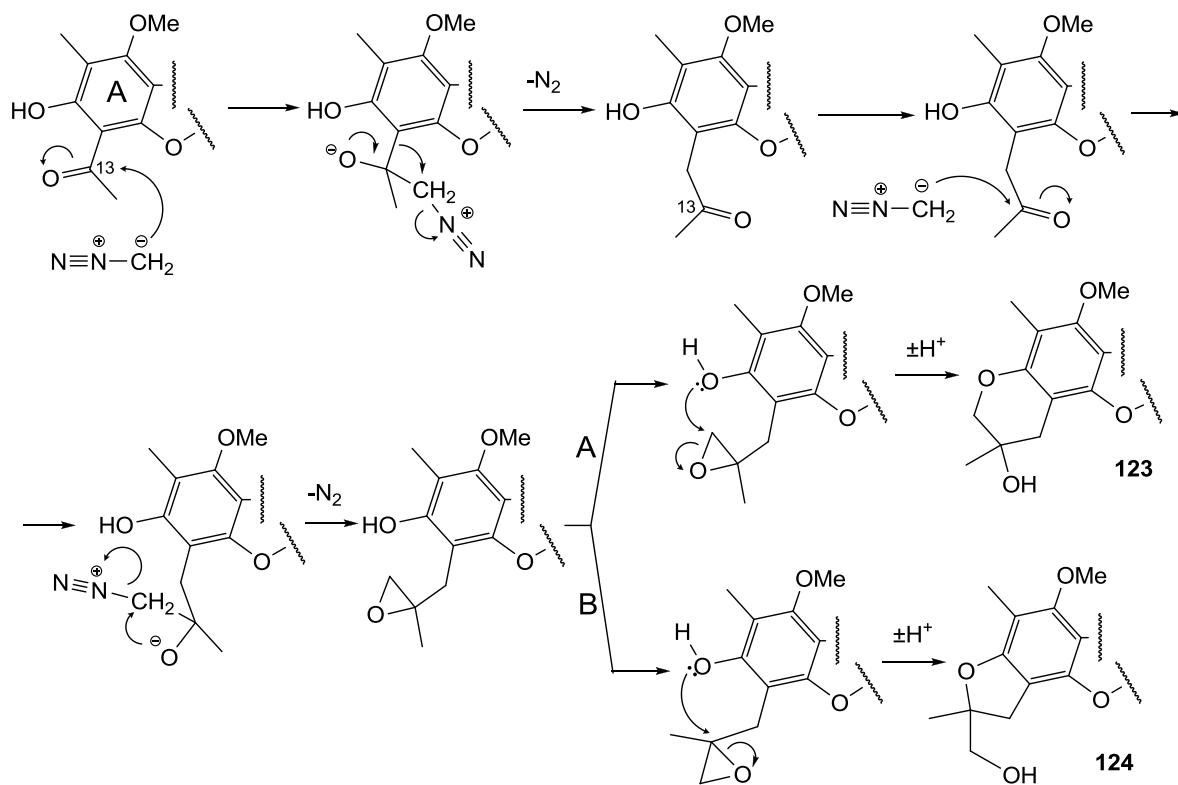


Схема 15. Предполагаемый механизм образования соединений **123** и **124**.

Чтобы избежать перегруппировок цикла **C**, мы вводили в реакцию с диазометаном соединение **125**, содержащее вместо карбонильной группы ($C^1=O$) гидроксильную (схема 16). Продукт **125** был получен восстановлением карбонильной группы ($C^1=O$) в цикле **C** соединения **35** $NaBH_4$ в ТГФ с выходом 96%. Диазометан реагирует с соединением **125** с образованием монометилированного продукта **126**. Как и предполагалось, в этом случае не происходит трансформаций в цикле **C** субстрата, при этом метилирование протекает селективно с образованием C^9 -O-метилированного производного. Также не наблюдалось трансформаций с участием карбонильной группы ($C^{13}=O$) – соединение **126** является

основным продуктом при проведении реакции в хлороформе с выходом 80%. Реакция в хлороформе с добавлением метанола приводит к соединению **126** с выходом 69%. Образование продуктов с аннелированным пирановым и фурановым циклами – соединения **127** и **128** - в последнем случае затруднено, они были выделены в качестве минорных компонентов с суммарным выходом 9 %.

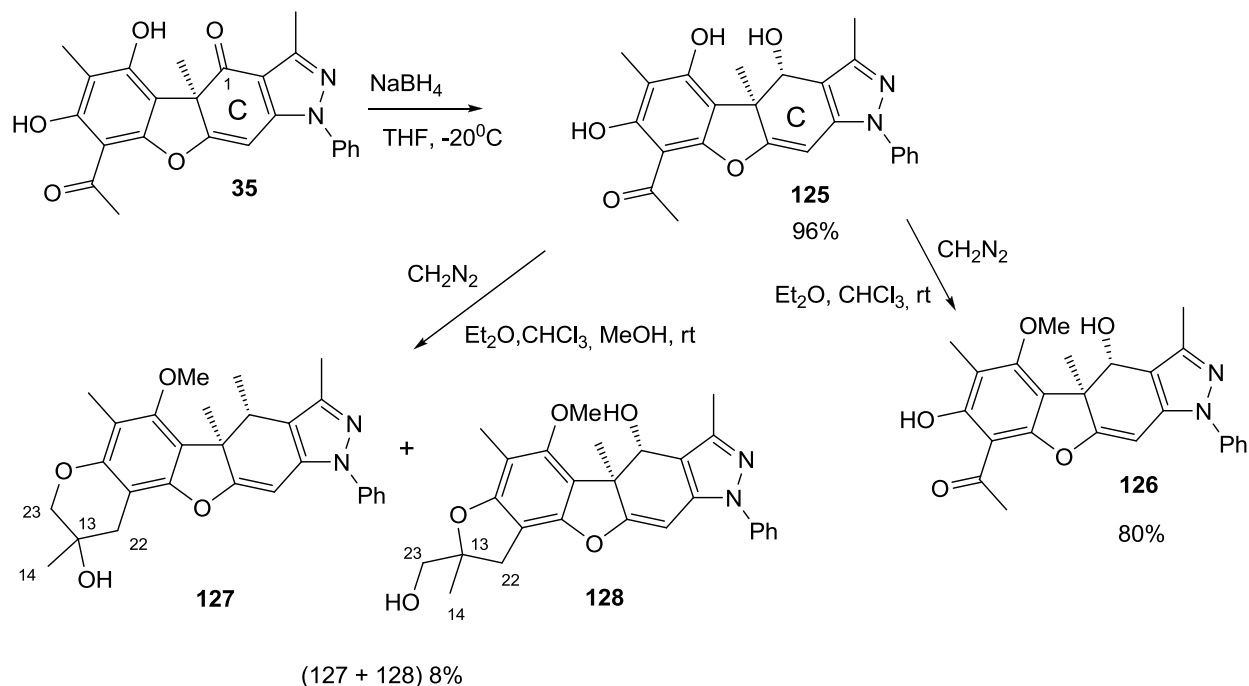


Схема 16. Синтез соединения **125** и взаимодействие его с диазометаном.

Таким образом, нами было осуществлено исследование взаимодействия УК и некоторых ее производных с диазометаном. Показано, что одними из направлений реакций УК с диазометаном являются расширение цикла **C** и метилирование енольной гидроксильной группы. При введении в реакцию с диазометаном модифицированного фенилгидразином производного УК помимо расширения цикла **C** идут реакции образования оксиранового цикла с участием карбонильной группы ($\text{C}^1=\text{O}$) и метилирования фенольного гидроксиды $\text{C}^9\text{-OH}$. Добавление метанола в реакционную смесь способствует взаимодействию с диазометаном карбонильной группы ($\text{C}^{13}=\text{O}$) и образованию продуктов с аннелированными циклу **A** пирановым и фурановым фрагментами. Продукт метилирования фенольного гидроксиды $\text{C}^9\text{-OH}$ селективно удаётся получить при взаимодействии с диазометаном восстановленного по карбонильной группе ($\text{C}^1=\text{O}$) пиразольного производного.

3.4.2.3 Синтез простых эфиров усниновой кислоты реакцией с перфторолефинами

Известно, что введение единичного атома фтора или фторсодержащих групп, часто приводит к повышению биологической активности или увеличению продолжительности действия биоактивного агента. Фторорганические соединения, ошибочно включенные в обменные процессы организмом в результате эффекта маскировки, во многих случаях проявляют биологическую активность, заключающуюся в торможении различных стадий метаболизма. Примером может служить высокая фармакологическая активность фторсодержащих стероидов (противовоспалительное действие)²⁷². Существенным известным фактором при модификации биоактивных молекул и функциональных материалов является высокая липофильность полифторированных (и особенно перфторированных) радикалов.

Согласно литературным данным²⁷³ эфиры спиртов и фенолов можно получать реакцией с перфторолефинами в присутствии оснований, взаимодействие приводит либо к продуктам нуклеофильного замещения атома фтора при двойной связи перфторолефина, либо продуктам присоединения по двойной связи в зависимости от условий реакции.

Нами показано, что при взаимодействии УК с фторсодержащим олефином - трифторхлорэтиленом в ДМФА (содержание воды 0.2%) реакция идёт по пути присоединения C⁷-ОН-группы по кратной связи полифторолефина. В результате реакции образуется соединение **129** с выходом 87% (схема 17).

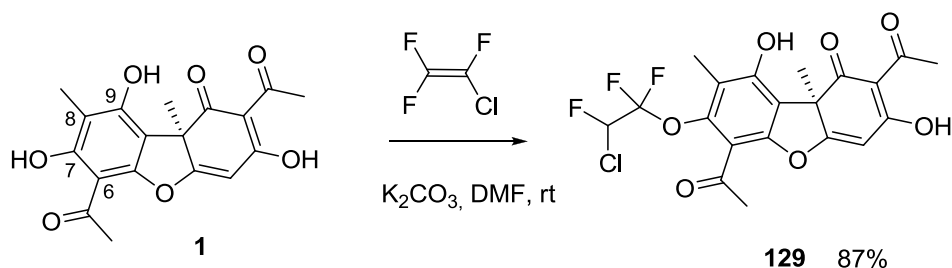


Схема 17. Реакция усниновой кислоты с трифторхлорэтиленом.

Сравнение спектров ЯМР ¹H УК и соединения **129** показало, что в спектре последнего не наблюдается сигнал ОН-группы при ~13 м.д., в то время как сигналы остальных ОН-групп остаются неизменными ~11 м.д. (C⁹-ОН) и ~19 м.д. (енол-ОН), что свидетельствует об алкилировании гидроксильной группы у атома C⁷. Следует отметить, что в спектрах ЯМР ¹³C наибольшие изменения проявляются в химических сдвигах сигналов атомов углерода C⁶, C⁷ и C⁸, причем эти сигналы расположены в более слабом поле по отношению к сигналам тех же атомов углерода исходной УК, что также служит подтверждением замещения по 7-ому фенольному гидроксилу.

Реакция с терминальным перфторолефином гексафторпропиленом в ДМФА в присутствии K₂CO₃ протекает не столь однозначно. Преимущественно образуется продукт

присоединения по двойной связи перфторолефина соединения **130** (выход 52%). Из реакционной смеси также выделено с выходом 22% соединение **131** - продукт с аннелированным циклу А УК пирановым фрагментом (схема 18).

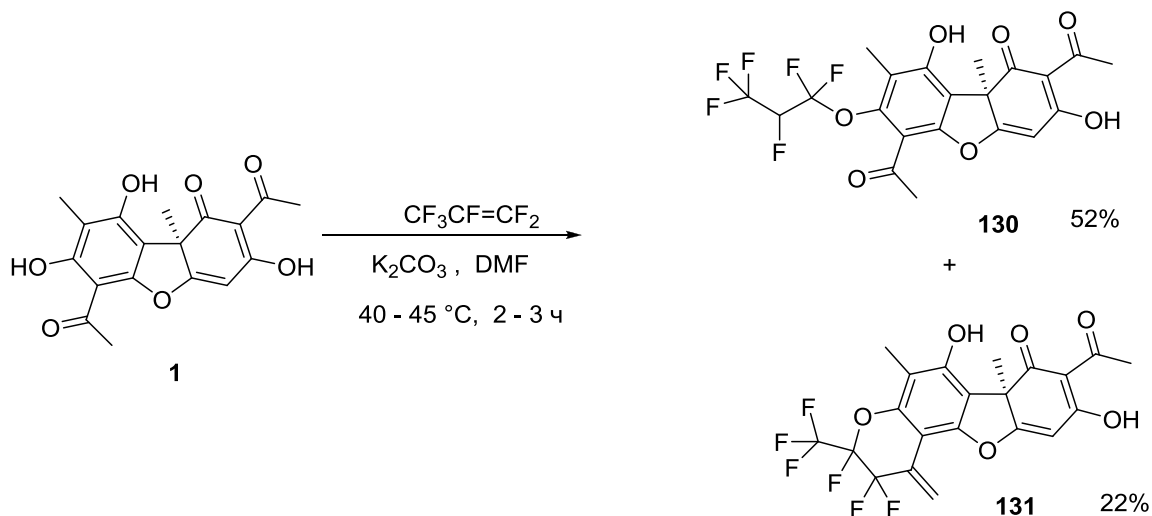


Схема 18. Реакция усниновой кислоты с гексафторпропиленом

Образование соединения **130** протекает, по-видимому, через промежуточный карбанион **A** (схема 19). В присутствии следов воды происходит протонирование этого карбаниона, что приводит к производному **130**. Образование соединения **131** с аннелированным кольцу С УК пирановым циклом, по-видимому, протекает через другой карбанион **B**, образующийся путём атаки фенолят-аниона УК по интернальному атому углерода двойной связи перфторпропилена.

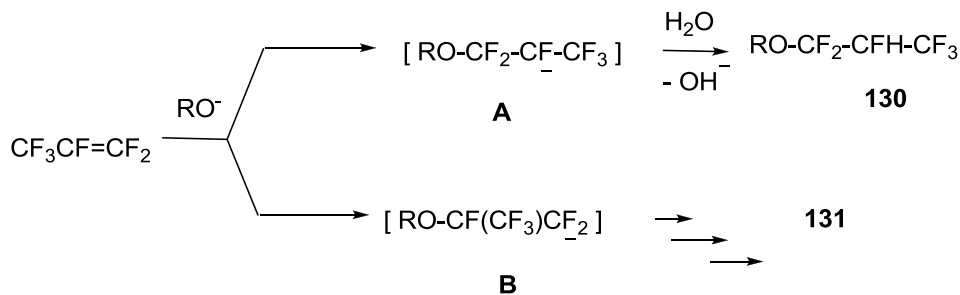


Схема 19. Предполагаемые пути реакции усниновой кислоты с гексафторпропиленом.

Последующие нуклеофильная атака образующегося карбаниона **B** по атому углерода карбонильной группы УК и дегидратация образующегося третичного спирта **C** приводят к тетрациклическому соединению **131** (схема 20).

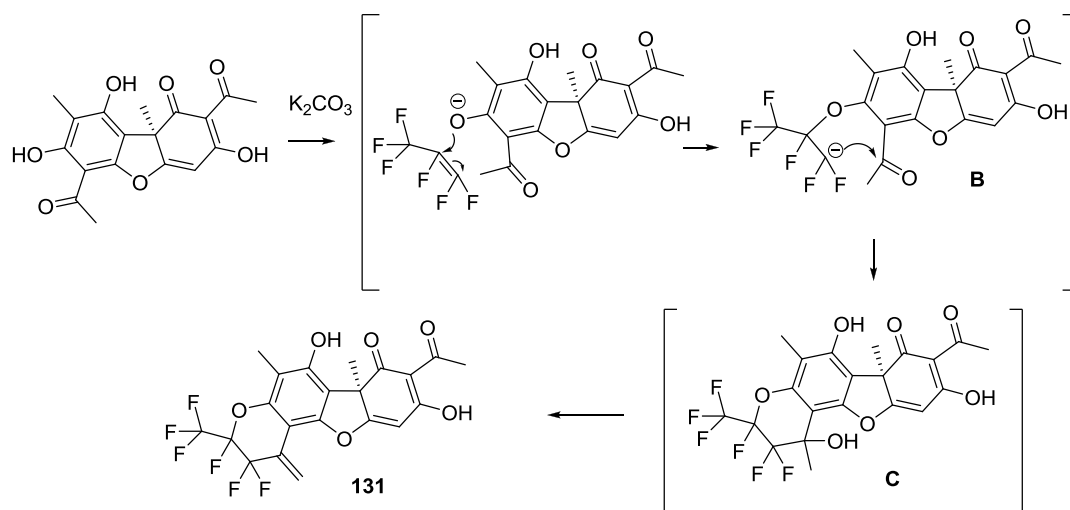


Схема 20. Предполагаемый механизм образования соединения **131**.

3.4.2.3 Синтез простых эфиров усниновой кислоты реакцией с перфторароматическими соединениями

Известно, что перфторароматические соединения вступают в реакции нуклеофильного замещения. Для реакции О-арилрования нами были выбраны соединения, содержащие акцепторный заместитель – перфторнитробензол, перфторпирдин, перфтортолуол и перфторированный цианобензол. В ходе исследования было установлено, что при взаимодействии (+)-УК с полифторароматическими производными в системе K_2CO_3 -ДМФА действительно образуются продукты нуклеофильного замещения по гидроксильной группе 7-ого атома углерода УК **132-135** (схема 21). С полной конверсией УК реакция протекает в случае перфторнитробензола и перфторцианобензола, продукты взаимодействия последних с УК – соединения **132** и **135** – удалось выделить с выходами 84% и 98%, соответственно. Соединение **133** выделено нами с выходом 35%, конверсия реакции составила 75%, а соединение **134** охарактеризовано из смеси с исходной УК в соотношении ~ 1:0.8 (ЯМР 1H). Во всех случаях протекает замещение атома фтора только в пара-положение к заместителю в перфторароматических соединениях, что однозначно трактуется спектрами ЯМР ^{19}F .

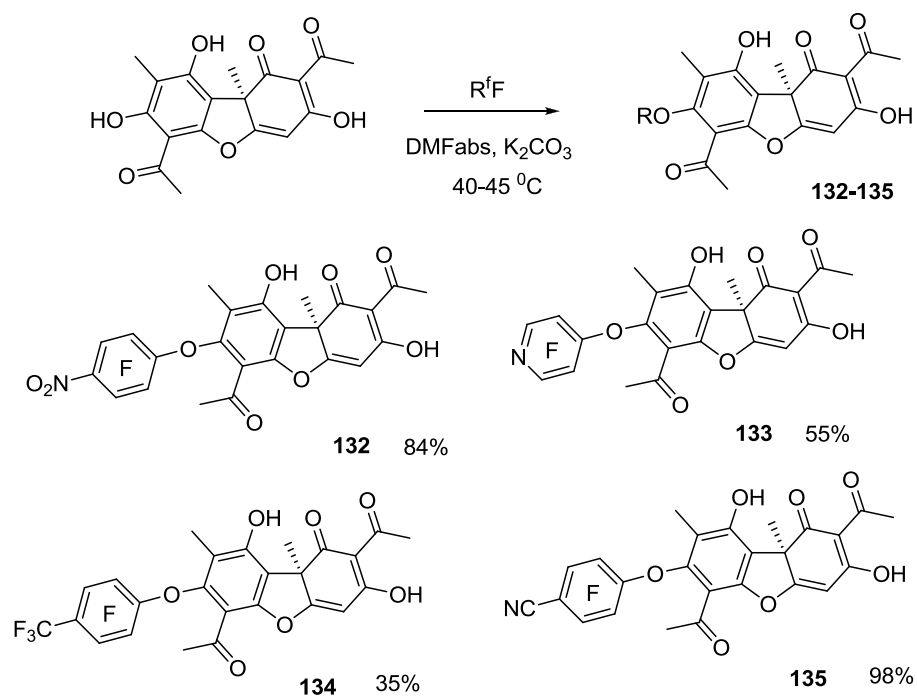


Схема 21. Реакция усниновой кислоты с перфторароматическими соединениями.

Реакция протекает лишь в сухом ДМФА, попытка использовать влажный ДМФА(0.2%), либо же сменить систему основание-растворитель на триэтиламин в ацетонитриле не приводит к образованию каких-либо продуктов.

Таким образом, нами показано, что реакция УК с перфторолефинами протекает с образованием эфиров по пути нуклеофильного присоединения при использовании системы K_2CO_3 -ДМФА в присутствии воды. Продукты нуклеофильного замещения были получены реакцией с перфторароматическими соединениями в системе K_2CO_3 -абсолютный ДМФА. Установлено, что образование новых полифторсодержащих эфиров УК протекает по фенольной группе у 7-го атома углерода УК.

Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы нами в следующих публикациях: ²⁷⁴, ²⁷⁵, ²⁷⁶, ²⁷⁷, ²⁷⁸.

3.5 Реакции взаимодействия усниновой кислоты с комплексными гидридами бора

В структуре УК присутствует несколько фрагментов, способных подвергаться восстановлению различными восстановителями. Известно, что реакция восстановления УК H_2/Pd^{279} приводит с количественным выходом к восстановлению двойной связи C^4-C^{4a} . Однако, в литературе нет сведений по восстановлению карбонильных групп УК.

Нами впервые изучены реакции взаимодействия УК и её производных с комплексными гидридами бора. Установлено, что реакция УК с боргидридом натрия в ТГФ при комнатной температуре протекает крайне неселективно с образованием многокомпонентной смеси продуктов. Понижение температуры реакции до $-38\text{ }^\circ\text{C}$ приводит к упрощению реакционной смеси. После реакции из реакционной смеси были выделены продукты восстановления карбонильной группы $C^1=O$ (соединение **136**) и двух карбонильных групп $C^1=O$ и $C^{11}=O$ (соединение **137a,b**) с общим выходом 57% (схема 22).

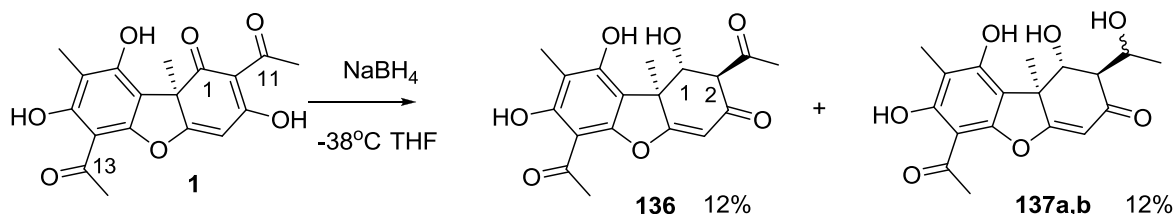


Схема 22. Реакция усниновой кислоты с боргидридом натрия.

Установлено, что восстановление по карбонильной группе $C^1=O$ протекает стереоселективно, менее селективно протекает восстановление по карбонильной группе $C^{11}=O$, соединение **137** представляет собой смесь стереоизомеров с явным преобладанием одного из них. Конфигурация центра при C^1 в обоих соединениях нами предложена, на основании литературных данных о механизме реакции гидрирования боргидридом натрия²⁸⁰. Взаимное аксиально-аксиальное расположение протонов при атомах углерода 1 и 2 установлено исходя из сравнения величины константы их спин-спинового взаимодействия (10.5 Гц) и литературных данных о соответствующих константах в замещённых циклогексенах²⁸¹.

Поскольку наличие трёх карбонильных групп в УК способствует неселективному восстановлению и экзоциклическая карбонильная группа в кольце С, по-видимому, вносит основной вклад в вариабельность, то её исключение из реакции позволило бы упростить реакционную смесь и получить продукты восстановления карбонильной группы $C^{13}=O$. И, действительно, при восстановлении в аналогичных условиях пиразольного производного **35** получен единственный продукт реакции - соединение **125**, результат восстановления карбонильной группы $C^1=O$ (схема 23). Реакция протекает стереоселективно, конфигурация центра при атоме C^1 в соединении **125** предложена нами, исходя из литературных данных о

механизме реакции карбонильных соединений с боргидридом натрия. Соединение **125** образуется с отличным выходом (96%) в температурном диапазоне от -40 до 0 °C, выход продукта **125** несколько падает (90%) при повышении температуры до комнатной. Дальнейшее повышение температуры до 50 °C приводит к реакции соединения **125** с избытком боргидрида натрия с образованием соединения **138a,b** - продукта восстановления карбонильной группы $C^{13}=O$ (выход 71%, смесь стереоизомеров по центру C^{13} ~ 40:60 по данным ЯМР 1H).

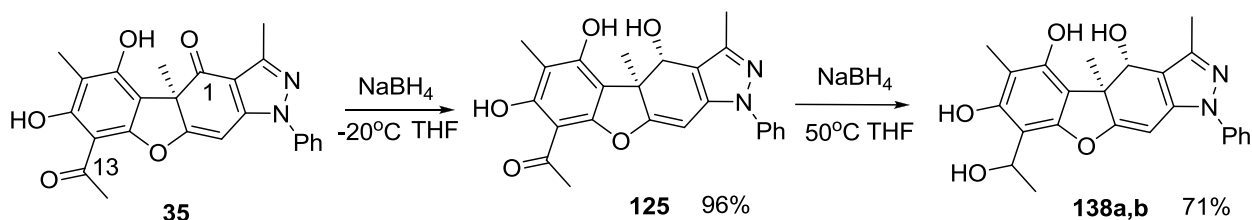


Схема 23. Реакция соединения **35** с боргидридом натрия.

Не оставим вниманием тот факт, что реакция с образованием соединения **125** протекает с высоким выходом (96%), однако восстановление второй карбонильной группы (соединение **138a,b**) проходит не стереоселективно и с меньшим выходом (71%). С целью подбора условий получения соединения **138a,b** было проведено восстановление карбонильной группы ($C^{13}=O$) другими комплексными гидридами бора. Обнаружено, что карбонильная группа ($C^{13}=O$) не восстанавливается более мягким, чем боргидрид натрия агентом - Bu_4NBH_4 (Схема 24). Однако, этот агент селективно и с высоким выходом (96%) восстанавливает эндоциклическую карбонильную группу ($C^1=O$) без необходимости использования низких температур реакционной смеси.

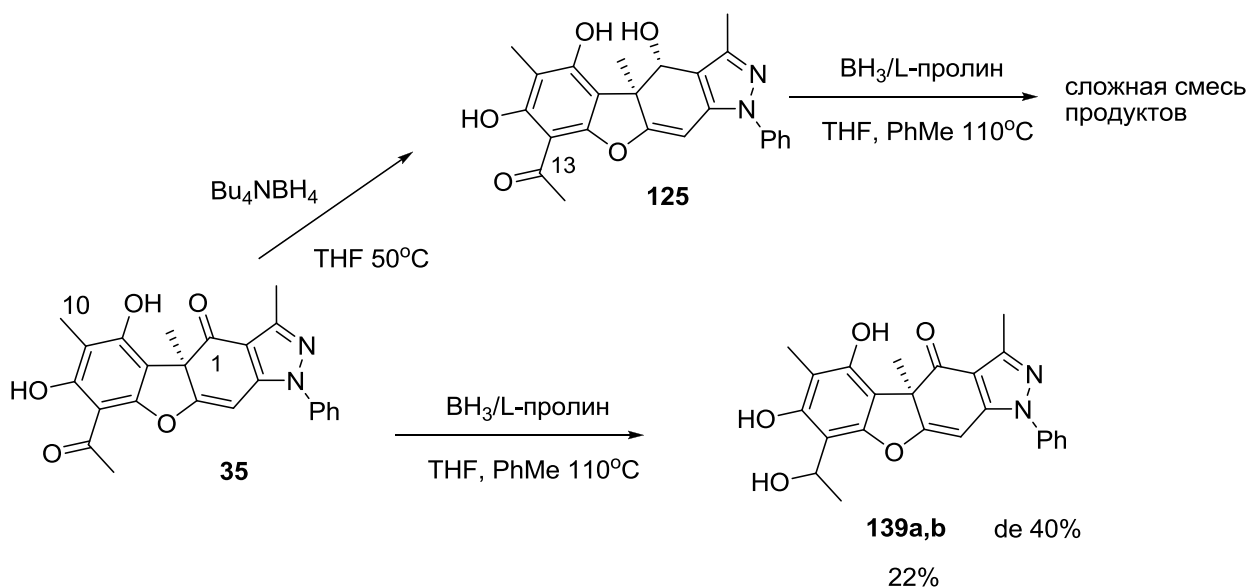


Схема 24. Реакция соединения **35** с комплексными гидридами бора.

В связи с образованием смеси стереоизомеров при восстановлении карбонильной группы ($C^{13}=O$) была проведена попытка стереоселективного восстановления этой группы хиральным восстановителем ТГФ·ВН₃/L-пролин (генерируется *in situ*), использование которого при восстановлении ацетофенона показало 99%-ную энантиоселективность²⁸². Асимметрическое восстановление соединения **125** этой системой привело к образованию сложной смеси продуктов. При восстановлении соединения **35** (Схема 24) реакционная смесь продуктов оказалась существенно проще, однако при этом не наблюдается продуктов восстановления карбонильной группы ($C^1=O$), а восстановление карбонильной группы ($C^{13}=O$) протекает с умеренной стереоселективностью – по спектру ¹Н ЯМР соединения **139a,b** образуются с *de* 40% (по спектру ¹Н ЯМР).

Более низкий (71%) выход продуктов восстановления карбонильной группы $C^{13}=O$, чем выход продукта при восстановлении карбонильной группы $C^1=O$ (96%) может быть связан с тем, что при обработке реакционной смеси раствором НСl, используемой для удаления избытка восстановителя после реакции, может генерироваться *para*-хинонметидный реакционноспособный интермедиат **A**²⁸³ (Схема 25). Эта частица может быть ответственна за протекающие побочные реакции, в основном реакции самоконденсации, что и приводит к снижению выхода целевых продуктов.

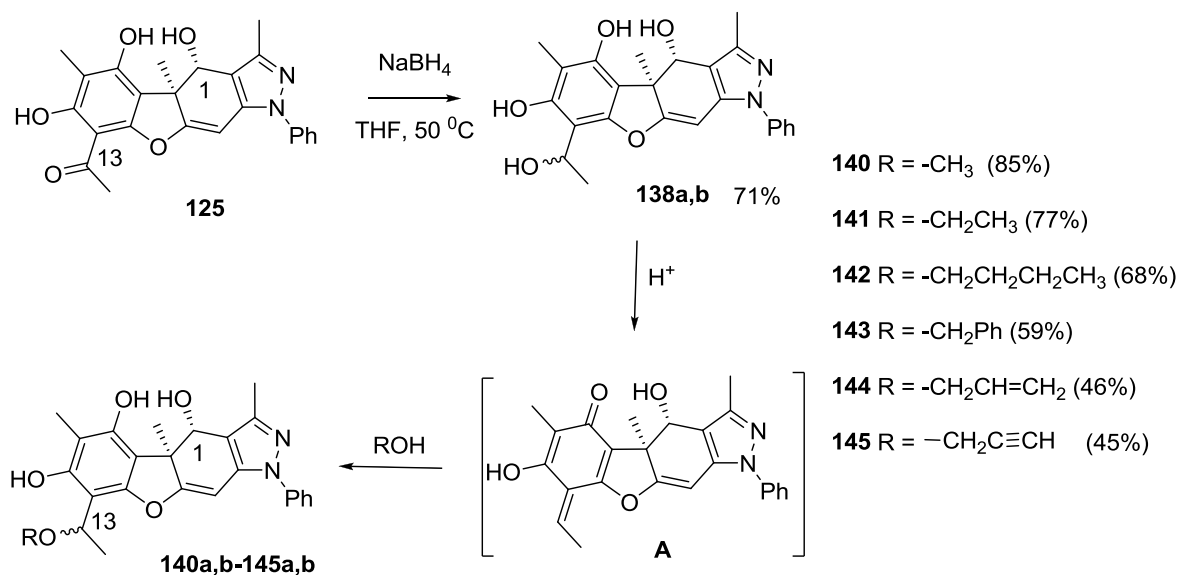


Схема 25. Синтез соединений **140-145**. Предполагаемый путь реакции.

В присутствии в реакционной среде нуклеофила *para*-хинонметидная частица **A** может предпочтительно реагировать с ним, не вступая в реакции самоконденсации. И, действительно, нами было обнаружено, что при добавлении на этапе обработки реакционной смеси соляной кислотой метилового или этилового спиртов происходит образование простых эфиров, соответственно, **140a,b** и **141a,b** (смесь диастереомерных соединений), причем выход образующихся эфиров действительно выше, чем спиртов **138a,b** (схема 25).

Нами была предпринята попытка расширить спектр применения реакции путем вовлечения в реакцию *n*-бутилового, бензилового, аллилового и пропаргилового спиртов. Как и ожидалось, имеет место О-алкилирование, однако, несмотря на применявшийся значительный избыток спирта, выход для производных вышеупомянутых спиртов **142a,b-145a,b** более умеренный.

В литературе²⁸⁴ приведены исследования механизма образования простых эфиров замещенных *n*-гидроксibenзиловых спиртов с метиловым спиртом в кислой среде, авторы получили косвенное подтверждение существования такой хинонметидной переходной частицы, показав, что ряд *para*-метоксибензиловых спиртов не вовлекается в реакцию с метиловым спиртом в кислых условиях, при том, что электронодонорные эффекты ОН- и MeO-групп близки. Для подтверждения предположения о подобном механизме реакций образования соединений **140a,b-145a,b** нами было использовано полученное ранее соединение **126**, содержащее в положении 9 метокси-группу, и, следовательно, не дающее в кислой среде *para*-хинонметидную частицу. Восстановление соединения **126** боргидридом натрия протекает практически без побочных реакций, при нагревании в ТГФ хорошо восстанавливается вторая карбонильная группа с образованием соединения **146a,b** (схема 26) с высоким выходом 95%, что подтверждает наше предположение о влиянии *para*-хинонметидной частицы **A** на ход реакции.

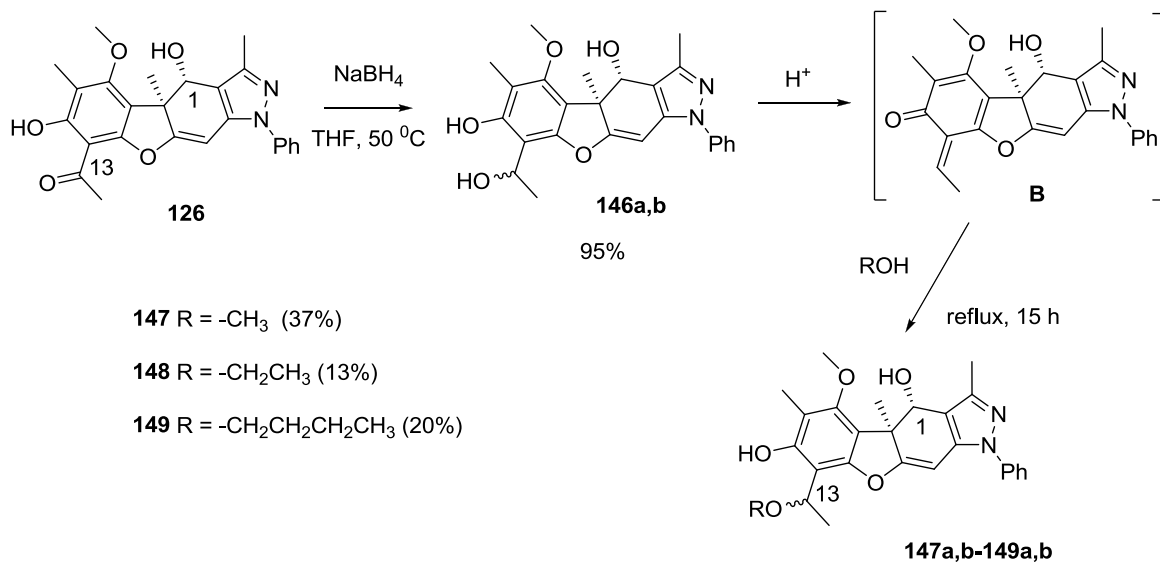


Схема 26. Реакция соединения **126** с боргидридом натрия. Синтез соединений **147-149**.

При добавлении в реакционную среду спиртов присоединение нуклеофила все-таки протекает, но в более жестких условиях – при кипячении обработанной реакционной смеси с избытком соответствующего спирта в течение 10 часов. Удалось выделить продукты присоединения метилового, этилового и *n*-бутилового спиртов (с низкими выходами), в остальных случаях (бензиловый, аллиловый, пропаргиловый спирты) эфирные соединения

присутствовали в следовых количествах. Образование простых эфиров **147a,b-149a,b**, в свою очередь, возможно через *орто*-хинонметидную переходную частицу **B** (схема 18), для генерирования которой требуются более жесткие условия, чем для *пара*-хинонметидной **A**²⁸⁵.

Таким образом, показано, что восстановление карбонильных групп УК боргидридом натрия проходит последовательно. Наиболее реакционноспособна эндоциклическая карбонильная группа ($C^1=O$), восстановление которой протекает стереоселективно. Карбонильная группа ($C^{13}=O$) восстанавливается лишь при повышенной температуре и не стереоселективно, что показано нами на примере реакции с боргидридом натрия пиразольного производного УК **35**. Восстановление карбонильной группы ($C^{13}=O$) без затрагивания эндоциклической карбонильной группы возможно при использовании системы ТГФ·ВН₃/L-пролин, при этом реакция протекает с невысокой селективностью. Обнаружено, что восстановление ацетофеноновой карбонильной группы в пиразольном производном УК боргидридом натрия в присутствии спиртов протекает с образованием смесей диастереомерных простых эфиров. Присоединение спиртов существенно затрудняется, если фенольный гидроксил в пара-положении к восстанавливаемому фрагменту защищен метильной группой. Обнаруженные закономерности позволяют предположить, что реакция восстановления карбонильной группы ($C^{13}=O$) протекает через образование пара-хинонметидного интермедиата, что открывает новые синтетические возможности для производных УК.

Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы нами в следующих публикациях:^{286, 287}.

3.6 Реакции окисления усниновой кислоты и её производных

В литературе, реакции, сопровождающиеся окислением УК или ее производных, представлены немногочисленными примерами. Так, в работах^{288, 289, 290} описано расщепление углеродного скелета УК в присутствии щелочи в спиртовом и водно-спиртовом растворах. В этих условиях разными авторами получены сложные смеси продуктов, некоторые из продуктов деструкции УК по кольцу С были выделены с небольшими выходами. Окисление 7,9-диацетата УК перманганатом калия протекает, по данным авторов работы²⁹¹, также по кольцу С субстрата и приводит к сложной смеси продуктов. Окисление УК 30%-ной перекисью водорода описано в работе²⁹². Реакцию проводили в пиридине, продукт реакции - 2-ацетоксипроизводное УК **150** выделено с выходом 83% (рис. 22).

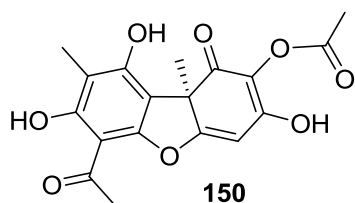


Рисунок 22. Производное усниновой кислоты, полученное при действии перекиси водорода в пиридине (литературные данные).

Изучение нами реакций окисления УК различными окислительными реагентами действительно оказалось малорезультативным. Реакции УК **1** с концентрированной HNO_3 и реагентами на основе Cr(VI) привели к образованию сложных смесей продуктов в результате, по-видимому, глубокой деструкции молекулы субстрата. Напротив, в присутствии таких окислителей как $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_4$, KIO_4 , O_2 , $t\text{-BuOOH}$, периодина Десса-Мартина, H_2O_2 в хлороформе, SeO_2 , SeO_2 в присутствии H_2O_2 окисление УК не происходит.

Однако, необычную окислительную реакцию нам удалось обнаружить при использовании в качестве окислителя органических надкислот (*мета*-хлорнадбензойная (MCPBA), надуксусная и моноадфталевая (MPPA) кислоты). Реакция протекает в хлороформе при комнатной температуре с образованием двух соединений. После колоночной хроматографии на силикагеле выделили продукты **151** и **152** с выходами 41% и 27% соответственно (схема 27).

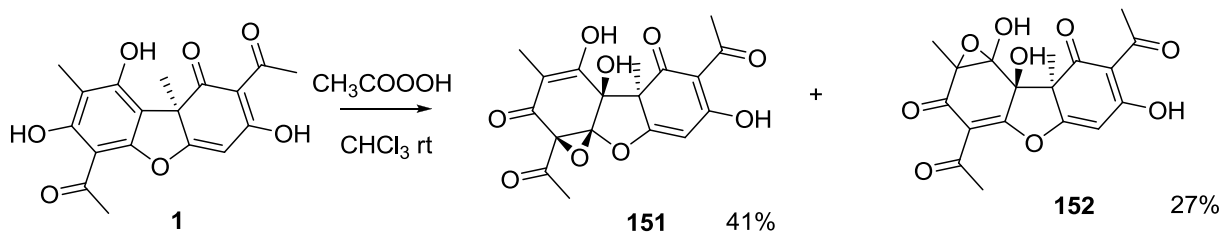


Схема 27. Взаимодействие усниновой кислоты с органическими надкислотами.

Выделение соединений **151** и **152** оказалось наиболее удобным из реакции с надуксусной кислотой, так как продукт ее распада – уксусная кислота, легко выводится из реакционной смеси отмыванием водой. При использовании МСРВА или МРРА выделение продуктов затруднено отделением от образующихся в процессе реакции соответственно *мета*-хлорбензойной или фталевой кислот. Как правило, для отделения от образующихся кислот используется обработка реакционной смеси раствором NaHCO_3 , но в обнаруженной нами реакции при такой обработке происходит существенная потеря реакционной массы.

Строение соединений **151** и **152** установлено на основании данных спектров ЯМР ^1H и ^{13}C . Структура соединения **151**, в том числе конфигурация эпоксидного цикла в нем, подтверждается данными РСА (рисунок 23). Цикл $\text{C}^{1a} - \text{C}^{9a}$ плоский в пределах $\pm 0.039 \text{ \AA}$, цикл $\text{C}^{4b} - \text{C}^{8a}$ имеет конформацию софы с отклонением атома C^{4b} на $0.336(5) \text{ \AA}$. Пятичленный цикл находится в конформации конверта с выходом атома C^{4b} на $0.559(5) \text{ \AA}$. Практически такая же конформация циклов наблюдается в исходной УК^{293, 294}. За счёт водородной связи $\text{O}^4 - \text{H} \dots \text{O}^8$ (O-H $0.80(5)$, H...O $1.96(5) \text{ \AA}$, O-H...O $174(5)^\circ$) образуются вдоль оси *c* цепочки молекул типа голова-хвост. Следует отметить прочную внутримолекулярную водородную связь $\text{O}^7 - \text{H} \dots \text{O}^6$ с параметрами $\text{O}^7 - \text{H}$ $1.22(6)$, $\text{H} - \text{O}^6$ $1.29(6)$, $\text{O} \dots \text{O}$ $2.427(5) \text{ \AA}$, $\text{O}^7 - \text{H} - \text{O}^6$ $149(6)^\circ$, близкими аналогичным в УК. Соединение **152** образуется в виде единственного стереоизомера, конфигурация эпоксидного цикла соединения **152** не установлена.

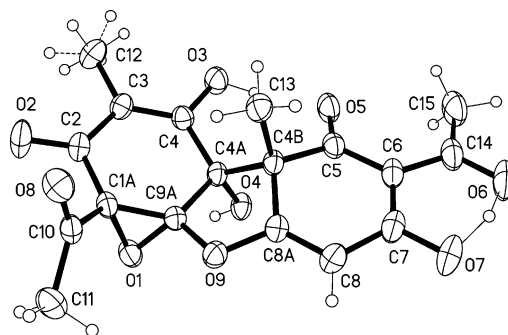


Рис. 23 Строение молекулы соединения **151** в кристалле (представлены 30% тепловые эллипсоиды).

Как видно из строения соединений **151** и **152**, окислению подвергся резорциновый цикл **A** молекулы УК **1**. С учетом этого факта и литературных данных по окислению замещенных фенолов перекисью водорода в уксусной кислоте²⁹⁵, нами был предложен возможный механизм реакции окисления УК **1** надкислотами (схема 28). На первой стадии, по-видимому, происходит электрофильное присоединение с образованием интермедиата **1a**, который в дальнейшем раскрывается, а промежуточно образующийся диол **1b** эпоксируется либо по связи $\text{C}^{5a} - \text{C}^6$, либо по связи $\text{C}^8 - \text{C}^9$ с образованием, соответственно, соединений **151** и **152**.

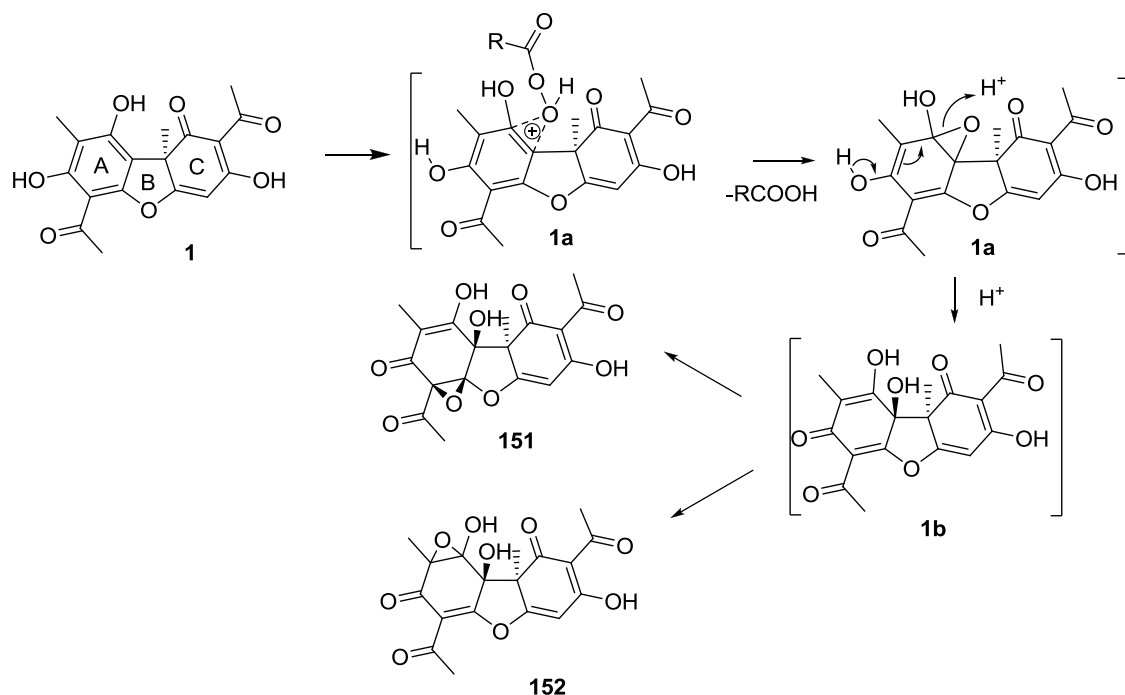


Схема 28. Предполагаемый механизм образования соединений **151** и **152**.

7,9-Диацетат-УК **4** с не вступает в реакцию с $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$. В то же время, пиразольное производное УК - соединение **35**, так же как и УК, окисляется по резорциновому циклу **A**. При этом образуются соединения **153** и **154**, выделенные методом колоночной хроматографии с выходами 43 и 22 % соответственно (схема 29).

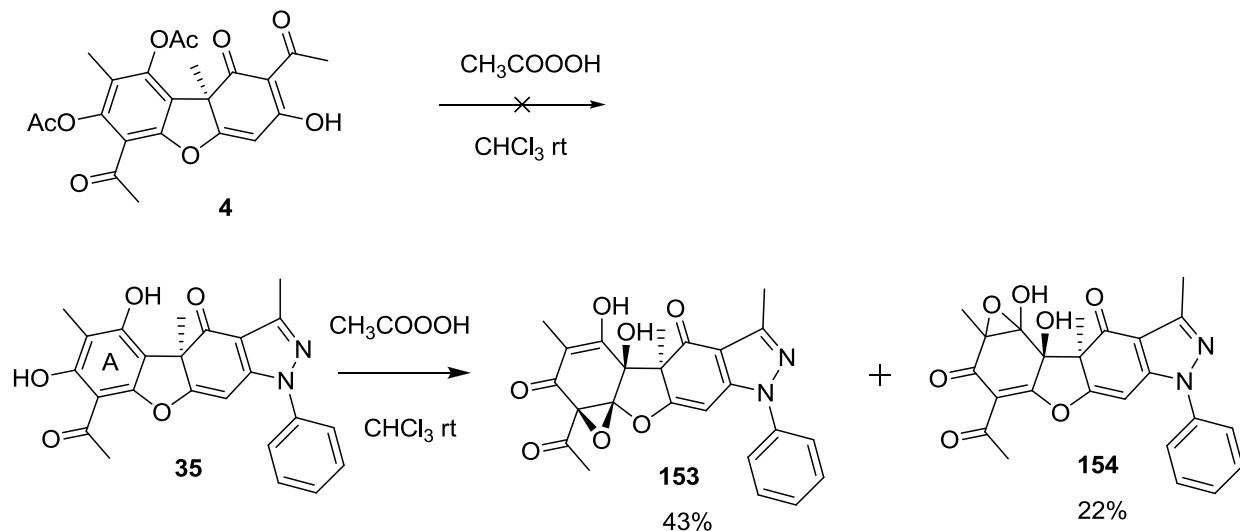


Схема 29. Взаимодействие соединений **4** и **35** с органическими надкислотами.

Таким образом, окисление УК и ее пиразольного производного органическими надкислотами происходит по кольцу **A** с разрушением ароматической системы и образованием соединений, содержащих эпоксидные циклы.

Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы нами в публикации²⁹⁶.

3.7 Реакция Шмидта усниновой кислоты

Реакция Шмидта это взаимодействие карбонильных соединений с азотистоводородной кислотой HN_3 в присутствии сильных кислот с образованием аминов (из карбоновых кислот), амидов (из кетонов) или нитрилов (из альдегидов). Наличие ацетильных групп в УК позволяет предположить возможность получения по реакции Шмидта соответствующих амидов УК, соединений, перспективных для дальнейшей функционализации. Ранее, авторы работы²⁹¹ с целью введения в кольцо А молекулы УК амидной группы попытались вовлечь УК в реакцию Шмидта, однако, при проведении реакции в хлороформе при $0\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 часа с использованием в реакции эквимольных количеств азиды натрия из реакционной смеси была выделена с выходом 93% лишь исходная УК **1**. Модификация условий этой методики позволила нам инициировать реакцию. Реакционную смесь нагревали до $50\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 2 часов, при этом использовали 4-х кратный избыток азиды натрия. Нами было обнаружено, что в результате такой реакции образуется оксазольное соединение **156**, которое было выделено после хроматографической очистки с выходом 60%. По видимому, ожидаемое амидное производное **155** является промежуточным и в кислых условиях подвергается дальнейшей перегруппировке с вовлечением в реакцию фенольной гидроксильной группы в орто-положении к реагирующей ацильной группировке и образованием оксазольного соединения **156** (схема 30).

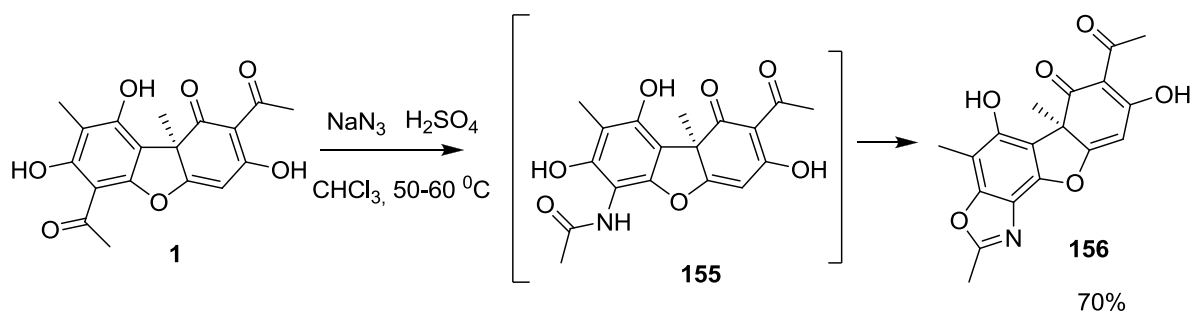


Схема 30. Взаимодействие усниновой кислоты с азидом натрия в условиях реакции Шмидта.

Соединение **156** ранее было получено авторами работы²⁹¹ по другой схеме. Двухстадийным синтезом из УК реакцией с монохлорамином в 0.6%-ном водном растворе и последующим взаимодействием с тионилхлоридом было получено соединение **156** с общим выходом 27%, в работе приведены только данные ЯМР ^1H .

Таким образом, нами показано, что УК вступает во взаимодействие в условиях реакции Шмидта, реакция сопровождается внутримолекулярной перегруппировкой с образованием соединения с аннелированным циклу А УК оксазольным циклом. Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы нами в публикации²⁹⁷.

3.8 Бромирование усниновой кислоты и её производных

Галогенпроизводные УК - один из наиболее удобных и ключевых соединений для её дальнейшей функционализации и проведению синтетических трансформаций, направленных на получение новых потенциально биологически активных соединений. В литературе нет сведений о галогенпроизводных УК.

Нами было впервые осуществлено бромирование УК. Реакция протекает в диоксане с использованием двукратного избытка брома в присутствии HBr, достаточно высокий уровень конверсии достигается через 7 суток. При этом, из двух ацетильных групп способных вступить в реакцию в этих условиях бромруется группа, находящаяся в ароматическом цикле **A**. В результате реакции, протекающей при комнатной температуре в течение 7 суток, было выделено соединение **157** с выходом 67% после колоночной хроматографии (схема 31). Повышение содержания брома в реакционной смеси до трехкратного избытка относительно УК, способствует образованию дибромпроизводного **158** (соотношение соединений **157** и **158** – 7:3 по спектру ^1H ЯМР). Повышение температуры реакции приводит к снижению выхода монобромпроизводного **157** и накоплению в реакционной смеси продуктов полибромирования.

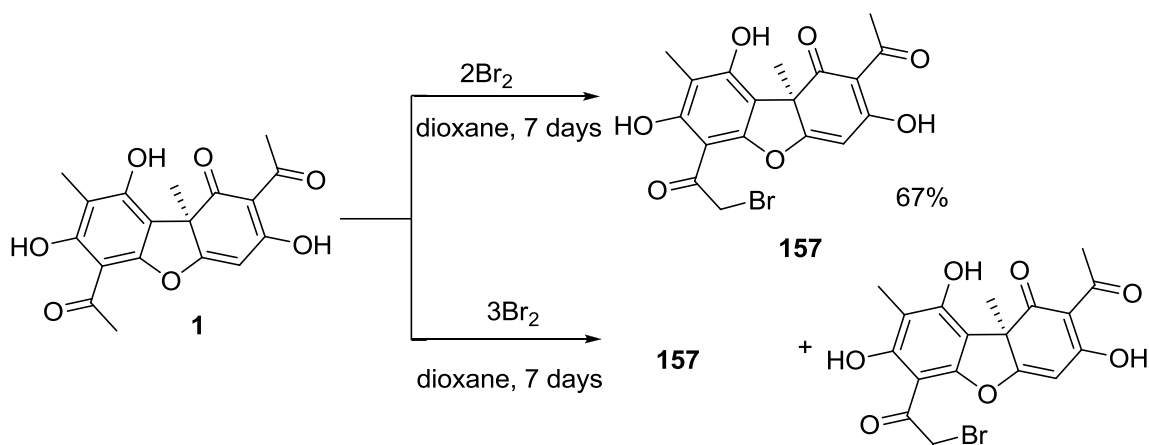


Схема 31. Реакция электрофильного бромирования усниновой кислоты.

Поскольку бромпроизводное УК на наш взгляд является удобным синтоном для большого количества дальнейших синтетических трансформаций, нами была проведена оптимизация реакции бромирования УК с использованием метода полного факторного эксперимента. Для поиска оптимальных условий получения смеси моно- и дибромпроизводных УК был составлен план оптимизации. Фиксированный фактор: количество УК. В качестве оптимизируемого параметра выступало соотношение УК и ее моно- и дибромпроизводных (УК/**157/158**), где вклад УК должен быть наименьшим. Факторы варьирования: время реакции, количество растворителя, количество брома,

количество бромоводородной кислоты, температура реакции. Методика синтеза с учетом оптимизированных параметров позволяет получать бромпроизводное **157** с выходом 76%. Реакция протекает при 28.8 °С в течении 3 суток с использованием почти двукратного избытка брома. В реакционной смеси также содержатся 5.3% УК и 18.3% дибромпроизводного.

Реакция бромирования УК в указанных условиях примечательна тем, что продуктов бромирования ацетильной группы в цикле С не наблюдалось. В соответствии с теоретическими представлениями о механизме бромирования, протекающего через образование енольной формы ацетильного фрагмента, формирование енола существенно затрудняется водородными связями. Известно⁷⁵, что все карбонильные группы УК участвуют в образовании внутримолекулярных водородных связей, самой прочной из которых является связь экзоциклической карбонильной группы цикла С, водородная связь карбонильной группы в цикле А менее прочна (рис. 24).

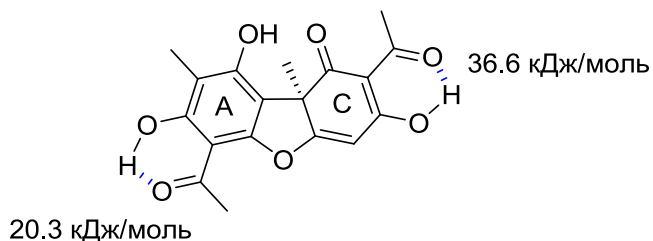


Рисунок 24. Сила внутримолекулярных водородных связей в молекуле усниновой кислоты.

По-видимому, сила водородных связей дифференцирует реакционную способность этих групп в реакции электрофильного бромирования. Формирование енола должно облегчаться разрушением водородной связи, например, при проведении реакции бромирования соединения **118**, гидроксильная группа которого при C⁷ модифицирована в метоксигруппу. Метилловый эфир **118** вводили в реакцию в вышеописанных условиях электрофильного бромирования. Соединение **118** показало существенно бóльшую активность в реакции бромирования, чем исходная УК. При мольном соотношении реагентов 1:1 реакция протекает в течение 20 минут при комнатной температуре. Образующийся продукт – соединение **159** – выделяется колоночной хроматографией с выходом 86% (схема 32).

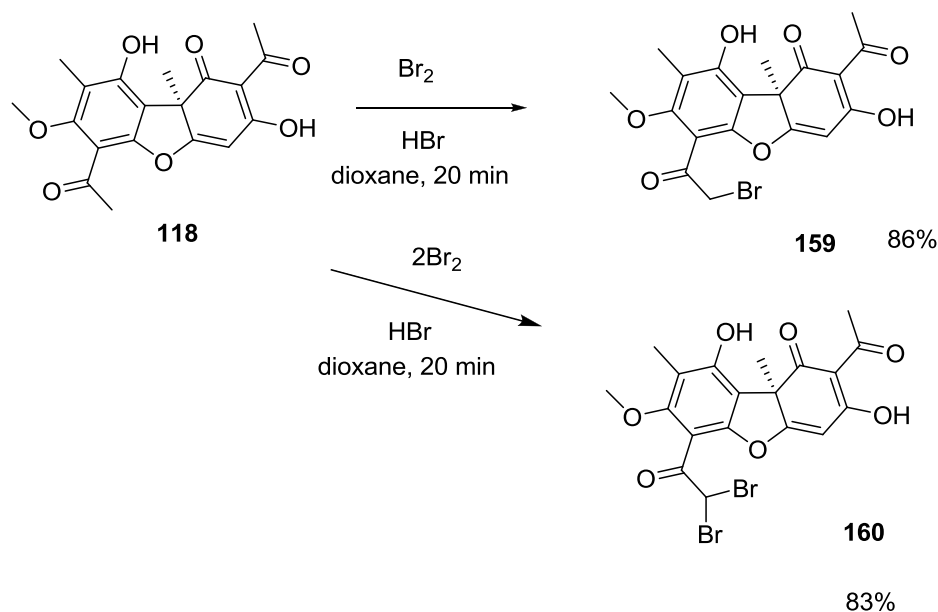


Схема 32. Бромирование соединения **118**.

В отличие от реакции бромирования УК взаимодействие соединения **118** с бромом протекает при полной его конверсии, а продукт монобромирования образуется селективно без примеси дибромпроизводного. Дибромпроизводное метилового эфира УК **160** было получено нами в аналогичных условиях при использовании двукратного количества брома с выходом 83%.

Таким образом, нами показано, что бромирование УК протекает по ацетильной группе в кольце А с образованием смеси моно- и дибромпроизводных УК. Проведена оптимизация реакции с использованием метода полного факторного эксперимента с целью повысить выход монобромпроизводного. Установлено, что направление бромирования определяется силой внутримолекулярных водородных связей, в реакцию вовлекается ацетильная группа в цикле А, водородная связь которой менее прочна. Разрушение этой связи через формирование метоксипроизводного УК существенно облегчает реакцию электрофильного бромирования по этой группе. Дозирование брома в реакции бромирования метилового эфира УК позволяет получать с высокими выходами соответствующие моно- и дибромпроизводные.

Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы нами в следующих публикациях: ²⁹⁸, ²⁹⁹.

3.9 Синтез новых соединений модификацией бромпроизводных усниновой кислоты.

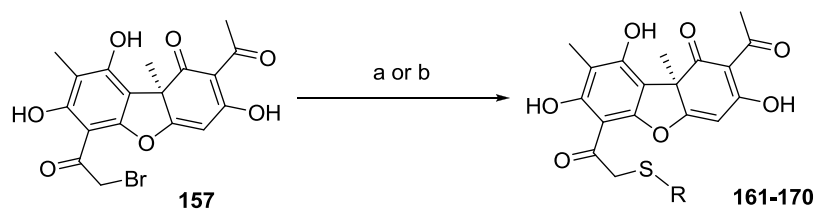
Бромпроизводные УК и её метилового эфира являются многообещающими синтонами для дальнейшей химической модификации. Известно, что α -фенацилбромиды довольно легко вступают в реакции нуклеофильного замещения с O-, N-, S-нуклеофилами. Такого типа реакции позволяют получать гибридные молекулы субстрата с различными фармакофорными фрагментами, сохраняя при этом неизменным структурный блок природного соединения.

3.9.1 Синтез серусодержащих производных усниновой кислоты и их модификация

3.9.1.1 Синтез тиоэфиров на основе усниновой кислоты

Бромпроизводные УК и её метилового эфира вводили в реакцию с некоторыми серуцентрированными нуклеофилами – тиолами ароматического, алифатического и гетероциклического рядов (схема 33). Для реакции были выбраны тиосоединения, содержащие различные фармакофорные фрагменты, введение которых направлено на получение новых потенциально биологически активных соединений. Кроме того, сульфидные соединения являются важными интермедиатами в органическом синтезе и могут быть использованы в качестве универсальных строительных блоков для различных химических целей, например, получение сульфонов и сульфоксидов.

Нами показано, что реакция бромпроизводного УК **157** с соответствующими тиолами в присутствии КОН протекает при комнатной температуре, с полной конверсией, с образованием в качестве основных продуктов соответствующих α -фенацилсульфидов **161-170** с выходами 16-93% (схема 33).



a) RSH / KOH, CH₃OH, 1-3 h for **161-168**
 b) RSNa, DMF for **169, 170**

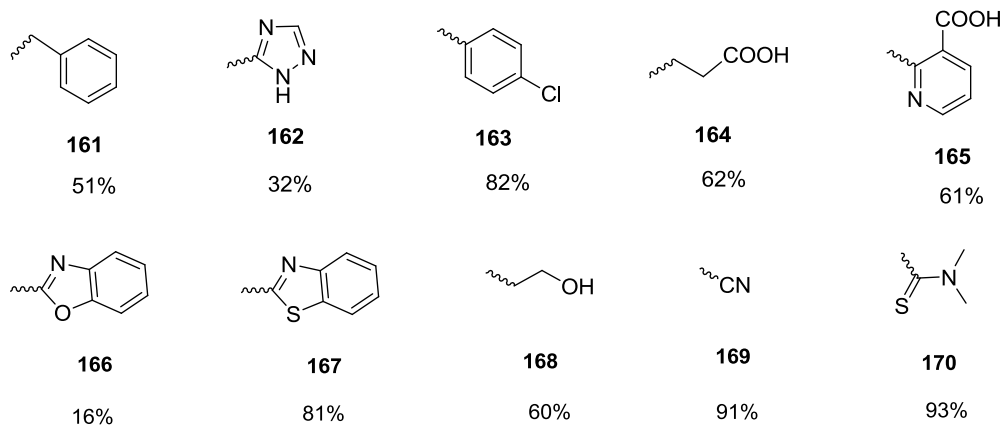


Схема 33. Синтез тиоэфирных производных из соединения **157**.

Гидролиз роданистого производного УК (соединение **169**) в кислых условиях даёт с выходом 37% производное **171** с новой функциональной группой - амидной, что может быть перспективно для дальнейших дериватизаций (схема 34).

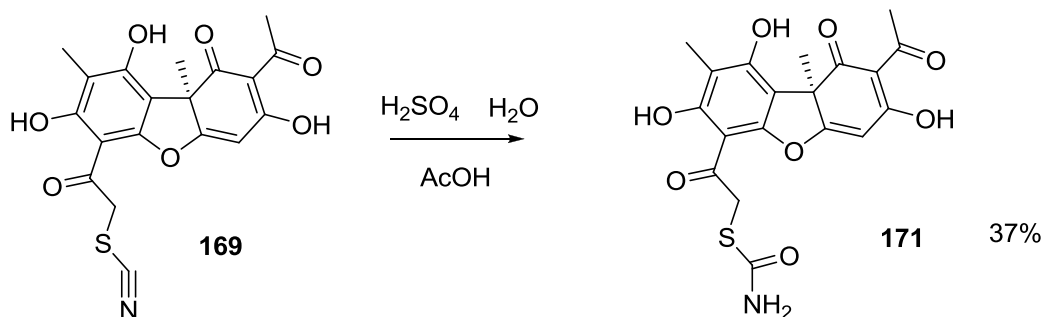


Схема 34. Гидролиз соединения **169**.

Структура амида установлена методами спектроскопии ЯМР и подтверждена данными рентгеноструктурного анализа (рис. 25)

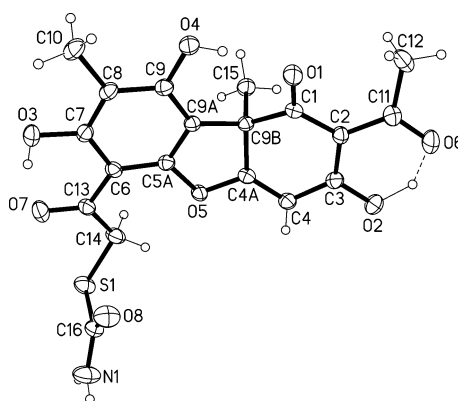


Рисунок 25. Строение молекулы соединения **151** в кристалле

Нуклеофильное замещение брома серуцентрированными нуклеофилами в молекуле дибромусниновой кислоты **158** также протекает легко, в реакцию вступают оба атома брома, что было продемонстрировано нами на примере реакции с роданидом натрия. Дизамещённое производное - соединение **172** - было получено реакцией дибромиды **158** с двумя молями роданистого натрия с выходом 87% (схема 35).

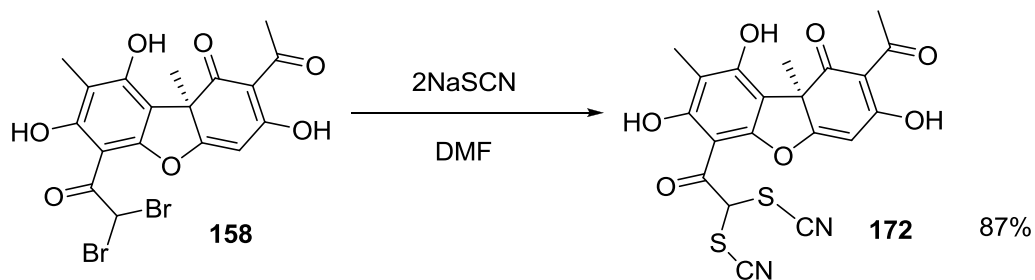


Схема 35. Реакция соединения **158** с роданидом натрия.

Аналогично бромпроизводному УК **157**, бромпроизводное её метилового эфира **159** также легко реагирует с тиолами. Тиопроизводные метилового эфира **173-184** (схема 36) выделены методом колоночной хроматографии с хорошими выходами (53-90%). α -Фенацилсульфиды на базе самой УК (соединения **161-170**) выделяются с меньшими выходами (16-82%). Значительные потери при хроматографическом выделении связаны, по-видимому, с внутри- и межмолекулярными перегруппировками, затрагивающими свободную 7-ую фенольную гидроксильную группу, протекающими на носителе для хроматографии.

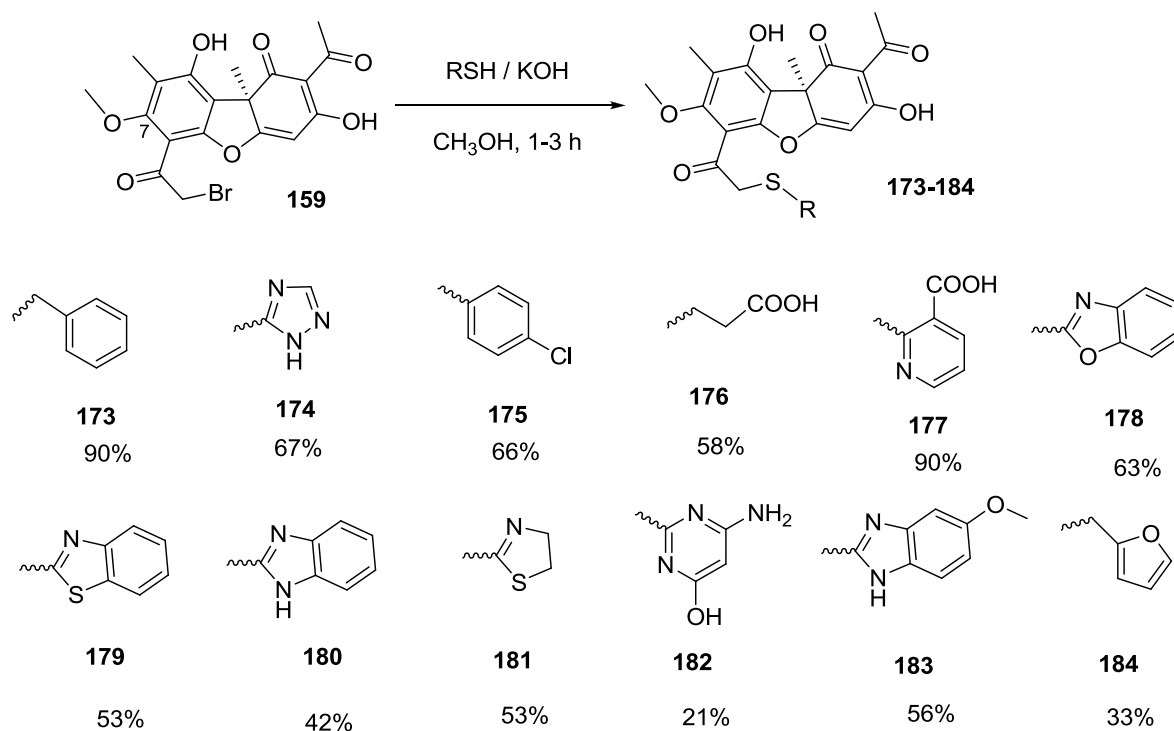


Схема 36. Синтез тиоэфирных производных из соединения **159**.

Таким образом, на основе бромпроизводных УК и её метилового эфира реакцией с тиолами нами был осуществлен синтез α -фенацилсульфидов. Наличие метоксигруппы в 7-ом положении существенно облегчает процесс выделения продуктов из реакционной смеси, приводя к более высоким выходам тиоэфирных производных УК.

3.9.1.2 Синтез сульфонов на основе усниновой кислоты

Распространенным методом окисления тиоэфиров до сульфонов является взаимодействие первых с надкислотами. Введение сульфогруппы в молекулу, как правило, сопровождается снижением токсичности и повышением растворимости в воде, что немаловажно для биологически активных соединений³⁰⁰. На основе условий реакции окисления тиогруппы в сульфогруппу, описанных в работе³⁰¹, разработана методика окисления тиоэфиров на основе УК до сульфонов путём взаимодействия первых с надкислотами. Сульфиды **173** и **175** были окислены избытком *мета*-хлорнадбензойной кислоты до соответствующих сульфонов **185** и **186** с выходами 52 и 50% соответственно (схема 37).

специально приготовленных растворителей, инертной атмосферы. В роли лигандов были использованы салицилальдимины, полученные на основе хиральных аминоспиртов. Окислитель – 30% перекись водорода. Реакции проводили при комнатной температуре. Перекись водорода в хлористом метиле в присутствии $\text{VO}(\text{AcAc})_2$ окисляет сульфиды **173** и **175** до смеси диастереомерных сульфоксидов **187** и **188** (схема 38) в соотношении 1:1 (по данным спектров ^1H ЯМР).

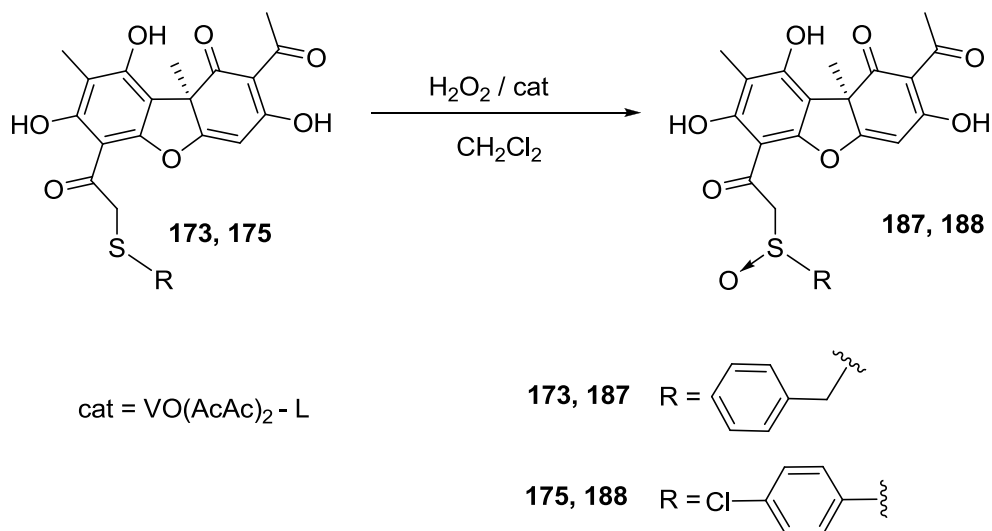


Схема 38. Синтез сульфоксидов **187** и **188**.

Для проведения хирального окисления использовались следующие лиганды (рис. 26): коммерчески доступный лиганд **189**, два подобных ему по строению лиганда **190** и **191** были синтезированы нами по методикам³⁰³ и ³⁰⁴ и отличаются между собой наличием или отсутствием объёмных заместителей в ароматическом кольце лиганда. Лиганд **192**, производное природного соединения α -пинена, ранее использовался для успешного хирального окисления соответствующего сульфида в эзомерпазол³⁰⁵ и был любезно предоставлен с.н.с., к.х.н. Хоменко Т.М.

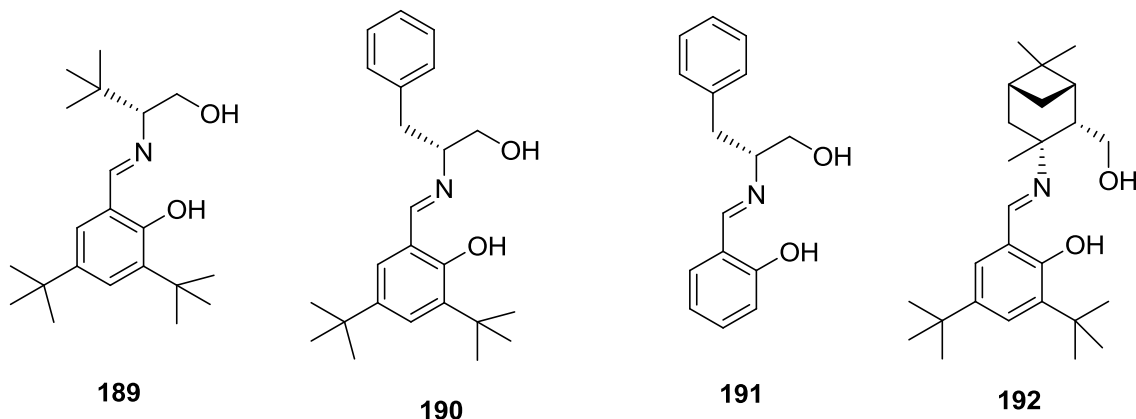


Рисунок 26. Структура лигандов, использовавшихся для хирального окисления тиоэфиров **173** и **175**.

В присутствии 1 моль % VO(AcAc)₂ и такого же количества хирального лиганда реакция окисления соединений **173** и **175** завершалась образованием сульфоксидов с различным диастереомерным избытком (*de*). Данные по этим экспериментам приведены в таблице 1.

| исходное соединение | лиганд | <i>de</i> , % | продукт |
|---|------------|---------------|------------|
| 173 | 189 | 14 | 187 |
| 175 | | 58 | 188 |
| 173 | 190 | 10 | 187 |
| 175 | | 50 | 188 |
| 173 | 191 | -10* | 187 |
| 175 | | 46 | 188 |
| 173 | 192 | 10 | 187 |
| 175 | | 5 | 188 |
| * в смеси преобладает другой диастереомер | | | |

Таблица 1. Диастереомерный избыток продуктов при хиральном сульфоксидировании тиоэфиров (+)-**173** и (+)-**175**.

Как видно из таблицы 1 реакция окисления соединения **175** с лигандами **189-191** приводит к продуктам с более высокими *de*, чем для **173**. По-видимому, это обусловлено тем, что атом серы в сульфиде **175** находится в стерически более затрудненном положении, чем в соединении **173**, что обеспечивает свободный подход окисляющего агента преимущественно с одной стороны молекулы. Наиболее высокие значения *de* получились для реакций с лигандом **189**. Из сравнения данных окисления обоих тиоэфиров с лигандами **190** и **191** можно также отметить, что отсутствие объёмных заместителей в ароматическом фрагменте лиганда оказывает незначительное влияние на стереохимию окисления соединения **175**, в большей степени влияет на окисление сульфида **173**, что в итоге приводит к преобладанию в смеси продуктов реакции другого диастереомера, что явно видно по спектрам ¹H ЯМР. В присутствии лиганда **192**, диастереомерный избыток в продуктах реакции оказался небольшим, но, что примечательно, в этом случае меньший *de* получился при окислении сульфида **175**, а не **173**.

Таким образом, энантиоселективным окислением прохиральных сульфидов на основе УК нами были синтезированы соответствующие сульфоксиды с использованием в качестве катализатора ванадил ацетилацетоната с рядом хиральных органических лигандов. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что на диастереомерную чистоту продуктов реакции окисления влияет в первую очередь структура окисляемого тиоэфира, а также структура лиганда, причём в большей мере влияет близость объёмного заместителя к иминной связи лиганда, чем наличие объёмных заместителей в его ароматическом цикле.

3.9.1.4 Синтез тиазолов на основе усниновой кислоты

Известно, что тиазольный цикл входит в состав многих биологически активных соединений (например, витамин В1) и лекарств с противомикробным действием (например, норсульфазол, фталазол), а также соединений обладающих противотуберкулезной активностью³⁰⁶. С целью получения производных УК, включающих в структуру тиазольный цикл, нами были проведена реакция бромпроизводного УК **157** с тиомочевинной. Реакция взаимодействия α -фенацилбромидов с тиомочевинной согласно литературным данным может осуществляться в гетерогенной или гомогенной среде в различных растворителях. После скрининга растворителей (этиловый спирт, метиловый спирт, абсолютный метиловый спирт, смесь хлористого метилена и метилового спирта, ацетонитрил, ДМСО, ТГФ, вода) нами было обнаружено, что с наибольшим выходом (52%) продукт **193** образуется при взаимодействии соединения **157** с небольшим избытком тиомочевинной при кипячении в воде в течение 2 часов (Схема 39).

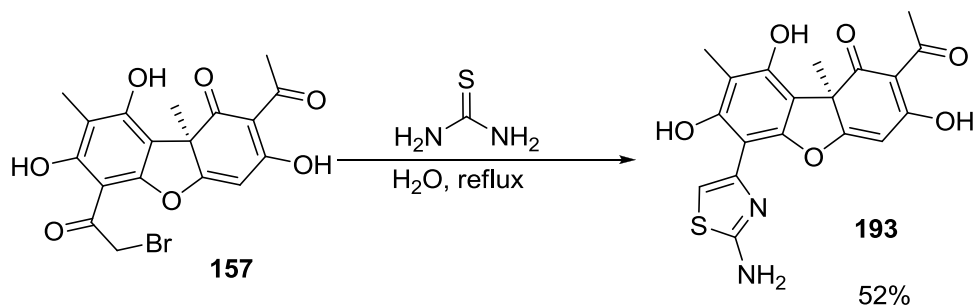


Схема 39. Реакция соединения **157** с тиомочевинной.

Строение соединений (+)-**193** и (-)-**193** было подтверждено данными РСА (рис. 27).

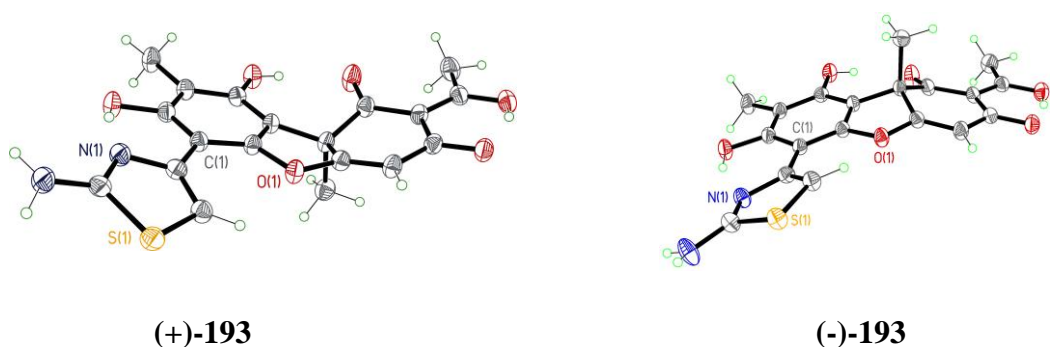


Рисунок 27. Строение молекул соединений (+)-**193** и (-)-**193** в кристаллах.

РСА синтезированного нами соединения (+)-**193** подтверждает *R*-конфигурацию ангулярной метильной группы в (+)-УК, что служит альтернативным доказательством соответствующего расположения этой метильной группы в УК, проблема установления стереохимии которой не полностью прояснена (см. литературный обзор, раздел 2.1). По

аналогичной схеме из (-)-УК нами было получено аминотиазольное производное (-)-**193**, по данным РСА анулярная метильная группа в нем имеет *S*-конфигурацию.

Бромпроизводное метилового эфира УК **159** также взаимодействует с тиомочевинной. Продукт реакции, аминотиазол **194** был получен с выходом 65% при кипячении бромпроизводного метилового эфира УК **159** с небольшим избытком тиомочевинной в течении 5 часов в ТГФ (схема 40).

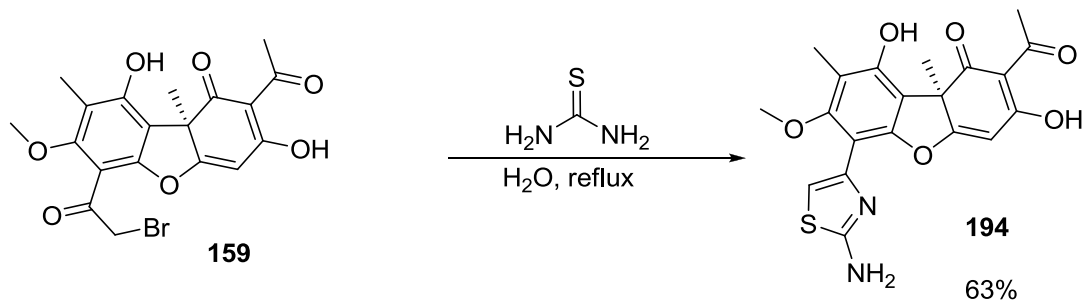


Схема 40. Реакция соединения **159** с тиомочевинной.

Оба энантиомера соединения **193** проявили высокую активность в отношении микобактерий *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. С целью поиска активных антимикобактериальных производных обоих энантиомеров УК нами были синтезированы другие тиазолсодержащие соединения **195-200** по реакции соединения **157** с соответствующими тиамидами и замещенными мочевиными (Схема 41). В отличие от реакции с тиомочевинной выходы соединений **195-200** выше при проведении реакции в спирте, а не в воде.

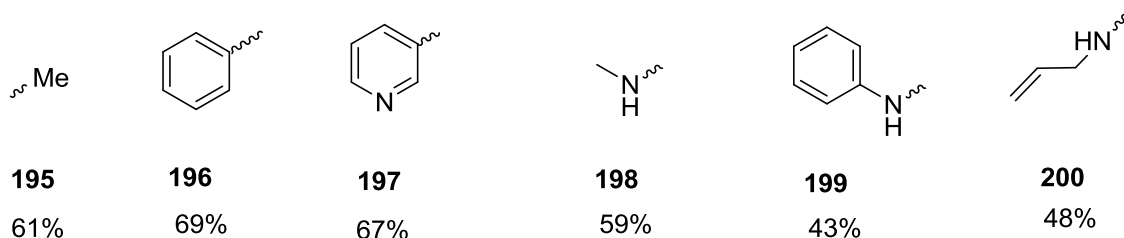
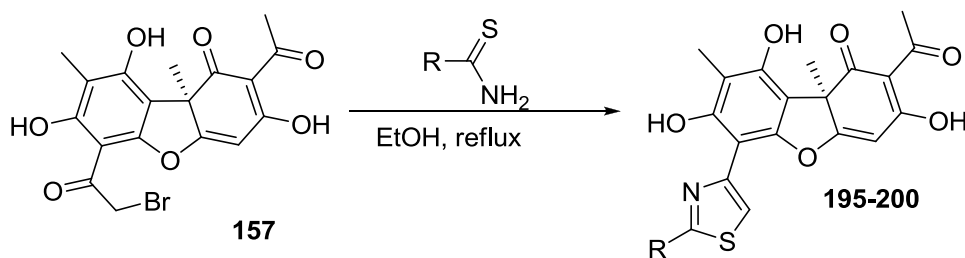


Схема 41. Реакция соединения **157** с тиамидами и замещёнными тиомочевинными.

Ещё один тип веществ, взаимодействие которых с α -фенацилбромидами приводит к формированию замещённого тиазольного цикла, тиосемикарбазоны альдегидов. Образующиеся в результате этой реакции тиазолы содержат 2-арилиденгидразинильный заместитель во 2-м положении. С использованием данного синтетического подхода для

бромпроизводного УК **157** и набора тиосемикарбазонов бензальдегидов мы получили соединения **201-209** (Схема 42). Соответствующие тиосемикарбазоны, содержащие различные заместители в цикле, были получены нами по известной методике³⁰⁷ и, в дальнейшем, вводились в реакцию с соединением **157**. Соединения **201-209** были получены с выходами от 66% до 95% при кипячении в течение 0.5-1 часа в этиловом спирте.

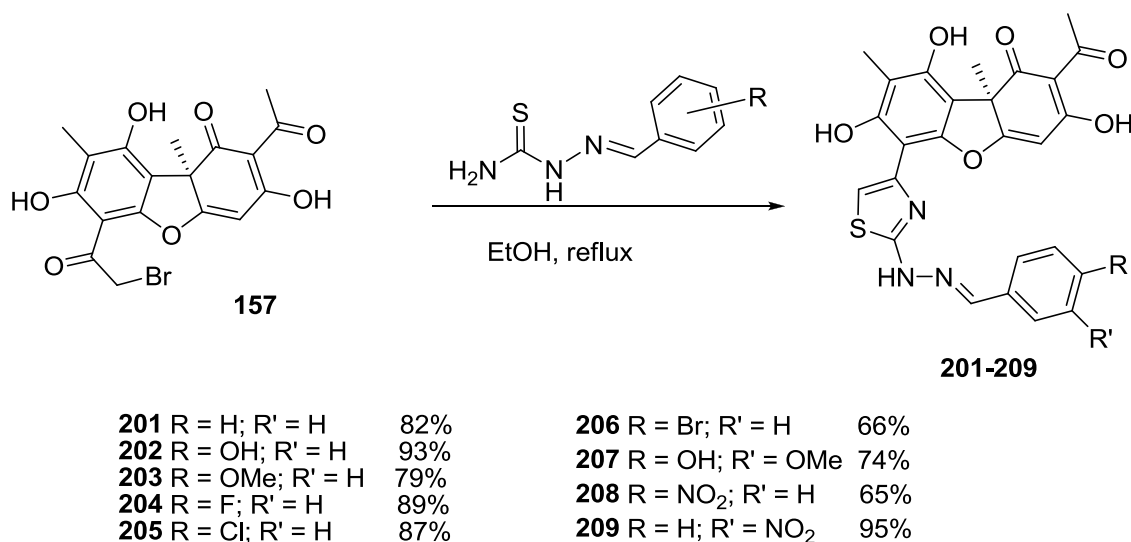


Схема 42. Реакция соединения **157** с замещёнными тиосемикарбазидами.

Альтернативный путь формирования тиазольного цикла был использован нами для получения соединения **210**. Синтетическая трансформация тиоэфира **169** под действием газообразного HCl приводит к образованию хлорзамещённого тиазола **210** (схема 43).

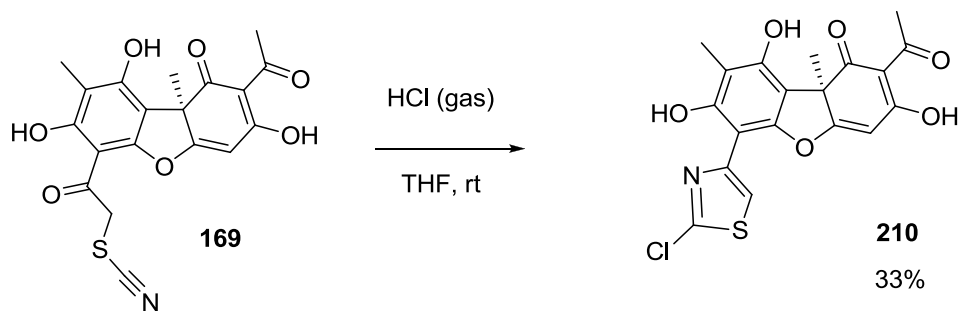


Схема 43. Синтез соединения **210**.

Из-за sp гибридации атома углерода, находящегося в тиоцианате, неподеленная электронная пара атома азота не может атаковать атом углерода карбонильной группы. Поэтому первой стадией, скорее всего, является присоединение хлороводорода по нитрильной группе тиоцианата (схема 44). Вследствие изменения геометрии группы у неподеленной электронной пары атома азота появляется возможность атаки по карбонильному атому углерода. Далее происходят протонирование гидроксигруппы и ароматизация тиазольного цикла. Что приводит к образованию искомого хлорзамещённого тиазола.

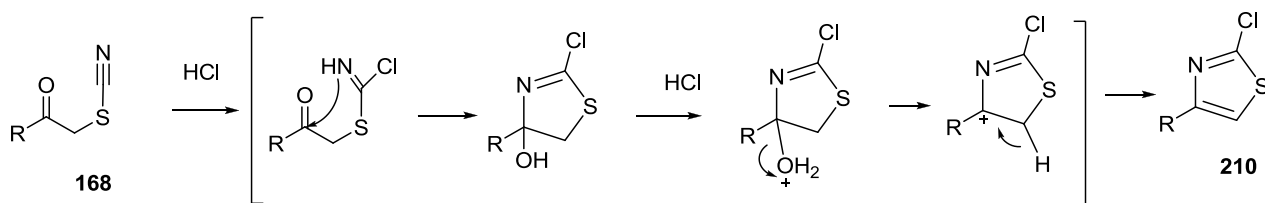


Схема 44. Предполагаемый механизм образования соединения **210**.

В результате проведённых исследований, реакцией бромпроизводных УК и её метилового эфира с тиомочевинами, тиоамидами и тиосемикарбазонами нами синтезировано более 20 новых производных УК, содержащих тиазольный цикл.

3.9.2 Синтез кислородсодержащих производных усниновой кислоты

Типичными кислородными нуклеофилами являются гидроксид-ион (OH^-), алкоксиды (RO^-), спирты (ROH) и вода (H_2O). Кислородцентрированные нуклеофилы в сравнении с серуцентрированными слабые нуклеофилы. Кроме того, они являются сильными основаниями, а в присутствии основания в бромпроизводном УК **157** генерируется внутренний близкорасположенный кислородцентрированный нуклеофильный центр, который конкурирует с внешним, к тому же, как правило, более слабым, кислородцентрированным нуклеофилом. Поэтому в основных условиях преимущественно протекает внутримолекулярная реакция и при взаимодействии бромпроизводного УК **157** с такими основаниями как щёлочи и ацетат калия образуется с высоким выходом (90%) фураноновое производное **211** (схема 45).

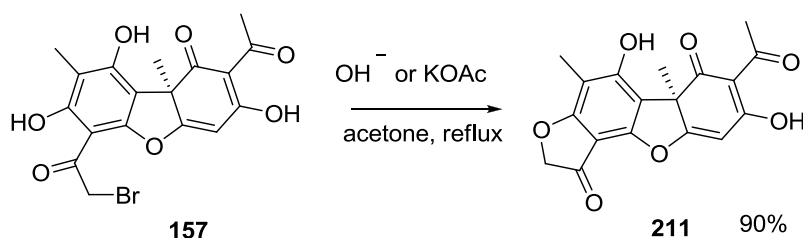


Схема 45. Синтез соединения **211**.

По данным авторов работы³⁰⁸ образование 2-ацетокси-2'-гидроксиацетофенона из α -фенацилбромида в реакции с ацетатом калия возможно при варьировании pH среды. Действительно, проведение реакции в условиях, предложенных авторами этой работы, а именно в среде ацетон/уксусная кислота (4:1) при комнатной температуре привело к образованию ацетоксипроизводного **212** в смеси с соединением **211**. Однако, выход соединения **212** составил всего 20% (Схема 46).

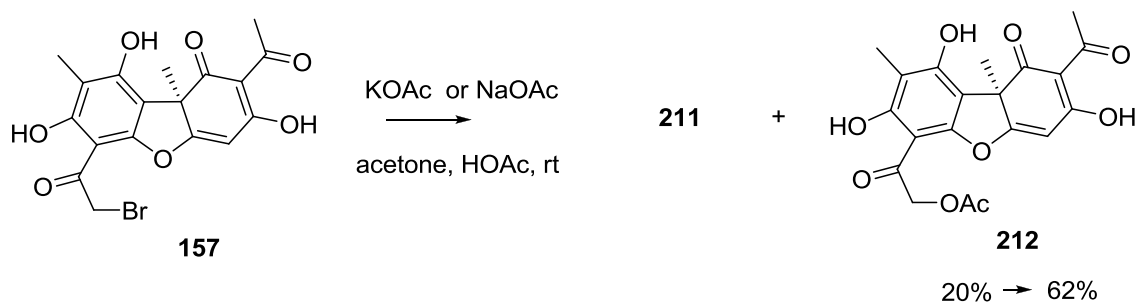


Схема 46. Синтез соединения **212**.

Изменяя соотношение ацетон/уксусная кислота до 1:1 и используя вместо ацетата калия ацетата натрия, нам удалось повысить выход ацетоксипроизводного **212** до 62%. Исходя из ацетоксипроизводного **212**, нами разработаны методы получения некоторых кислородсодержащих производных УК. Формирование гидроксильной группы в α -положении феноцильного фрагмента УК (спирт **213**) происходит при омылении ацетата **211** щелочью в метаноле при охлаждении до $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (схема 47).

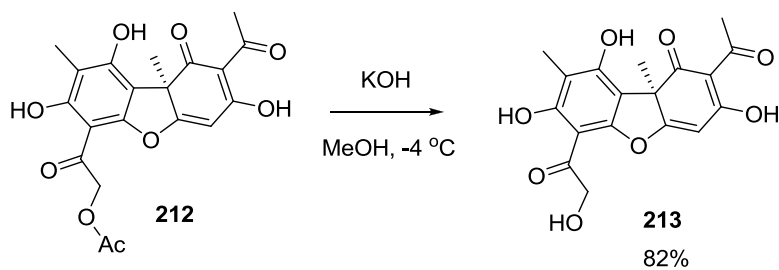


Схема 47. Гидролиз соединения **212** в низкотемпературных условиях.

Повышение температуры реакции до комнатной приводит к образованию соединения **214a,b** с гидроксизамещённым фураноновым циклом с выходом 82 % (схема 48).

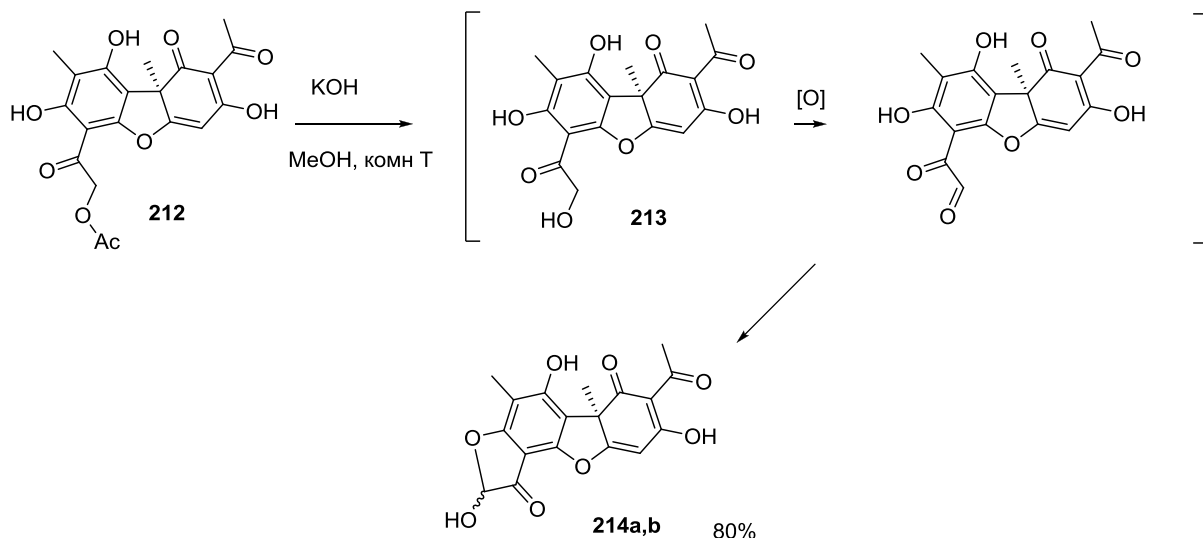


Схема 48. Гидролиз соединения **212** при комнатной температуре.

Образование соединения **214a,b** происходит, по-видимому, в результате окисления кетоспирта **213** под действием присутствующего в щелочном растворе кислорода воздуха. Примеры таких реакций описаны в литературе³⁰⁹. Промежуточный альдегидоспирт

взаимодействует с гидроксигруппой при C^7 с образованием диастереомерной смеси полуацеталей **214a,b** с общим выходом 80%.

Реакцию замещения брома кислородцентрированным нуклеофилом удалось осуществить на основе бромпроизводного метилового эфира УК **159**, возможность внутримолекулярной реакции с гидроксигруппой при C^7 в котором заблокирована. В результате реакции соединения **159** с фенолом, протекающей при кипячении реагентов в ацетонитриле в присутствии K_2CO_3 , с выходом 20% образуется соединение **215** (схема 49).

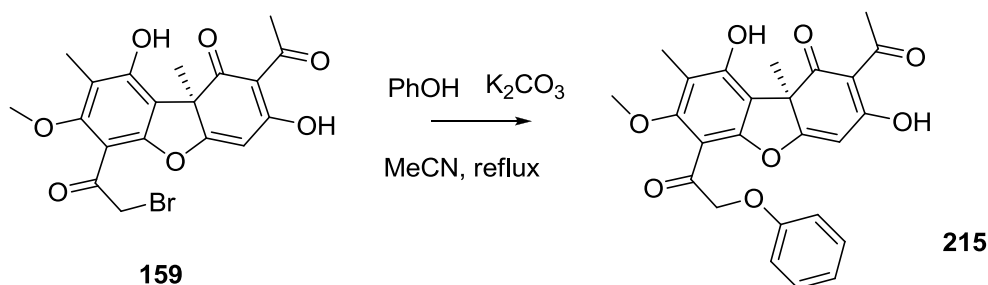


Схема 49. Синтез соединения **215**.

При наличии двух атомов брома (соединение **160**) протекает замещение их обоих фенолят-анионом с образованием соединения **216** (схема 50), однако, также в реакционной смеси в сравнимых количествах присутствует соединение **215**, образование которого происходит, по-видимому, из монобромпроизводного **159**, образующегося в реакционной среде из дибромпроизводного УК **160** в результате бромфильной реакции³¹⁰.

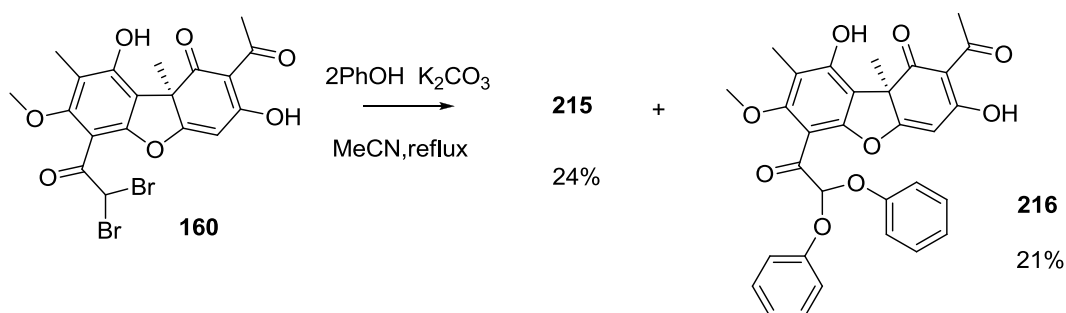
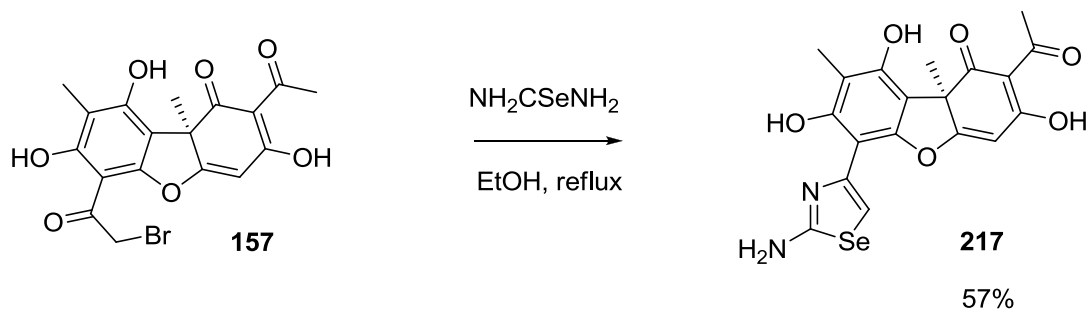


Схема 50. Синтез соединения **216**.

Из приведённых данных можно заключить, что нуклеофильное замещение атома брома в бромпроизводном УК кислородцентрированными нуклеофилами протекает, как правило, по пути внутримолекулярного нуклеофильного замещения, что не позволяет вводить новые фрагменты в молекулу. При использовании бромпроизводного метилового эфира УК возможность внутримолекулярной циклизации отсутствует, что позволяет получить новые моно- и дизамещённые производные УК реакцией нуклеофильного замещения одного или двух атомов брома кислород-центрированными нуклеофилами.

3.9.3 Синтез азот-, углерод-, селен-содержащих производных усниновой кислоты

Замещение атома брома селеносодержащими соединениями происходит аналогично замещению серусодержащими нуклеофилами. Реакция с селеномочевинной бромпроизводного УК **157** приводит к образованию соединений **217**, содержащих селеноазольный цикл (схема 51). Использовались условия, подобранные для реакции с тиомочевинной, выход селеноазолов на основе как (+)-, так (-)-УК составил 57%, что сравнимо с выходом аминотиазолов **157** (52%).

Схема 51. Синтез соединения **217**.

Структура обоих соединений подтверждена рентгеноструктурным анализом (рис. 28).

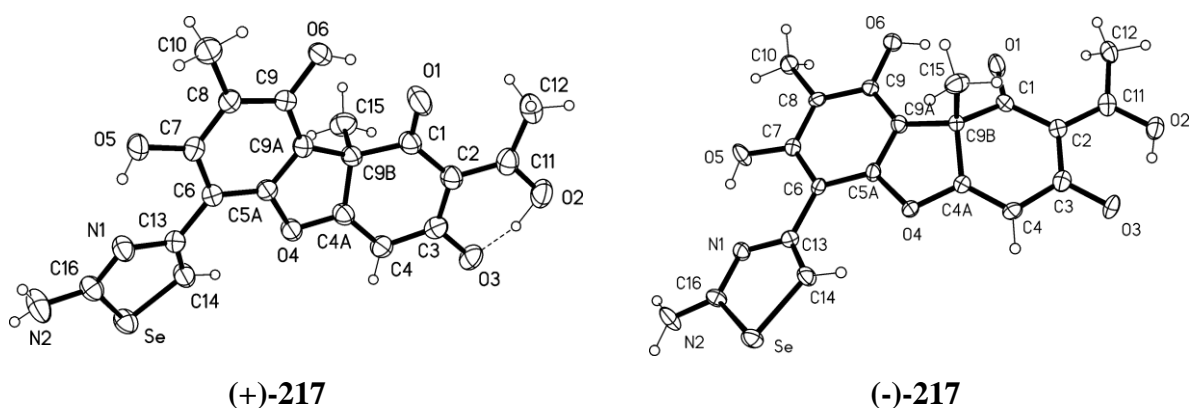


Рисунок 28. Молекулярная структура **217** и его энантиомера (тепловые эллипсоиды даны с вероятностью 30%).

С неожиданными трудностями мы столкнулись при попытке провести реакции нуклеофильного замещения брома в производных **157** и **159** азотцентрированными нуклеофилами. Первичные амины реагируют также с карбонильными группами УК (см. глава 3.2.1), вторичные и третичные амины в первую очередь являются основаниями, а неустойчивость УК и её производных в основных условиях неоднократно наблюдалась и нами и рядом других авторов⁴. Нами установлено, что реакция бромпроизводных и УК **157** и её метилового эфира **159** с соединениями, содержащими аминогруппу, протекает быстро и неселективно с образованием сложной смеси продуктов. Одним из основных продуктов при

реакции бромпроизводного УК **157** с основаниями, например, триэтиламин, является, как и ожидалось, продукт внутримолекулярной циклизации, характерной для α -гидроксифенацилбромидов, фураноное производное **211** (схема 45).

Образование целевых продуктов замещения в реакционной смеси зафиксировано нами методом ЯМР, однако, образующиеся соединения нестабильны и быстро разрушаются, образуя сложную смесь продуктов. Не удалось также получить продукты замещения атома брома азотцентрированными нуклеофилами для бромпроизводного метилового эфира УК **159**. Возможность внутримолекулярной циклизации в этом соединении отсутствует, и, следовательно, путь, ведущий к фураноновому производному **211** заблокирован, однако, как правило, в результате реакции также образуются сложные смеси продуктов. Единственным исключением стала реакция бромпроизводного метилового эфира УК **159** с фталымидом калия, ведущая к производному УК **218** (схема 52).

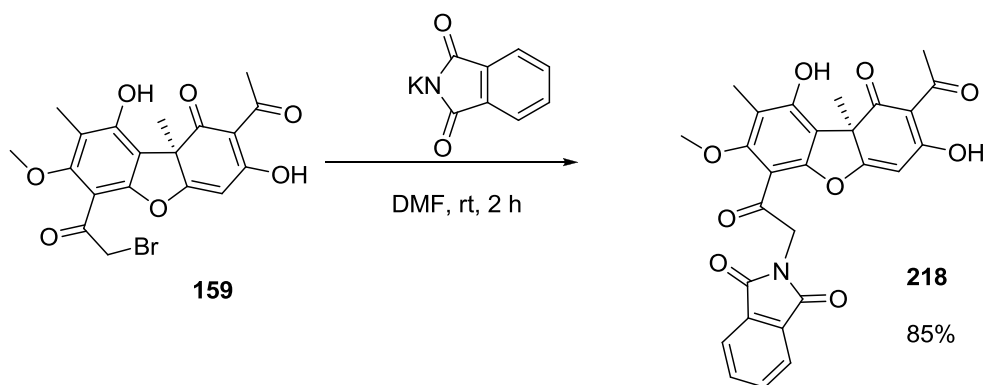


Схема 52. Синтез соединения **218**.

Заметно эффективнее протекает реакция нуклеофильного замещения атома брома с углерод-центрированными нуклеофилами. Бромпроизводное УК **157** даёт в этой реакции ожидаемо продукт внутримолекулярной циклизации – фуранон **211** (схема 45). Зато бромпроизводное метилового эфира УК **159** при взаимодействии с такими активированными С-Н соединениями, как малондинитрил и цианоуксусный эфир, даёт соответствующие продукты реакции, соединения **219** и **220a,b**, с умеренными выходами (схема 53). Реакция протекает при комнатной температуре, активация С-Н компоненты проводилась гидридом натрия. Реакция с этилцианоацетатом протекает нестереоселективно, диастереомерные продукты **220a,b** образуются в соотношении 1:1 по данным ЯМР ^1H .

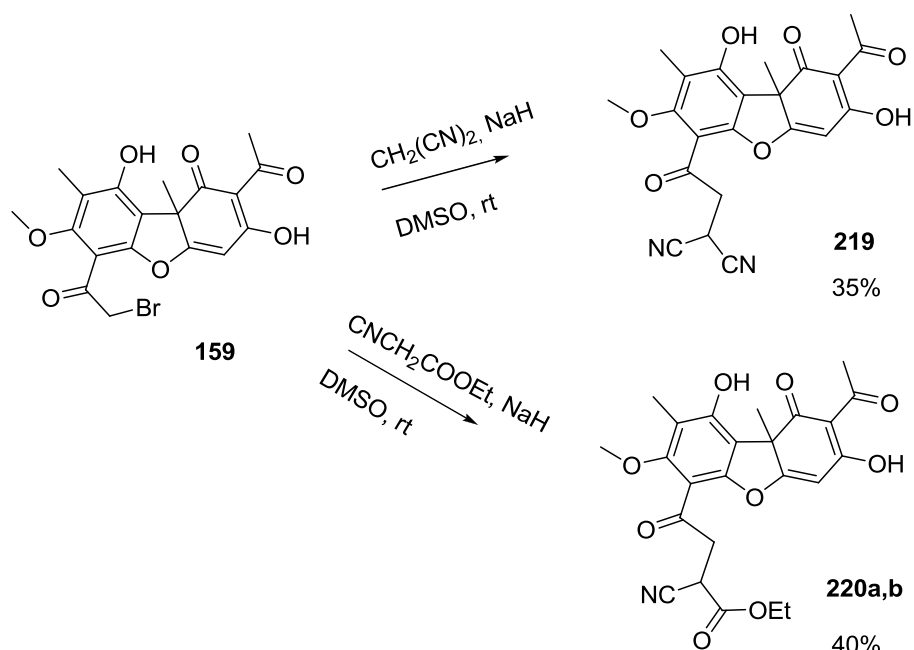


Схема 53. Синтез соединений **219** и **220a,b**.

В результате проведённых исследований можно отметить, что нуклеофильное замещения атома брома в УК протекает легко под действием серу- и селен-центрированных нуклеофилов. Замещаются как один, так и два атома брома в мягких условиях. Кислород-, азот- и углерод-центрированные нуклеофилы при взаимодействии с бромпроизводным УК не дают в результате продуктов замещения, поскольку преобладает конкурирующая реакция замещения внутренним нуклеофилом, формирующимся в основных условиях реакции (фенолят-анион при С-7), ведущая к образованию фуранонового производного. Реакцию замещения удаётся провести кислород- и углерод-центрированными нуклеофилами для бромпроизводного метилового эфира УК, в котором заблокирована возможность внутримолекулярной циклизации. Получены продукты замещения как одного, так и двух атомов брома.

Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы нами в следующих публикациях: ^{298, 299, 311}.

3.10 Цианэтилирование усниновой кислоты и её производных

Реакция цианэтилирования является частным случаем реакции Михаэля и представляет собой замещение атома водорода на цианэтильную группу действием нитрила акриловой кислоты (акрилонитрила) на вещества, обладающие подвижным атомом водорода. Особенно легко реагируют с акрилонитрилом галоидоводороды, амины, спирты, соединения типа малонового эфира. Реакцию с акрилонитрилом отличает особенная лёгкость протекания, в неё вступают даже те соединения, чьи нуклеофильные свойства малы по отношению к другим ненасыщенным системам. Препаративное значение цианэтилирования состоит в том, что в результате этой реакции присоединяются сразу три атома углерода, причем концевая нитрильная группа предоставляет широкие возможности для дальнейшего синтеза различных производных карбоновых кислот, кетонов, альдегидов, аминов и других соединений.

В молекуле УК присутствуют три гидроксильных группы, две фенольных и одна енольная, которые могли бы вступать в реакцию. Нами установлено, что гидроксильные группы УК не вступает в реакцию цианэтилирования в стандартных для спиртов условиях этой реакции (диоксан, щёлочь, комнатная температура). Повышение температуры реакции и времени контакта с щёлочью приводило к деструкции УК - факту известному из литературных данных⁴. Модификация условий реакции, которая ранее позволила нам успешно вовлекать в реакцию алкилирования фенольный гидроксил при 7-ом атоме углерода УК, дала результаты и в случае реакции с акрилонитрилом. Проведение реакции в ДМФА при повышенной температуре при использовании в качестве основания K_2CO_3 привело к образованию продукта реакции. Несколько неожиданно оказалось, что реакция протекает по пути С-алкилирования с присоединением сразу двух молекул акрилонитрила и образованием соединения **221** с 88%-ным выходом (схема 54). В реакцию вовлекается лишь ацильный фрагмент в цикле А УК, что подтверждается слабопольным сдвигом сигналов протонов и углеродов этой группы в соответствующих спектрах ЯМР.

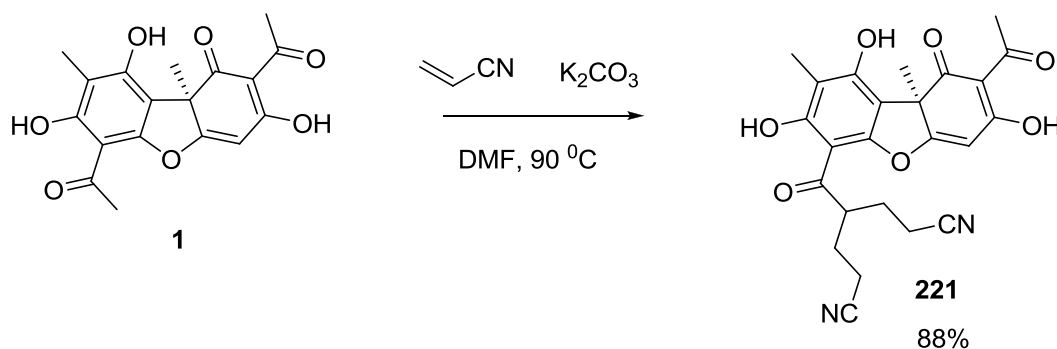


Схема 54. Реакция цианэтилирования усниновой кислоты

Кроме того, цианэтилирование пиразольного производного УК **35**, в котором отсутствует ацильный фрагмент в цикле С, как оказалось, также приводит к продукту С-алкилирования двумя молекулами акрилонитрила. Реакция цианэтилирования соединения **35**, однако, протекает менее эффективно, при проведении реакции в тех же условиях, выход цианэтильного производного **222** составил всего 30%. Нами был предложен альтернативный вариант синтеза соединения **221** по реакции цианэтильного производного УК **221** с фенилгидразином, суммарный выход этой реакции составил 62% (схема 55).

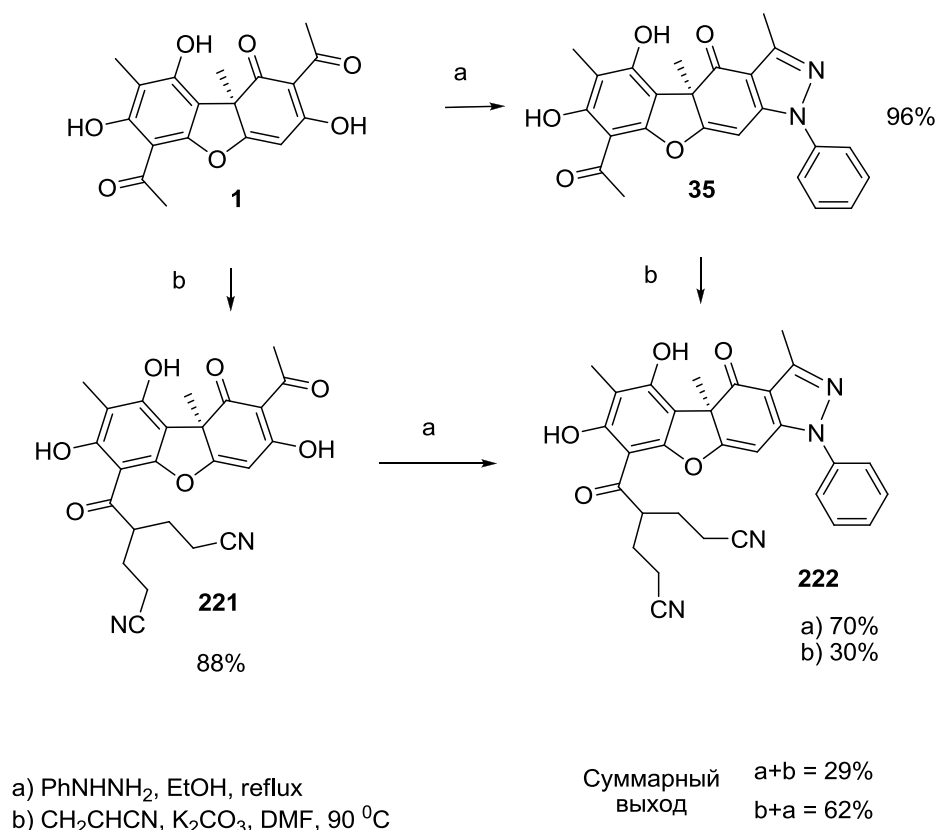


Схема 55. Синтез соединения **222**.

Ранее нами было синтезировано производное УК **211**, обладающее подвижными атомами водорода при углероде в фураноновом фрагменте (схема 45). Установлено, что цианэтилирование соединения **211** осуществляется в условиях реакции, стандартных для цианэтилирования (диоксан, щёлочь, комнатная температура), продукт присоединения двух молекул акрилонитрила **223** (схема 56) образуется с выходом 30%, при этом требуется значительный избыток акрилонитрила и продолжительное время реакции (24 часа). Однако, использование системы ДМФА-К₂СО₃ позволяет получить это соединение с существенно более высоким выходом (91%) при проведении реакции при температуре 40 °С в течение 1 часа.

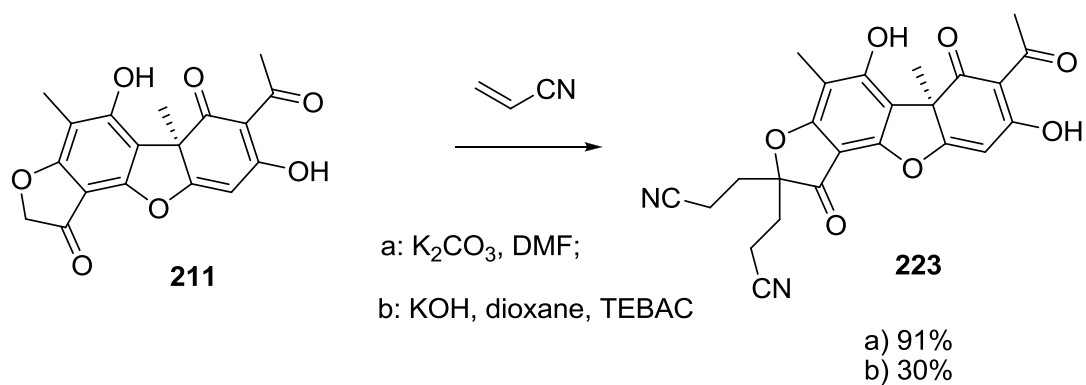


Схема 56. Реакция цианэтилирования соединения **211**.

Таким образом, нами разработан эффективный метод цианэтилирования УК, показано, что реакция идёт селективно по пути С-алкилирования в одной из двух ацильных групп. На основе УК и её производных синтезированы новые соединения, содержащие по два цианэтильных фрагмента.

Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы нами в публикации³¹².

3.11 Синтез флавоноидов на основе усниновой кислоты

Флавоноиды — это крупнейший класс растительных полифенолов. С химической точки зрения, флавоноиды представляют собой гидроксипроизводные флавона (собственно флавоноиды), 2,3-дигидрофлавона (флаваноны) изофлавона (изофлавоноиды), 4-фенилкумарина (неофлавоноиды), а также флавоны с восстановленной карбонильной группой (флаванолы). К флавоноидам относят также другие соединения С6-С3-С6 ряда, в которых имеются два бензольных ядра, соединенных друг с другом трехуглеродным фрагментом — халконы, дигидрохалконы и ауроны.

Интерес к натуральным и синтетическим флавоноидам постоянно растет, чему в немалой степени способствуют их антиоксидантная активность и связанная с ней способность метаболитов этого класса действовать в качестве агентов, предотвращающих или тормозящих образование опухолей, укрепляющих кровеносные сосуды, защищающих печень и желудочно-кишечный тракт³¹³. Особое внимание уделяется изучению взаимосвязи структура-активность, в связи с чем введение в структуру флавоноида фрагмента УК, изначально обладающей нативной биологической активностью, является перспективным.

Поскольку с синтетической и биосинтетической точки зрения халконы являются предшественниками других классов флавоноидов, на первом этапе нами был осуществлен синтез халконов на базе остова УК. Затем проведены исследования возможных дальнейших превращений полученных ранее халконов, а также поиск методов синтеза новых флавоноидных соединений, включающих остов УК.

3.11.1 Синтез халконов на основе усниновой кислоты

Халконы (1,3-диарил-1-пропен-3-оны) представляют собой группу открытоцепных флавоноидов, которые широко распространены в природе. Халконы обладают антибактериальными, противогрибковыми, противораковыми, противовоспалительными свойствами и рядом других ценных биологических свойств. Доступным и распространенным способом получения халконов, содержащих различные заместители, является конденсация замещенных бензальдегидов и ацетофенонов, осуществляемая в различных каталитических вариантах. В структуре УК присутствует ацетофеноновый фрагмент, который может использоваться в качестве исходного строительного блока для построения на ее базе халконов. Несмотря на имеющиеся предпосылки, в настоящее время в литературе отсутствуют данные по синтетическим трансформациям УК с целью получения халконов.

Нами были предприняты попытки ввести УК в конденсацию с бензальдегидами в наиболее распространенных условиях получения халконов. Однако использование в качестве катализаторов H_2SO_4 или K_2CO_3 не привело к искомому взаимодействию, а при катализе сильной щелочью (KOH) наблюдалась деструкция исходной УК. Деструкция УК под действием щелочи известна из работы⁷, в которой показано, что первоначально расщепление протекает по циклу С. По-видимому, для успешного протекания превращений УК в условиях основного катализа требуется модификация этого кольца, направленная на его стабилизацию. Однако, попытка ввести в конденсацию с бензальдегидом пиразольные производные УК **35** и **125** (схема 9) в условиях основного катализа привела также к деструкции субстрата, а в условиях кислотного катализа наблюдалось отсутствие взаимодействия. Очевидно, что реакции конденсации в основных условиях может препятствовать возможность формирования в этих условиях фенолят-аниона в паре-положении к вступающей в реакцию ацетильной группе резорцинового фрагмента УК и соединений **35** и **125**. Однако, введение в реакцию соединения **117** (рис. 20) с защитными Вос группами на фенольных гидроксилах в основных условиях также не приводит к желаемому взаимодействию.

Одно из полученных нами ранее соединений с метильным заместителем при фенольной гидроксильной группе в положении 9, соединение **122**, вступает в реакцию альдольно-кетоновой конденсации. В результате конденсации соединения **122** с бензальдегидом и с *n*-хлорбензальдегидом, осуществляемой в метаноле в присутствии водного KOH, были получены халконы **224** и **225** с небольшими выходами при полной конверсии субстрата (схема 57).

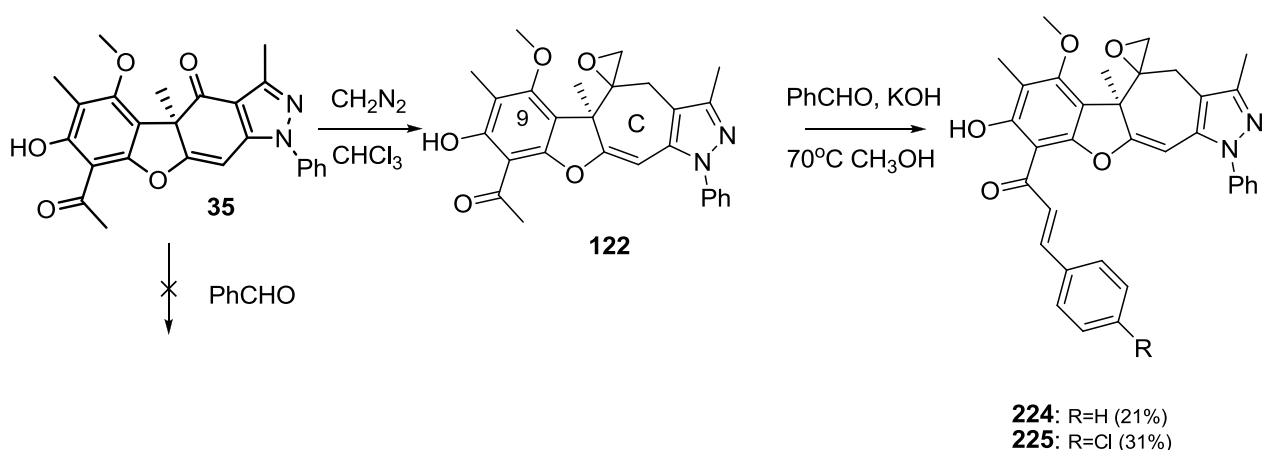


Схема 57. Взаимодействие соединения **122** с замещёнными бензальдегидами.

Возможно, на небольшой выход и значительную степень осмоления влияют структурные изменения, внесённые в соединение **122** при взаимодействии пиразола **35** с диазометаном, в первую очередь наличие экзоциклического оксиранового фрагмента. Более подходящим субстратом для реакции конденсации с бензальдегидами представляется

соединение **126**, в структуре которого наряду с «закрытым» фенольным гидроксиллом отсутствует реакционноспособный оксирановый фрагмент в кольце С. В результате проведения реакции конденсации соединения **126** с замещёнными бензальдегидами, проводимой в метаноле в присутствии водного раствора КОН, нами был получен ряд соединений **226-239**, являющихся целевыми продуктами – халконами (схема 58).

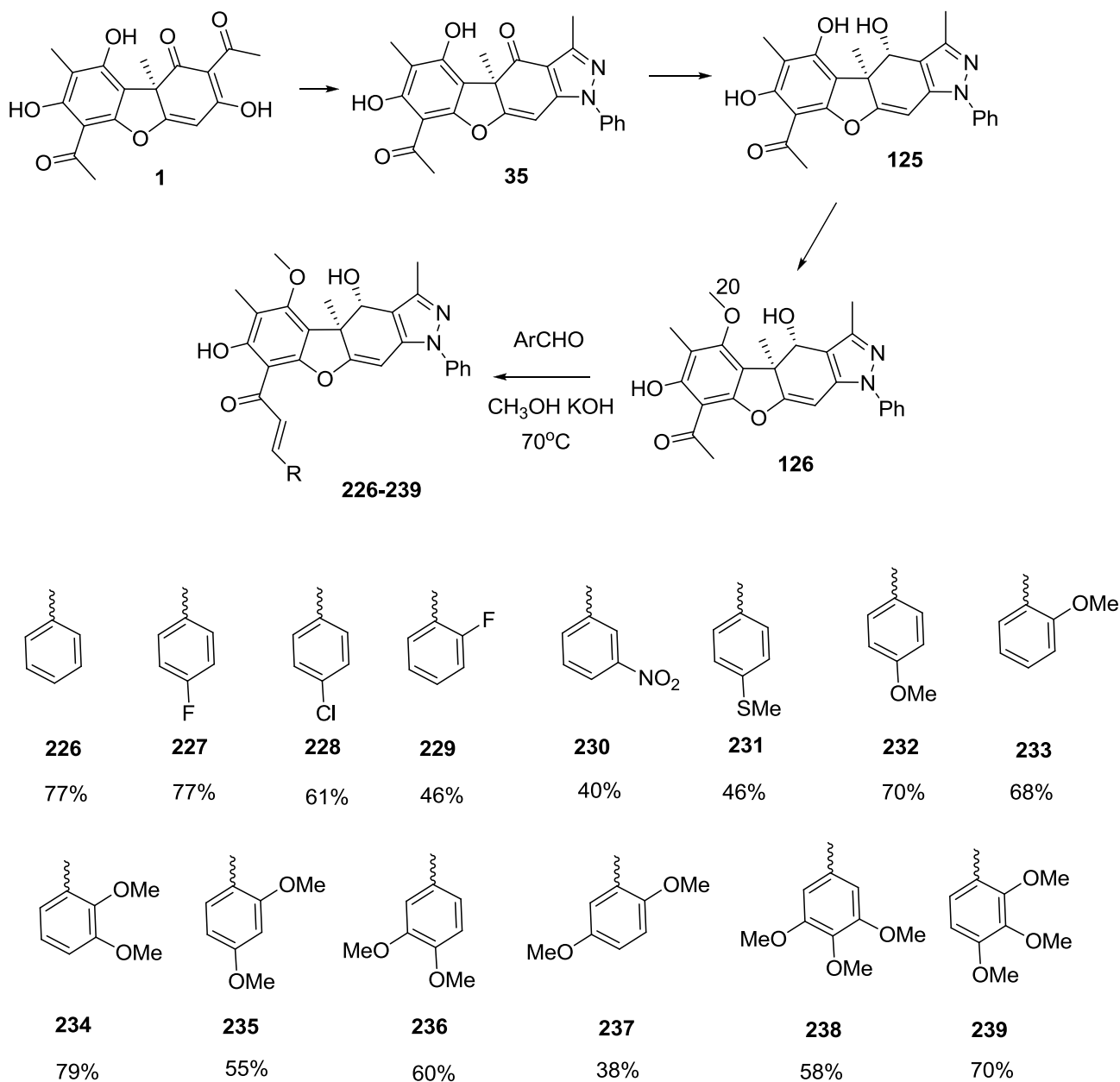


Схема 58. Синтез соединений **226-239**.

Реакции конденсации проводили в течение 2,5-3 часов с четырехкратным избытком бензальдегидов при 70°C в метанольном растворе в присутствии водного КОН. По разработанной схеме на основе (+)- и (-)-УК синтезирована библиотека метоксизамещённых халконов для выявления взаимосвязи «структура-активность» в отношении вируса гриппа (обсуждение см. гл 4.4).

Таким образом, нами разработан и осуществлен четырёхстадийный синтез на базе остова УК соединений, содержащих структурный фрагмент халконов.

3.11.2 Синтез дигидрофлавонолов, флавонолов и флаванонов на основе усниновой кислоты

Известно, что образование халконов это общий этап в биосинтезе флавоноидов. С синтетической точки зрения халконы так же являются предшественниками флавоноидов. Мы провели исследование возможностей синтеза из полученных нами ранее халконов новых флавоноидных соединений, включающих остов УК.

Как известно, при действии перекиси водорода в присутствии щелочи халконы образуют эпоксиды по двойной связи, при этом эпоксиды 2-гидроксихалконов неустойчивы и легко превращаются в результате внутримолекулярной циклизации в дигидрофлавонолы. И действительно, при обработке соединения **232** перекисью водорода в присутствии водной щелочи в метаноле была получена смесь соединений **240a,b** и **241** (общий выход около 80%, соотношение варьируется в зависимости от условий реакции), относящихся по своей структуре к дигидрофлавонолам и флавонолам соответственно (схема 59).

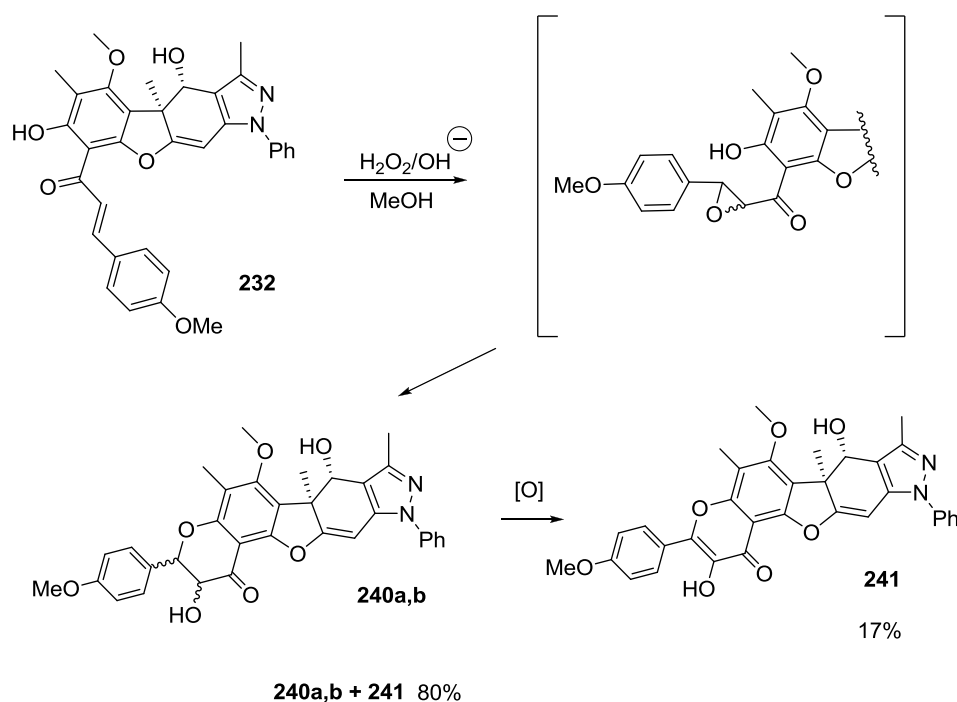


Схема 59. Окисление соединения **232** перекисью водорода в щелочной среде.

Соединение **240** образуется в виде смеси *транс*-диастереомеров (расположение заместителей установлено по значениям КССВ, основываясь на литературных данных³¹³) в соотношении 1:1 по спектру ЯМР-¹H. Как известно³¹⁴, в щелочной среде протекает дегидрирование и окисление кислородом воздуха дигидрофлаванолов с образованием

флаванолов. Флавонол **241** образуется, по-видимому, в результате такой реакции из соединения **240**.

Действие другого эпоксилирующего окислителя – *t*-BuOOH – на соединение **232** не привело к образованию продуктов циклизации, окислению подверглась лишь гидроксильная группа в цикле С (Схема 60). Продукт **242** выделен с выходом 67%. Аналогично, из халькона **234** получено соединение **243**, с иным расположением метокси-групп.

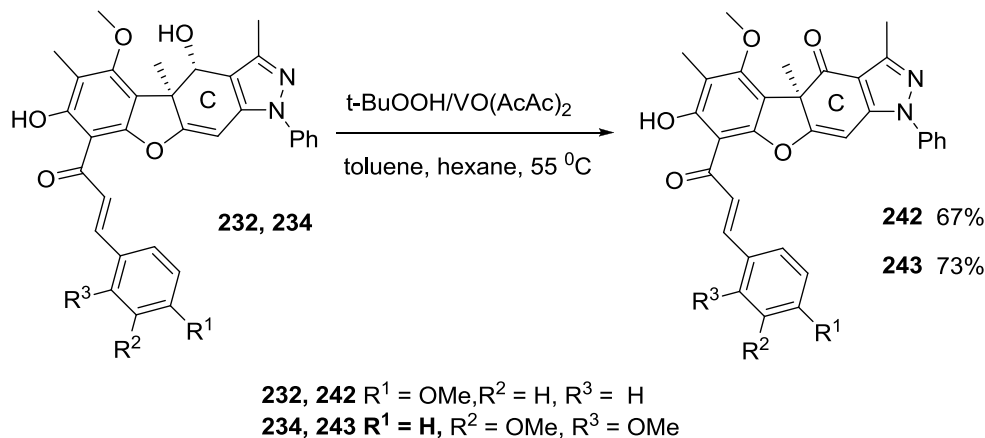


Схема 60. Окисление соединений **232** и **234** *tert*-бутилгидропероксидом.

Дихлордицианобензохинон (DDQ) – окислительный реагент, применяемый для циклодегидратации 2'-гидроксиалконов, также окисляет гидроксильную группу цикла С. Однако, при этом происходит и гетероциклизация с образованием флавона **244** (Схема 61). Нами было обнаружено, что при кипячении реакционной смеси в течение 10 ч в качестве продуктов образуется смесь соединений **242** и **244** в соотношении 1:3 по данным ЯМР ^1H . Кипячение в течение 15 ч приводит к образованию соединения **244** с выходом 75%.

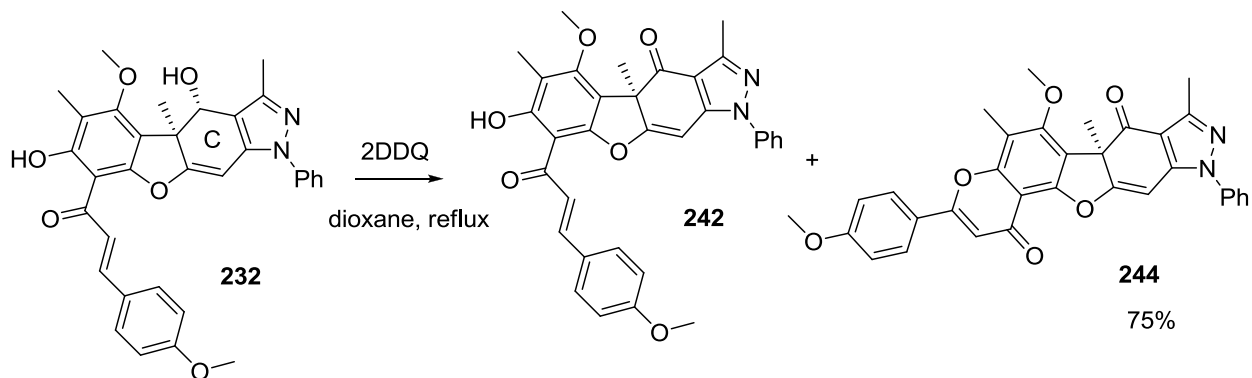


Схема 61. Реакция соединения **232** с дихлордицианобензохиноном.

Флаваноны также получают действием нуклеофильных агентов, например, этилендиамина, на 2-гидроксиалконы. Однако, нами обнаружено, что в этих условиях соединение **232** не подвергается внутримолекулярной циклизации. Действие же другого нуклеофильного агента - гидразин моногидрата - на халькон **232** приводит к образованию изомерных дигидропиразолов **245a,b** с соотношении 1:1 с общим выходом 82% (Схема 62). Реакция протекает при кипячении в спирте с эквимольным количеством гидразин

моногидрата, уменьшение количества гидразина приводит к уменьшению содержания **245a,b** в реакционной смеси, продуктов флаванового типа не наблюдается. Строение соединений **245a,b** было установлено методами спектроскопии ЯМР, а так же сравнением химических сдвигов дигидропиразольного цикла с литературными данными. Следует отметить, что использование в реакции фенилгидразина не приводит к какому-либо взаимодействию.

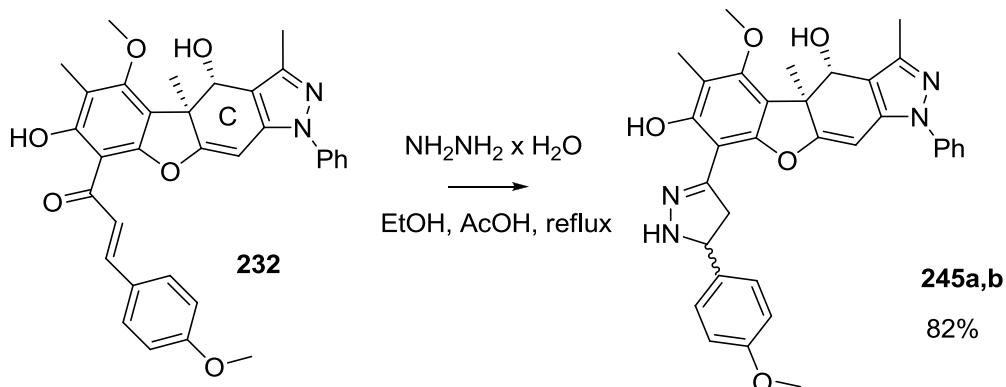


Схема 62. Реакция соединения **232** с гидразин моногидратом.

Таким образом, из метоксихалкона, синтезированного на базе остова усниновой кислоты, нами был осуществлен синтез флавонолов, дигидрофлавонолов и флавонов. Действием гидразин моногидрата на исходное соединение получены продукты, содержащие дигидропиразольный цикл.

3.11.3 Синтез аурунов на основе усниновой кислоты

Ауруны – природные соединения класса флаваноидов, которые в литературе описывают как противогрибковые, антибактериальные средства, антифиданты насекомых, антиоксиданты, ингибиторы ферментов, противоопухолевые и противовоспалительные агенты. Ауруны (бензилиденбензофураноны) биосинтетически образуются из халконов. Из литературных данных известно³¹⁵, что под действием DDQ из гидроксихалконов наряду с флавонами образуются также и ауруны, однако, при действии DDQ на халкон **232** мы не наблюдали образования ни аурунов, ни их предшественников. Нами был предложен альтернативный путь синтеза аурунов на базе остова УК. Известно, что для получения синтетическим путем аурунов (бензилиденбензофуранонов) широко используют в качестве исходных соединений замещенные бензофураноны, реакция конденсации последних с бензальдегидами приводит, как правило, к Z-изомерам аурунов³¹⁶.

Синтез фуранонового производного **211** на основе УК, описанный ранее в главе 3.8.2, протекает под действием оснований (KOH, ацетат калия, триэтиламин и т.д.) на монобромпроизводное УК **157**. Реакции соединения **211** с небольшим избытком (1:1.1) замещенных бензальдегидов проводили в стандартных для таких реакций условиях - при 60

°С в течение 1-1.5 часов в водном метаноле в присутствии KOH. Выходы соединений **246-257** составили от 55% до 74% (Схема 63).

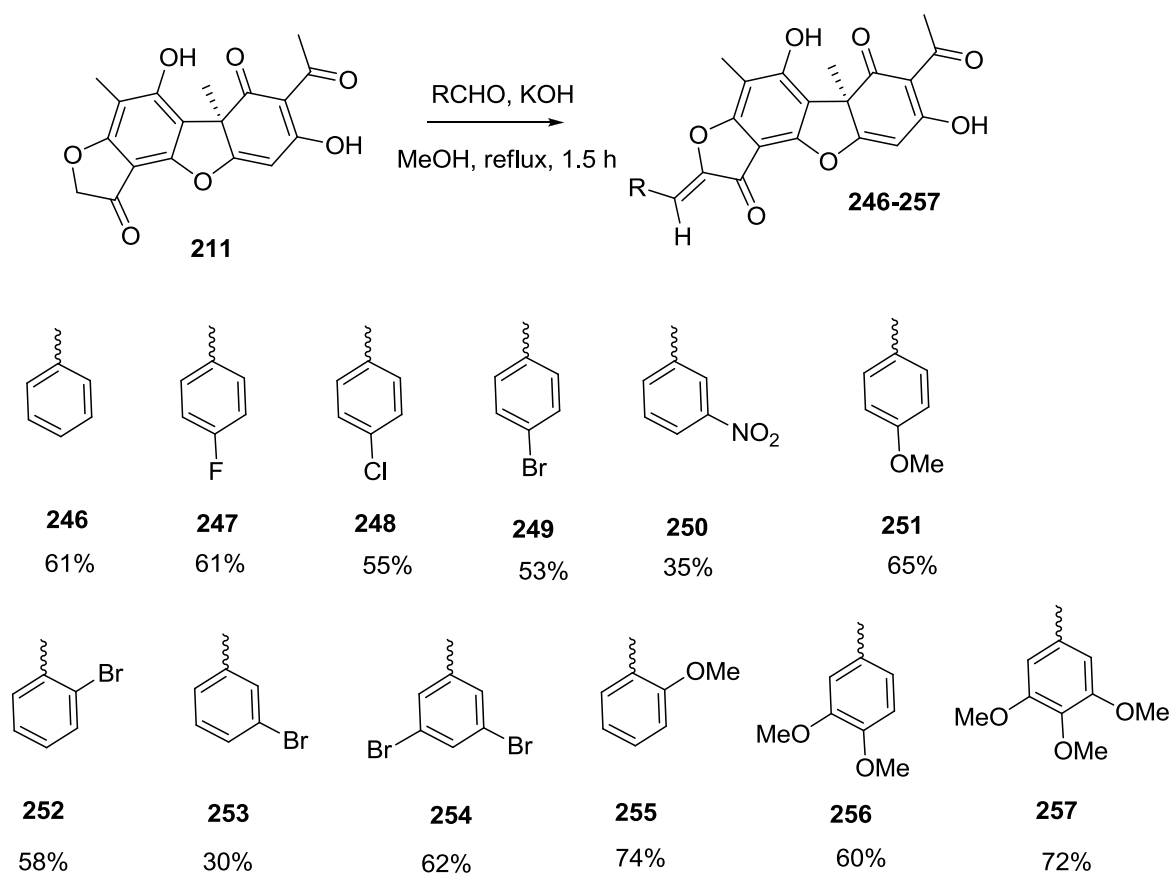


Схема 63. Синтез соединений **246-257**.

В спектрах ЯМР всех полученных соединений наблюдались сигналы соответствующие одному стереоизомеру. Конфигурация двойной связи C¹⁴-C¹⁶ была установлена для соединения **255** (рис. 29) по совокупности данных квантово-химических расчетов DFT-методом и спектров ЯМР.

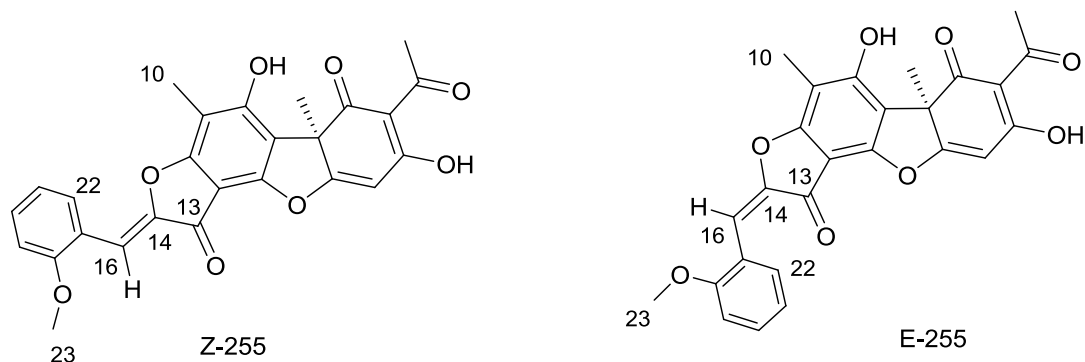


Рисунок 29. Возможные стереоизомеры соединения **255**.

В спектре монорезонанса КССВ между H¹⁶ и C¹³ в соединении **255** составила 3.2 Гц, однако в литературе мы не обнаружили данных по определению конфигурации двойной связи в ауранах, опирающихся на эту константу. По этой причине для установления конфигурации двойной связи C¹⁴-C¹⁶ в соединении **255** были проведены конформационный

анализ и квантово-химические расчеты DFT-методом. В результате установлено, что для *Z*-изомера существует основной конформер, в котором ароматический заместитель находится в одной плоскости с двойной связью C¹⁴-C¹⁶ и MeO-группа направлена в одну сторону с протоном Н-16, и два конформера выше по энергии относительно основного на 3.7 и 3.8 ккал/моль, которые соответствуют положению MeO-группы над и под плоскостью молекулы – в случае, когда она направлена в противоположную сторону с протоном Н¹⁶. В случае *E*-изомера возможно только одно положение ароматического заместителя, в котором MeO-группа направлена в сторону протона Н¹⁶, при этом эта структура менее стабильна по сравнению с основным *Z*-изомером на 2.6 ккал/моль. Сравнение экспериментальных (8.23 м.д.) и рассчитанных (8.65 м.д. для *Z*-изомера и 10.75 *E*-изомера) химических сдвигов *орто*-протона при C²² указывает на большее соответствие с *Z*-изомером, та же тенденция наблюдается для сдвигов атомов углерода двойной связи C¹⁴-C¹⁶ (см. таблицу 2).

Таблица 2. Экспериментальные и рассчитанные значения некоторых химических сдвигов ¹H и ¹³C для соединения **255**

| атом | δ, м.д. <i>Z</i> | δ, м.д. <i>E</i> | δ, м.д. эксп. | атом | δ, м.д. <i>Z</i> | δ, м.д. <i>E</i> | δ, м.д. эксп. |
|------|------------------|------------------|---------------|------|------------------|------------------|---------------|
| Н-16 | 7.58 | 7.80 | 7.39 | С-16 | 102.25 | 114.66 | 106.26 |
| Н-19 | 6.84 | 6.80 | 6.91 | С-17 | 124.08 | 124.19 | 121.15 |
| Н-20 | 7.36 | 7.46 | 7.35 | С-18 | 161.92 | 160.05 | 158.65 |
| Н-21 | 7.13 | 7.17 | 7.05 | С-19 | 107.92 | 106.17 | 110.63 |
| Н-22 | 8.65 | 10.75 | 8.23 | С-20 | 130.54 | 133.13 | 131.29 |
| Н-23 | 3.95 | 3.93 | 3.89 | С-21 | 120.19 | 120.70 | 120.75 |
| С-13 | 174.61 | 173.76 | 179.60 | С-22 | 132.74 | 134.35 | 131.56 |
| С-14 | 151.50 | 154.08 | 147.49 | С-23 | 52.24 | 52.15 | 55.46 |

Данные NOESY также хорошо согласуются с *Z*-конфигурацией связи C¹⁴-C¹⁶ в соединении **255** и рассчитанной основной конформацией для этого случая. Так в спектре присутствуют NOE-кросс-пики между протоном Н²² и протонами метильной группы C¹⁰ (рассчитанное расстояние ~2.9 Å), между Н¹⁶ и протонами MeO-группы, при этом отсутствует кросс-пик между Н²² и Н¹⁶, и между протонами метильных групп C²³ и C¹⁰. По аналогии с установленной структурой соединения **255**, а также на основании литературных данных о конфигурации двойной связи в ауранах мы приписали соединениям **246-257** *Z*-конфигурацию.

Строго говоря, к ауранам относят соединения С6-С3-С6 ряда, в которых имеются два бензольных ядра. Но в конденсацию с бензофуранонами можно вовлекать не только бензальдегиды. Нами показано, что в реакцию конденсации с соединением **211** вступают

также гетероароматические альдегиды. Так, реакция с фурфуролом протекает в интервале температур от комнатной (реакция с фурфуролом) до 60 °С (реакция с пиридинкарбоксальдегидами) в среде метанол - водный раствор КОН. Выходы соединений **258-264** от 45 % до 70 % (схема 64).

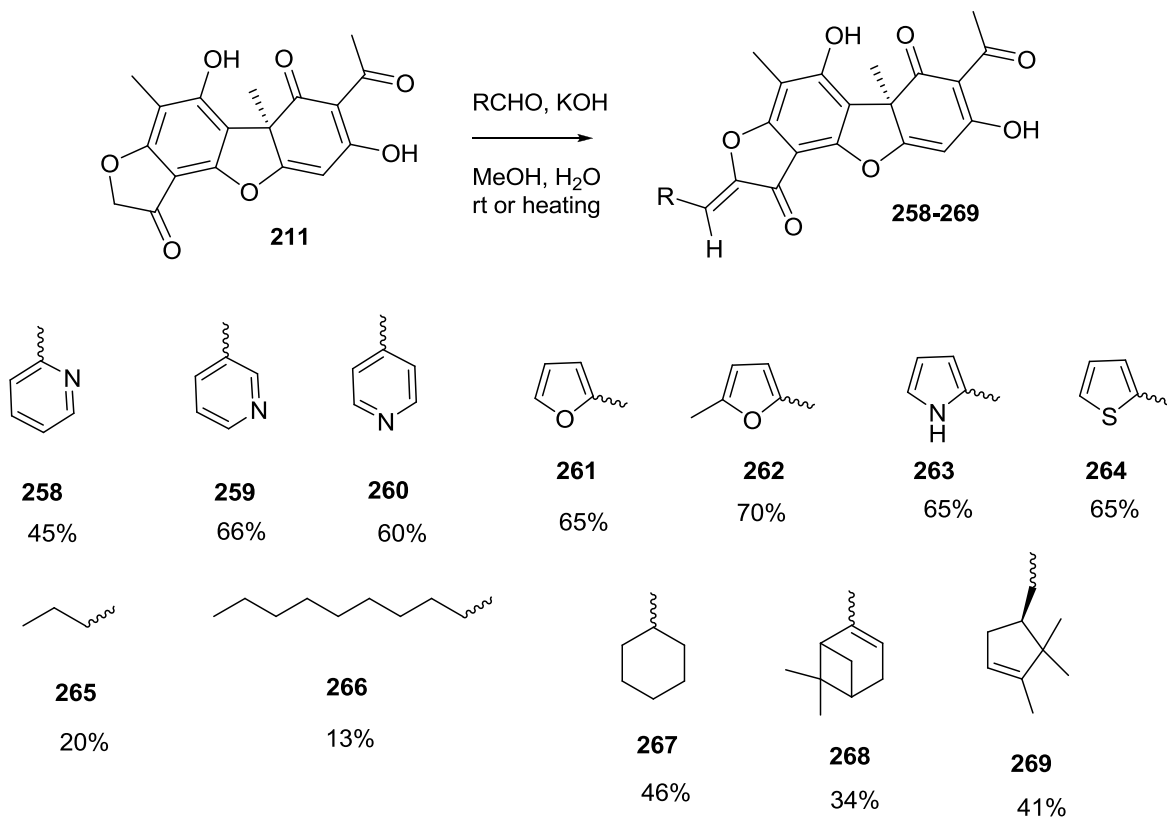


Схема 64. Синтез соединений **258-269**.

Реакции конденсации с алифатическими альдегидами протекают не так гладко. Целевые продукты конденсации с масляным и дециловым альдегидами, соединения **265** и **266**, выделены с выходами 20 и 13 % соответственно, реакция также протекает при комнатной температуре (схема 64). Реакция с акролеином приводит к сложной смеси продуктов. Более высокие выходы ауриноподобных соединений наблюдаются для реакций с циклогексаналем, миртеналем и камфоленовым альдегидом (соединения **267**, **268**, **269** соответственно).

Таким образом, в реакциях с ароматическими и гетероароматическими альдегидами нами синтезированы ауроны и подобные им соединения. Взаимодействия с алифатическими альдегидами протекают с наименьшими выходами в ряду осуществленных реакций из-за конкурирующих реакций самоконденсации альдегидов.

Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы нами в следующих публикациях: ²⁹⁸, ³¹⁷, ³¹⁸.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВЫХ КИСЛОТ

Изучение противовирусной активности соединений проводилось в Лаборатории молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ под руководством к.б.н. Зарубаева В.В.

Изучение цитотоксической активности соединений проводилось на медицинском факультете Новосибирского государственного университета под руководством д.б.н., проф. Покровского А.Г.

Изучение ферментингибирующей активности соединений проводилось в лаборатории биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН под руководством чл.-корр., д.х.н., проф. Лаврик О.И.

Изучение антимикобактериальной активности соединений проводилось в лаборатории генетики микроорганизмов Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН под руководством д.б.н., проф. Даниленко В.Н. Изучение противотуберкулёзной активности соединений проводилось в лаборатории молекулярно-генетических методов исследования Центрального научно-исследовательского института туберкулёза РАМН под руководством д.б.н., проф. Черноусовой Л.Н.

Изучение влияния производных УК на экспрессию гена липопротеинов низкой плотности проводилось в лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН под руководством к.б.н. Филипенко М.Л.

Изучение инсектицидной активности соединений проводилось в лаборатории патологии насекомых Института систематики и экологии животных СО РАН под руководством д.б.н., проф. Глупова В.В.

4.1 Противовирусная активность производных усниновых кислот

Разработка лекарственных средств для лечения и профилактики вирусных заболеваний является одним из приоритетных направлений в области инновационного развития фармацевтической промышленности. Грипп представляет собой широко распространенную во всем мире респираторную инфекцию. Он вызывает ежегодные эпидемии, быстро распространяющиеся из страны в страну, вовлекая в тяжелых случаях (пандемии) значительную часть человеческой популяции земного шара.

Несмотря на успехи, достигнутые в области химиотерапии, вакцинопрофилактики и иммунологии гриппа, он остается трудно контролируемой инфекцией вследствие высокой

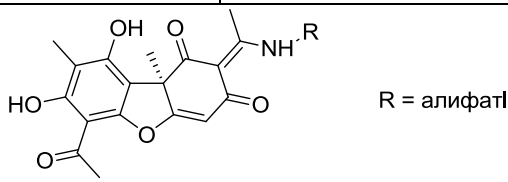
генетической изменчивости и различных долговременных осложнений после острой стадии, приводящих к "скрытой", или вторичной, смертности, вызванной не самим вирусом гриппа, но вирусиндуцированными вторичными процессами. В настоящее время для химиотерапии гриппа доступен широкий спектр патогенетических, иммуномодулирующих, общеукрепляющих препаратов наряду со средствами специфической противогриппозной терапии. Основным недостатком существующих химиопрепаратов против гриппа является формирование и быстрое распространением в человеческой популяции вирусов гриппа, устойчивых к их действию.

К началу наших исследований была известна противовирусная активность УК в отношении ряда вирусов (вируса герпеса 1 типа, папилломавируса, вируса Эпштейна-Барра). Биологическая активность производных УК в отношении вируса гриппа ранее не была описана в литературе.

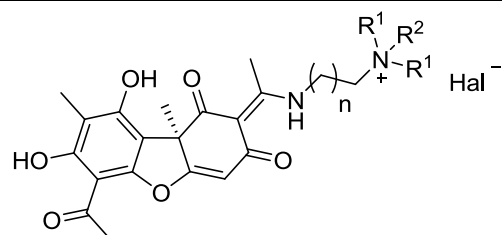
В качестве тестового вируса для скрининга был выбран вирус гриппа A/California/7/09 (H1N1pdm09), который является актуальным на протяжении нескольких сезонов и устойчив к препаратам адамантанового ряда. Исследована противовирусная активность около 100 производных УК в отношении этого вируса.

На первой стадии экспериментов определяли 50% цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀) каждого препарата в культуре клеток MDCK. Далее оценивали противовирусную активность каждого препарата и определяли 50% эффективную дозу (ЭД₅₀), а также вычисляли отношение ЦТД₅₀ к ЭД₅₀ – химиотерапевтический индекс (ХТИ). Полученные данные сравнивали с соответственными показателями ремантадина (ЦТД₅₀=60, ЭД₅₀=12, ХТИ=5) и озельтамивира карбоксилата (ЦТД₅₀ =300, ЭД₅₀=0,3, ХТИ=1000). Препарат считался активным, если значение ХТИ превышало 10. Экспериментальные данные приведены в таблице 3.

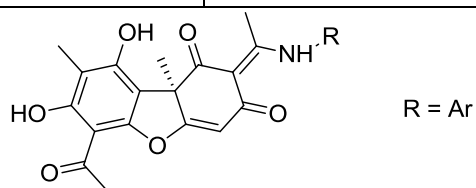
Таблица 3. Противовирусная активность производных УК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1pdm09).

| Соединение | ЦТД ₅₀ мкг/мл | ЭД ₅₀ мкг/мл | ХТИ |
|--|-----------------------------|----------------------------|------|
| (+)-1 | 146 | 17.8 | 8.2 |
| (-)-1 | 46 | 4.5 | 10.3 |
|  | | | |
| (+)-55 | 58 | 7.4 | 7 |

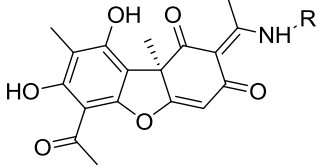
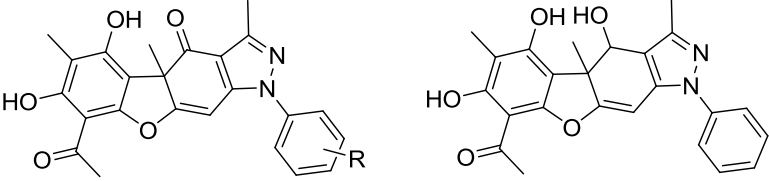
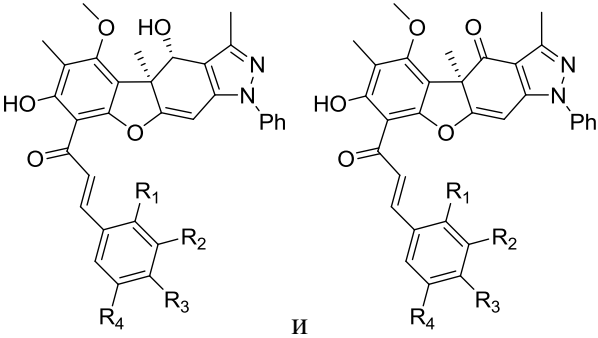
| | | | |
|--------|------|------|-------------|
| (+)-58 | 2.5 | 2.3 | 1 |
| (+)-59 | 31.1 | 1.6 | 19.4 |
| (-)-59 | 195 | 16.9 | 11.5 |
| (+)-60 | 2 | 1.5 | 1.3 |
| (-)-60 | 1 | 1 | 1 |
| (+)-62 | 5.5 | 3.5 | 1.4 |
| (-)-62 | 1.6 | 1.6 | 1 |
| (+)-63 | 79 | 10 | 7.9 |
| (-)-63 | 56 | 6.3 | 8.8 |

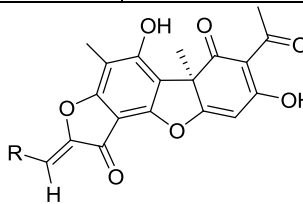
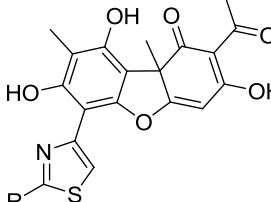


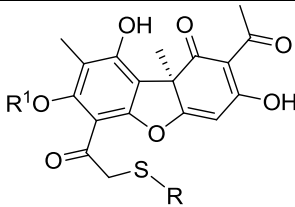
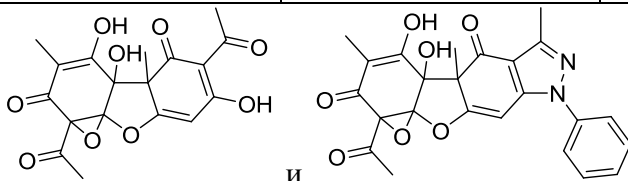
| | | | |
|--------|-----|-----|-----|
| (+)-64 | 2.3 | 2 | 1.1 |
| (-)-64 | 4 | 3 | 1.3 |
| (+)-65 | 1.8 | 1.5 | 1 |
| (+)-66 | 1.8 | 1.6 | 1.1 |
| (-)-66 | 20 | 7.5 | 2.7 |
| (+)-67 | 6.2 | 2.6 | 2.3 |
| (-)-67 | 5.2 | 3.1 | 1.6 |
| (+)-68 | 5.8 | 2.4 | 2.4 |
| (-)-68 | 5.8 | 4 | 1.2 |



| | | | |
|--------|-----|------|-------------|
| (+)-69 | 156 | 8.8 | 17.7 |
| (-)-69 | 360 | 56 | 6.4 |
| (+)-70 | 56 | 5.5 | 10.2 |
| (-)-70 | 56 | 5.5 | 10.2 |
| (+)-71 | 91 | 10.3 | 9 |
| (-)-71 | 153 | 40 | 3.8 |
| (+)-72 | 102 | 9.4 | 10.9 |

| | | | |
|---|-----|-----|-------------|
| (-)-72 | 40 | 7.3 | 5.5 |
| (+)-73 | 53 | 10 | 5.3 |
| (-)-73 | 43 | 10 | 4.3 |
| (+)-74 | 47 | 10 | 4.7 |
| (-)-74 | 40 | 4.6 | 8.6 |
|  $R = a/k$ | | | |
| (+)-28 | 27 | 4.0 | 6 |
| (-)-28 | 60 | 4.3 | 13.9 |
| (+)-77 | 61 | 3 | 20 |
| (-)-77 | 60 | 6 | 10 |
| (-)-78 | 10 | 2.9 | 3.4 |
| (+)-79 | 6 | 3 | 2 |
| (-)-79 | 15 | 3 | 5 |
| (+)-81 | 10 | 2 | 5 |
| (+)-83 | 11 | 10 | 1.1 |
|  | | | |
| (+)-35 | 346 | 28 | 12 |
| (-)-35 | 235 | 23 | 10 |
| (+)-97 | 530 | 33 | 16 |
| (+)-125 | 11 | 1 | 11 |
| (-)-125 | 20 | 5 | 4 |
|  II | | | |
| (+)-226 | 19 | 17 | 1.1 |

| | | | |
|--|------|-----|-------------|
| (-)-226 | 55 | 31 | 1.7 |
| (+)-228 | 140 | 30 | 4.6 |
| (-)-228 | 64 | 44 | 1.5 |
| (+)-231 | 300 | 30 | 10 |
| (+)-233 | 500 | 34 | 14 |
| (-)-233 | 500 | 45 | 11 |
| (+)-234 | 500 | 28 | 17 |
| (-)-234 | 500 | 44 | 11.3 |
| (+)-235 | 300 | 15 | 20 |
| (+)-236 | 250 | 20 | 12.5 |
| (+)-237 | 300 | 15 | 20 |
| (+)-238 | 60 | 5 | 12 |
| (+)-239 | 170 | 20 | 8.5 |
| (+)-243 | 20 | 5 | 4 |
|  | | | |
| (+)-211 | 40 | 22 | 1.8 |
| (+)-255 | 15.2 | 2.2 | 6.9 |
| (+)-249 | 20 | 2.4 | 8.1 |
| (+)-260 | 20 | 3 | 6 |
| (+)-259 | 23 | 3 | 7.7 |
| (+)-262 | 5 | 5 | 1 |
| (+)-264 | 3 | 3 | 1 |
|  | | | |
| (+)-193 | 9.2 | 2.9 | 3.1 |
| (-)-193 | 11 | 2 | 5.2 |
| (-)-203 | 20 | 2 | 10 |
| (-)-204 | 8.7 | 1.3 | 6.7 |

|  | | | | |
|---|-----------------|-----|------|-----------|
| R ¹ = H | (+)- 163 | 1 | 1 | 1 |
| | (+)- 166 | 1 | 1 | 1 |
| | (+)- 161 | 3 | 1 | 3 |
| | (+)- 167 | 30 | 15 | 2 |
| | (+)- 165 | 88 | 28 | 3.1 |
| R ¹ = Me | (+)- 176 | 420 | 72 | 5.8 |
| | (+)- 178 | 90 | 12 | 7.5 |
| | (+)- 181 | 50 | 7 | 7 |
| | (+)- 183 | 300 | 13 | 23 |
|  | | | | |
| | (+)- 151 | 88 | 4.4 | 22 |
| | (-)- 151 | 57 | 10.8 | 5.3 |
| | (+)- 153 | 30 | 6 | 5 |

Из представленных данных видно, что (+)-УК менее токсична, чем ее энантиомер, но также и менее активна. Согласно используемым критериям, только (-)-УК может быть признана активной в отношении вируса гриппа, так как имеет значение ХТИ больше 10. Ингибирующая активность в отношении вируса гриппа (+)- и (-)-УК различается в 4 раза. Более высокую активность (-)-УК также проявляла в отношении других вирусов: вируса герпеса 1 типа и вируса Эпштейна-Барра, в последнем случае разница в активности *in vitro* между (+)- и (-)-энантиомерами была практически такой же, как и в наших исследованиях на вирусе гриппа – в 5 раз. Однако, из данных таблицы видно, что в парах синтезированных нами производных УК активность либо различается незначительно, либо более активен соответствующий (+)-энантиомер.

Среди енаминовых производных УК с алифатическими аминами активность проявили только два, которые являются парой изомеров ((+)-**59** и (-)-**59**) и содержат заместитель CF₂-CF₃, который, по-видимому, является важным для антивирусной активности. Енамины с четвертизированным азотом не содержат ни одного активного соединения вследствие

высокой токсичности соединений, которая снижает значения химиотерапевтического индекса до значений, близких к 1. Более высокую активность среди енаминов проявляют продукты взаимодействия УК с анилинами и аминокислотами, в данных группах активны 7 из 24 исследованных соединений, а соединение (+)-**77**, производное (+)-УК с β -аланином, имеет ХТИ, равный 20, что в два раза выше порога активности.

Пиразольные производные УК также большей частью проявляют умеренную противовирусную активность, что связано, в том числе, со снижением токсичности соединений при такой модификации УК. Восстановление эндоциклической карбонильной группы возвращает токсичность пиразольным производным. Среди производных хальконового ряда, содержащих наряду с пиразольным фрагментом в кольце С УК бензилиденовый заместитель в кольце А, активными оказались 60% исследованных соединений, причем все они содержали метокси-группу в пара- и/или орто- положениях ароматического заместителя. Следует отметить, что в этой группе соединений производное с восстановленной эндоциклической карбонильной группой ((+)-**234**) менее токсично, чем соответствующее карбонильное соединение ((+)-**243**).

Среди аурановых, тиазольных и сульфидных производных практически нет соединений, обладающих заметной противовирусной активностью. Единственное соединение, обладающее заметной активностью, содержит бензимидазольный фрагмент с метоксигруппой, фармакофорный заместитель с широким спектром действия.

Одно из наиболее активных в отношении вируса гриппа соединений получено воздействием на (+)-УК органических надкислот. Соединение (+)-**151** - проявило высокую ингибирующую активность при низкой цитотоксичности, его химиотерапевтический индекс (ХТИ = 22) более, чем в 4 раза превышает тот же показатель ремантадина (ХТИ = 5).

Кроме того, для некоторых активных в отношении штамма A/California/7/09 (H1N1pdm09) соединений ((-)-**28**, (+)-**77**, (-)-**77**, (+)-**151**) была исследована ингибирующая активность в отношении штаммов вируса гриппа, различающихся по антигенной принадлежности, происхождению и чувствительностью к химиопрепаратам: A/Aichi/2/68 (H3N2), A/mallard/Pensilvania/10218/84 (H5N2), A/Владивосток/2/09 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1). Активность производных УК в отношении различных вирусов в целом сходна, за исключением вируса A/Владивосток/2/09, который оказался более чувствительным к производным УК. Этот факт представляет особенный интерес, поскольку данный вирус устойчив к ингибитору нейраминидазы (озельтамивиру), что может свидетельствовать о возможном механизме действия производных УК.

Активность этих же соединений была изучена *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей, вирус A/Aichi/2/68 (H3N2). Все изученные препараты в той или иной

степени снижают смертность и повышают продолжительность жизни животных по сравнению с группой плацебо. Наибольшую активность проявил препарат (+)-**77**, производное (+)-УК с β -аланином. При использовании вируса в однократной дозе ЛД₅₀ индекс защиты для него составил 60% при дозе (+)-**77** 30 мг/кг и 40% - в дозе 10 мг/кг. В эксперименте с высокой заражающей дозой (10 ЛД₅₀) (+)-**77** также проявляет умеренную протективную активность (33%). Таким образом, это соединение проявило противовирусную активность в опытах на животных, кроме того, в длительных экспериментах с штаммом вируса гриппа A/PR8/34 (H1N1) обнаружено, что вирус не мутирует при контакте с (+)-**77** и не вырабатывает устойчивость к этому препарату (снижение вирусной продукции не менялось на протяжении 13 последовательных экспериментов).

Таким образом, нами показано, что химическая модификация УК может приводить к усилению противовирусной активности. Ингибирующая активность производных УК варьировалась от 1 до 72 мкг/мл, токсичность от 1 до 500 мкг/мл. Однако, как правило, изменение структуры, приводящее к увеличению ингибирующей активности, влекло за собой и увеличение токсичности. Потому разброс индексов селективности оказался не столь велик. Большинство производных УК оказались не активны в отношении вируса гриппа (ХТИ <10). Наиболее активными в отношении вируса гриппа соединениями оказались халконы, достаточно далёкие структурно от исходных УК. В ряду халконов удалось выделить зависимость активности от расположения метоксигрупп в ароматическом кольце халконового фрагмента. Предпочтительнее соединения с метоксильным заместителем в орто-положении ароматического кольца (ХТИ = 14-20). Наиболее существенную активность в отношении штамма вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1pdm09) проявили единичные представители других структурных групп: соединение (+)-**77** - производное (+)-УК с аминокислотой β -аланином (ХТИ = 20), соединение (+)-**97** - пиразольное производное (+)-УК с трифторметильным заместителем (ХТИ = 16), соединение (+)-**183** - с 5-метоксибензимидазольным фрагментом, связанным с кольцом А УК (ХТИ = 23) и оксирановое соединение (+)-**151**, производное (+)-УК (ХТИ = 22). В целом, можно отметить, что производные (+)-УК, как правило, проявляют более высокую ингибирующую активность, чем сама (+)-УК, в то время как левовращающие производные менее активны, чем природная (-)-УК.

Несмотря на умеренные значения химиотерапевтических индексов УК и ряда их производных, они являются перспективными ингибиторами вируса гриппа, поскольку в производных УК совмещены характеристики, позволяющие как напрямую ограничить репродукцию вируса, так и снизить уровень воспалительных реакций при гриппозной инфекции, предотвратить присоединение вторичных инфекций при длительном или

осложненном течении гриппа, а также усилить апоптотические процессы в клетках, инфицированных вирусом, что, в свою очередь, также способствует снижению вирусной нагрузки и тяжести заболевания. Все вышеупомянутое позволяет предположить, что УК и её производные могут выступать как препараты комплексного механизма действия, направленные как на собственно вирус, так и на другие аспекты патогенеза гриппозной инфекции.

4.2 Цитотоксическая активность производных усниновых кислот в отношении раковых клеток

Проблема лечения злокачественных новообразований является одной из основных в современной медицине, в связи с постоянным ежегодным ростом абсолютного числа заболевших, а также из-за высокого процента смертности среди онкобольных. Применяемые на данный момент схемы лечения рака используют хирургические методы в комбинации с высокодозной агрессивной терапией, серьезным недостатком которой является высокая токсичность современных противоопухолевых препаратов в отношении жизненно важных органов и систем организма. Поэтому поиск новых низкотоксичных и высокоэффективных противоопухолевых препаратов на основе доступного отечественного сырья является актуальной задачей.

Достаточно широко исследовано цитотоксическое действие УК и его возможные механизмы. Известно, что действие обеих энантиомеров УК приводит к значительной потере митохондриального мембранного потенциала¹⁸⁷, увеличению внутриклеточного производства АФК¹⁸⁹, подавлению образования клеточных колоний и уменьшению их размера¹⁹⁰. Недостатками природных УК являются относительно низкая эффективность по сравнению с существующими препаратами, гепатотоксичность и плохая биодоступность. Однако, в литературе есть примеры успешных синтетических трансформаций УК, приводящих к соединениям высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых линий клеток крови⁹.

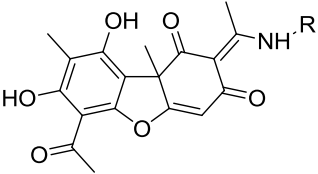
На медицинском факультете НГУ исследована цитотоксическая активность более 60 производных, синтезированных на основе обоих энантиомеров УК.

Для исследования цитотоксической активности синтезированных нами соединений были использованы по аналогии с данными работы⁹ опухолевые линии клеток крови - МТ-4 (клетки Т-клеточного лейкоза человека), U-937 (опухолевая линия моноцитов человека) и СЕМ-13 (линия клеток Т-клеточного лейкоза человека). Согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств³¹⁹ соединение нового

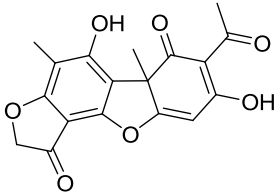
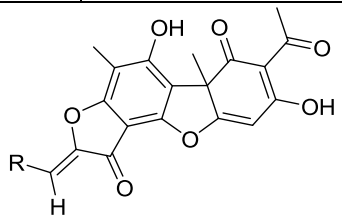
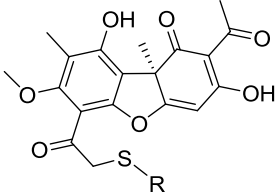
класса считается цитотоксически активным при $CTD_{50} \leq 10^{-4}$ М (100 μ М). CTD_{50} - концентрация соединения, при которой наблюдается гибель 50% клеток.

В таблице 4 приведены экспериментальные данные по цитотоксической активности соединений, выделены жирным шрифтом значения CTD_{50} , которые превышают по цитотоксичности значения соответствующих энантиомеров УК.

Таблица 4. Цитотоксическая активность соединений производных УК

| | CTD ₅₀ , μ М | | |
|---|-----------------------------|-------------|-------------|
| | СЕМ-13 | U-937 | МТ-4 |
| (+)-1 | 26.0 | 19.4 | 26.0 |
| (-)-1 | 23.2 | 37.8 | 17.4 |
|  | | | |
| (+)-60 | 14.5 | 91.8 | 21.7 |
| (-)-60 | 29.0 | 33.8 | 23.4 |
| (+)-61 | 20.6 | 67.9 | 19.2 |
| (-)-61 | 27.1 | 31.7 | 21.9 |
| (+)-62 | 69.0 | 158.0 | 122.8 |
| (-)-62 | 70.1 | >219 | 92.1 |
| (+)-63 | 110.6 | >213 | 106.3 |
| (-)-63 | 74.4 | 181.0 | 106.3 |
| (+)-55 | 105.3 | 95.0 | 56.0 |
| (-)-55 | 132.4 | 95.0 | 30.5 |
| (+)-69 | 83.5 | 164.7 | 71.6 |
| (-)-69 | 78.7 | 95.9 | 59.6 |
| (+)-70 | 10.8 | 66.2 | 37.5 |
| (-)-70 | 28.7 | 70.6 | 59.6 |
| (+)-72 | 14.1 | 16.1 | 46.8 |
| (-)-72 | 32.6 | 75.3 | 67.2 |
| (+)-73 | 17.3 | 77.4 | 52.9 |
| (-)-73 | 20.4 | 50.9 | 40.7 |
| (+)-74 | 13.7 | 61.8 | 41.2 |
| (-)-74 | 27.4 | 148.7 | 41.2 |

| | | | |
|---------|-------|-------------|-------------|
| (+)-71 | 50.3 | 18.3 | 27.4 |
| (-)-71 | 27.4 | 38.9 | 57.2 |
| (+)-28 | 99.7 | 94.8 | 34.9 |
| (-)-28 | 142.1 | 119.7 | 79.1 |
| (+)-77 | 134.9 | 84.3 | 55.4 |
| (-)-77 | 67.5 | 101.2 | 86.7 |
| (+)-111 | 99.3 | 95.0 | 66.9 |
| | | | |
| (+)-64 | 149.0 | 99.0 | 99.0 |
| (-)-64 | 169.0 | 165.4 | 91.7 |
| (+)-66 | 54.8 | 137.0 | 95.9 |
| (-)-66 | >171 | 159.0 | 85.6 |
| (+)-67 | 72.1 | 67.1 | 68.8 |
| (-)-67 | 72.1 | 72.1 | 114.1 |
| (+)-68 | 147.0 | 52.3 | 163.4 |
| (-)-68 | 62.1 | 68.6 | 117.6 |
| (+)-65 | >181 | >181 | 116.1 |
| | | | |
| (+)-226 | 50.0 | >192 | 13.4 |
| (-)-226 | 32.7 | 15.3 | 8.1 |
| (+)-227 | 176.5 | 74.3 | 7.4 |
| (-)-227 | 148.7 | >185 | 9.8 |
| (+)-228 | 99.2 | 11.7 | 9.7 |
| (-)-228 | >180 | 41.5 | 8.8 |
| (+)-232 | 132.7 | >182 | 27.3 |

| | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|
| (-)-232 | 141.8 | 112.7 | 63.6 |
| (+)-236 | 43.1 | 27.6 | 24.1 |
| (-)-236 | 137.9 | 86.2 | 77.6 |
|  | | | |
| (+)-211 | 248.5 | 187.1 | 61.4 |
| (-)-211 | >292 | 96.5 | 64.3 |
|  | | | |
| (+)-246 | 3.5 | 15.6 | 9.3 |
| (+)-247 | 1.4 | 6.7 | 6.2 |
| (+)-248 | 3.0 | 4.7 | 3.9 |
| (+)-249 | 2.5 | 49.0 | 4.9 |
| (+)-250 | 1.5 | 4.6 | 16.0 |
| (+)-251 | 2.6 | 7.8 | 7.2 |
| (+)-255 | 12.4 | 12.4 | 12.4 |
| (+)-257 | 5.8 | 6.1 | 14.6 |
| (+)-261 | 64.3 | 12.4 | 7.4 |
| (-)-261 | 78.6 | 69.0 | 23.8 |
|  | | | |
| (+)-174 | 56.9 | 124.7 | >219 |
| (+)-177 | 156.5 | 90.0 | 133.0 |
| (+)-180 | 197.6 | 108.7 | 98.8 |
| (+)-181 | 128.4 | 134.7 | 101.0 |
| (+)-182 | 186.0 | >200 | 86.2 |
| (+)-183 | 173.5 | >187 | 84.1 |
| Прочие производные УК | | | |

| | | | |
|---------|------|------|-------------|
| (+)-221 | 62.2 | 46.7 | 15.7 |
| (+)-222 | 95.8 | 99.6 | 47.9 |
| (+)-223 | н\д | 80.0 | 71.4 |

Из анализа данных таблицы 4 видно, что енаминовые производные либо не проявляют цитотоксической активности, либо имеют умеренную активность, сравнимую с активностью УК. С увеличением длины линкера енаминного фрагмента цитотоксичность по отношению ко всем исследованным линиям падает. Тестируемые соединения с кватернизованным атомом азота ((±)-64-(±)-68) не активны в отношении всех исследованных клеточных линий. Также не проявляют цитотоксической активности по отношению к опухолевым клеточным линиям крови тиоэферы (+)-174, (+)-177, (+)-180-(+)-183 и цианэтилированные производные УК (+)-221-(+)-223.

Селективное цитотоксическое действие по отношению к клеточной линии МТ-4 проявляют галогензамещённые хальконы на основе УК (±)-226-(±)-228. Для некоторых соединений исследовались пары энантиомеров, однако, достоверных различий в их цитотоксическом действии не выявлено.

Значительное количество токсичных по отношению к исследованным линиям опухолевых клеток крови соединений среди производных УК структурной группы ауранов (246-251, 257), предпочтительно, содержащих бензилиденфураноновый фрагмент. Следует отметить, что исходные для таких производных соединения, фураноны (+)-211 и (-)-211 практически не цитотоксичны. Ранее авторами работы¹⁹⁵ предполагалось, что ключевую роль в цитотоксичности УК играет её трикетонный фрагмент (кольцо С). На примере соединений 211 мы видим, что драматические изменения в цитотоксичности происходят при небольшой модификации её фенольного фрагмента (кольца А) при неизменной трикетонной части.

Изучение механизма противоопухолевого действия соединений (+)-246, (+)-247 и (+)-248 показало его связь с индукцией апоптоза в опухолевых клетках моноцитов человека U-937 (процент клеток с апоптозом составляет 70% для соединения (+)-246 и 22-29% для соединений (+)-247 и (+)-248 на 48 часов инкубации) и в опухолевых лимфоидных клетках МТ-4 (процент клеток с апоптозом для исследованных соединений составляет 13-19% на 72 часа инкубации).

Полученные данные по противоопухолевой активности соединений (+)-246- (+)-257 позволяют рассматривать их как перспективные лекарственные агенты. Соединения обладают более выраженным противоопухолевым эффектом в отношении исследованных опухолевых клеток МТ-4, СЕМ-13 и U-937 по сравнению с (+)-УК. Механизм противоопухолевого действия соединений (+)-246, (+)-247 и (+)-248 связан с индукцией

апоптоза в опухолевых клетках. Кроме того, перспективным может быть дальнейшее изучение цитотоксической активности галогензамещённых хальконов на основе УК (±)-**226**-(±)-**228** в связи с их избирательной цитотоксичностью.

4.3 Влияние производных усниновых кислот на репарационные ферменты

За последние годы было показано, что чрезвычайно важным стратегическим направлением лечения онкологических заболеваний является избирательное подавление активности ряда ферментов, вовлеченных в регуляцию жизнедеятельности клеток. Препараты, применяемые в схемах лечения многих форм онкозаболеваний, и ионизирующее излучение вызывают повреждение ДНК. Системы репарации ДНК противостоят действию агентов, повреждающих ее, поэтому терапевтический эффект зависит от эффективности этих систем. Селективное воздействие, направленное на ингибирование репарации ДНК, может быть использовано в качестве сопровождающей терапии. К числу ключевых белков, вовлеченных в процесс репарации, относятся поли(АДФ-рибозо)полимераза-1 (ПАРП1), поли(АДФ-рибозо)полимераза-2 (ПАРП-2), ДНК-полимераза β (пол β) и тирозил-ДНК-фосфодиэстераза1 (Tdp1).

4.3.1 Влияние производных усниновых кислот на ПАРП1, ПАРП2 и β -полимеразу

Поли(АДФ-рибозо)полимеразы (ПАРП) – ключевые регуляторы процессов метаболизма ДНК. Наиболее изученной является ПАРП1, которая активируется в ответ на повреждения ДНК и модифицирует ряд белков, среди которых модулирующие структуру хроматина, участники синтеза ДНК, репарации ДНК, транскрипции, регуляторы клеточного цикла и другие³²⁰. ПАРП1 является участником различных путей репарации ДНК, что делает ее привлекательной терапевтической мишенью, поскольку ингибирование ее активности позволяет сенсibilизировать опухолевые клетки к действию широкого спектра химиотерапевтических препаратов. Применение ингибиторов ПАРП1 в терапии рака описано в обзоре³²¹. Ингибиторы ПАРП перспективны также при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, сопряженных с некротической гибелью клеток, таких как ишемия миокарда и инсульт³²².

Наиболее близким к ПАРП1 по каталитическим функциям, используемым кофакторам и по гомологии является ПАРП2. При этом известно, что эти белки имеют неперекрывающиеся функции. Необходимость ПАРП2, как и ПАРП1, для эффективного протекания репарации ДНК делает этот фермент такой же привлекательной терапевтической

мишенью. Создание ингибиторов, проявляющих селективность в отношении ПАРП2, может расширить применимость комбинированной терапии (ингибитор+алкилирующий агент), поскольку открываются возможности избирательно подавлять эксцизионную репарацию оснований (ЭРО), при минимальном влиянии на функции ПАРП1, не связанные с системой ЭРО. К настоящему времени известно, что ПАРП1, в сравнении с ПАРП2, вовлечена в значительно большее число физиологических процессов, не связанных с репарацией ДНК, и для ПАРП1 идентифицировано несоизмеримо большее число белков-партнеров. В связи с этим ингибиторы, обладающие селективностью в отношении ПАРП2, могут эффективно sensibilizировать опухолевые клетки к действию алкилирующих препаратов при меньшем воздействии на другие системы, чем ингибиторы, не проявляющие селективности.

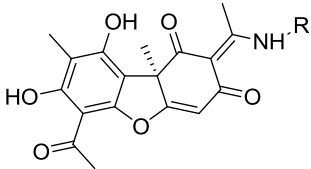
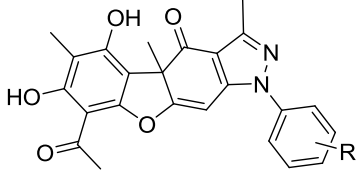
Фермент полимераза β (пол β) также специализируется на ЭРО. В раковых клетках наблюдается повышенный уровень экспрессии и активности пол β , что приводит к участию этого фермента в несвойственных для него процессах эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН) за счет конкуренции с более точными ДНК-полимеразами, и к увеличению количества мутаций. Селективных ингибиторов конкретных ДНК-полимераз на сегодняшний день не существует из-за высокой консервативности строения активных центров этих ферментов.

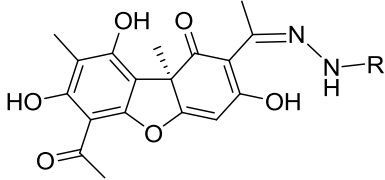
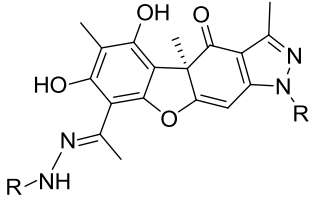
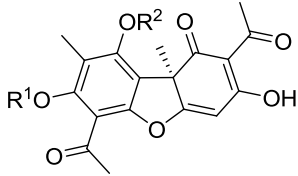
При поиске ингибиторов репарационных ферментов полезными могут оказаться ингибиторы, которые одновременно подавляют активность нескольких ферментов репарации, и селективные, т.е. оказывающие влияние выборочно на один из ферментов. Первый тип ингибиторов перспективен в качестве дополнительного терапевтического средства при радиотерапии и действии лекарств-радиомиметиков в клинической онкологии. Соединения, подавляющие активность нескольких ферментов, оказывают более массированное воздействие на системы репарации опухолевых клеток, противостоящих антираковой терапии. Второй тип может оказаться полезным в случаях необходимости подавления активности фермента без воздействия на другие системы. Так, селективные ингибиторы ПАРП1 могут оказаться полезны при лечении патологических состояний, связанных с избыточной активностью ПАРП1, таких как аутоиммунные заболевания. Такие состояния требуют длительного или пожизненного приема лекарств, поэтому преимуществом селективных препаратов может оказаться наряду с отсутствием влияния на другие клеточные процессы и мягкость воздействия.

В лаборатории биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН изучено влияние на активность ПАРП1, ПАРП2 и полимеразу β энантиомеров УК и более 50 их производных. Сравнение ингибирующей способности соединений, содержащих фармакофорные синтоны в разных фрагментах молекулы УК, было произведено для установления связи структура-активность. В качестве

показателя эффективности ингибирования использовали остаточную активность фермента при фиксированных концентрациях компонентов реакционной смеси (0.5 мМ) в связи с ограниченной растворимостью соединений - потенциальных ингибиторов ферментов в ДМСО. Экспериментальные данные по ингибирующей активности соединений приведены в таблице 5. Жирным шрифтом обозначены значения остаточной активности ферментов менее 30%.

Таблица 5. Ингибирующая активность производных УК по отношению к ПАРП1, ПАРП2 и β -полимеразе.

| | Остаточная активность ПАРП1, % | Остаточная активность ПАРП2, % | Остаточная активность β -пол, % |
|---|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| (+)-1 | 73 | 97 | 73 |
| (-)-1 | 72 | 108 | 77 |
|  | | | |
| (+)-56 | 37 | 106 | 58 |
| (+)-58 | 46 | 105 | 48 |
| (+)-59 | 70 | 116 | 92 |
| (+)-61 | 64 | 80 | 48 |
| (+)-66 | 88 | 68 | 58 |
| (+)-69 | 17 | 94 | 121 |
| (+)-70 | 49 | 96 | н/д |
| (+)-72 | 50 | 90 | н/д |
| (+)-77 | 67 | 70 | 91 |
| (+)-78 | 11 | 82 | 28 |
| (+)-80 | 49 | 54 | 35 |
|  | | | |
| (+)-93 | 54 | 93 | 96 |
| (+)-94 | 36 | 106 | 100 |

| | | | |
|---|-----------|-----|-----------|
| (+)-95 | 39 | 91 | 100 |
| (+)-96 | 32 | 105 | 94 |
| (+)-97 | 20 | 125 | 49 |
| (+)-98 | 38 | 95 | 91 |
| (+)-99 | 17 | 79 | 84 |
| (+)-100 | 31 | 99 | 97 |
|  | | | |
| (+)-109 | 36 | 84 | 88 |
| (+)-110 | 49 | 121 | 15 |
| (+)-111 | 53 | 75 | 13 |
|  | | | |
| (+)-102 | 29 | 116 | 92 |
| (+)-103 | 19 | 93 | 89 |
| (+)-104 | 16 | 91 | 87 |
| (+)-105 | 32 | 110 | 83 |
| (+)-106 | 36 | 75 | 89 |
| (+)-107 | 34 | 112 | 47 |
|  | | | |
| (+)-113 | 57 | 78 | 35 |
| (+)-114 | 84 | 69 | 56 |
| (+)-115 | 85 | 108 | 63 |
| (+)-132 | 21 | 69 | 43 |
| (+)-133 | 39 | 62 | 72 |
| (+)-135 | 23 | 55 | 97 |

н/д – нет данных

Из анализа данных таблицы 5 можно заметить, что как (+)-, так и (-)-УК в миллимолярной концентрации оказали незначительное ингибирующее влияние на активность ПАРП (более 70% остаточной активности фермента). Введение в кольцо С молекулы УК енаминового фрагмента (соединения (+)-56, (+)-58, (+)-59, (+)-61, (+)-66), содержащего только алифатический фрагмент, также не оказывает выраженного влияния на активность фермента (более 60% остаточной активности), тогда как наличие в енаминовом фрагменте ароматического кольца (неважно, напрямую связанного с атомом азота или нет, замещённого или нет) приводит к более эффективному ингибированию ПАРП (от 50 до 17% остаточной активности, соединения (+)-69, (+)-70, (+)-72). Среди производных УК с аминокислотами также наиболее активно соединение (+)-78 с ароматическим заместителем (остаточная активность ПАРП - 11%). Все пиразольные производные имеют замещённые фенильные заместители и все они ингибируют ПАРП до значений остаточной активности менее 54%, среди этой группы соединений наиболее заметную активность проявляют фторсодержащие производные (+)-97 и (+)-99. Та же тенденция наблюдается и для эфиров УК – соединения (+)-132, (+)-133 и (+)-135 с перфторированными ароматическими заместителями при фенольных гидроксилах УК заметно активнее других эфирных производных с заместителями ароматического и алифатических рядов.

Среди тестированных производных УК не нашлось соединений, ингибирующих ПАРП2 в достаточной степени.

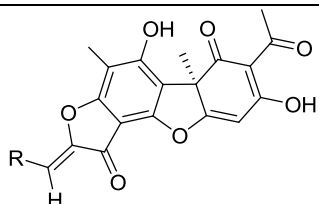
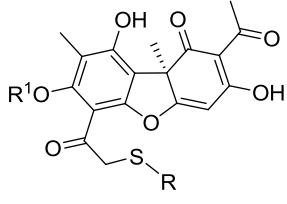
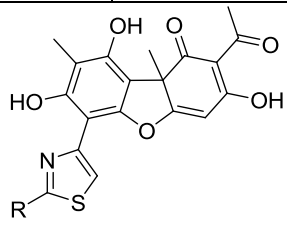
Большинство исследованных соединений в концентрации 0.5 мМ практически не проявило воздействия на β -пол (остаточная активность 50-120 %). Умеренную ингибирующую способность (28-43%) проявили некоторые аминокислоты ((+)-78, (+)-80), эфиры ((+)-113 и (+)-132). Наиболее сильное ингибирование оказали гидразоновые соединения (+)-110 и (+)-111 (13-15% остаточной активности). А модификация кольца А (+)-УК окислением надкислотами (соединение (+)-151) привела к слабой активации фермента (141% остаточной активности).

Среди соединений, производных УК, селективным ингибирующим действием по отношению к ПАРП1 обладают соединения с (+)-69, (+)-99, (+)-103 и (+)-104. Гидразоны УК (+)-110 и (+)-111 можно назвать селективными ингибиторами β -пол, хотя они оказали влияние также на ПАРП1.

Скрининг ингибирующей активности по отношению к ПАРП1 ещё 38 производных УК, относящихся к структурным группам флавоноидов, ауранов, тиазолов и тиоэфиров, не выявил соединений с заметной ингибирующей активностью. Результаты скрининга приведены в таблице 6. Из анализа данных этой таблицы можно заметить, что флавоны несколько активнее хальконов, а среди ауранов, умеренно ингибирующих ПАРП1, наиболее

заметное действие на фермент оказали соединения с пиридиновым заместителем при двойной связи.

Таблица 6 Ингибирующая активность производных УК по отношению к ПАРП1.

|  | | | | | |
|--|--------------------------------|------------|--------------------------------|------------|--------------------------------|
| Соединение | Остаточная активность ПАРП1, % | Соединение | Остаточная активность ПАРП1, % | Соединение | Остаточная активность ПАРП1, % |
| (+)-248 | 51 | (+)-250 | 56 | (+)-251 | 70 |
| (+)-255 | 35 | (+)-256 | 46 | (+)-259 | 31 |
| (+)-260 | 31 | (+)-263 | 56 | (+)-264 | 47 |
| (+)-261 | 65 | (+)-258 | 34 | (+)-262 | 61 |
|  | | | | | |
| (+)-180 | 68 | (+)-181 | 83 | (+)-183 | 78 |
| (+)-174 | 93 | (+)-182 | 84 | (+)-177 | 88 |
| Флавоноиды | | | | | |
| (+)-226 | 81 | (+)-228 | 71 | (+)-232 | 76 |
| (+)-240 | 28 | (+)-244 | 51 | (+)-245 | 41 |
|  | | | | | |
| (+)-195 | 62 | (+)-196 | 85 | (+)-197 | 67 |
| (-)-195 | 82 | (-)-196 | 71 | (-)-197 | 72 |
| (+)-198 | 67 | (+)-199 | 63 | (+)-200 | 76 |
| (-)-198 | 59 | (-)-199 | 68 | (-)-200 | 60 |

По общим результатам скрининга можно сделать следующие выводы. Производные УК ингибируют активность репарационного фермента ПАРП1 либо слабо, либо в умеренной

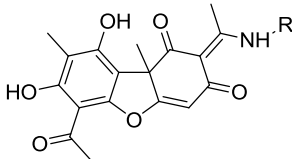
степени в концентрации 0.5 мМ. На степень подавления активности ПАРП1 влияет наличие и объём заместителей в УК. Так, наиболее ингибирующее влияние оказали соединения, содержащие в своей структуре дополнительное ароматическое кольцо. В отношении β -полимеразы активность производных УК менее выражена, однако, выявлены несколько производных, селективно ингибирующих β -полимеразу в заметной степени в концентрации 0.5 мМ, что немаловажно, учитывая отсутствие в настоящее время селективных ингибиторов этого фермента. Ингибиторов ПАРП2 среди производных УК не обнаружено.

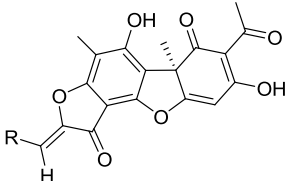
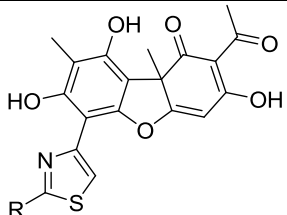
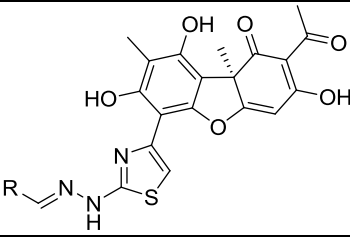
4.3.2 Влияние производных усниновых кислот на Tdp1.

Ещё одной из перспективных мишеней является репарационный фермент тирозил-ДНК-фосфодиэстераза1 (Tdp1). Этот фермент играет ключевую роль в удалении повреждений ДНК, создаваемых топоизомеразой 1 (Top1), ее ингибитором кампотечином и другими антираковыми препаратами, при этом ингибиторы Tdp1 могут увеличить цитотоксичность кампотечинов. Предполагается, что именно Tdp1 ответственна за лекарственную устойчивость некоторых видов рака^{323, 324}. Терапевтическим эффектом ингибиторов Tdp1 может быть селективное увеличение активности ингибиторов Top1 в опухолях с нарушениями в процессах репарации ДНК и контроля клеточного цикла. Количество опианных в литературе ингибиторов Tdp1 незначительно, и все они обладают мягким ингибирующим действием (в диапазоне 100-1 мкМ)^{325, 326, 323}.

В лаборатории биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН изучено влияние на активность Tdp1 энантиомеров УК и более 50 их производных. Экспериментальные данные по ингибирующей активности соединений в отношении Tdp1 приведены в таблице 7. Поскольку известные ингибиторы Tdp1 проявляют активность в более чем 1 мкМ концентрации, то в таблице жирным шрифтом выделены соединения с ингибирующей концентрацией 1 мкМ и ниже.

Таблица 7. Ингибирующая активность производных УК по отношению к Tdp1.

| Соединение | ИК ₅₀ , мкМ | Соединение | ИК ₅₀ , мкМ |
|--|------------------------|----------------|------------------------|
| (+)- 1 | > 15 | (-)- 1 | > 15 |
|  | | | |
| (+)- 55 | 0.16±0.04 | (-)- 70 | 1.62±0.07 |
| (+)- 56 | <1.5 | (-)- 71 | 0.94 ±0.42 |
| (+)- 58 | >15 | (+)- 71 | 1.54±0.05 |

| | | | |
|--|-------------|---------|-------------|
| (+)-60 | >15 | (+)-72 | 0.26±0.03 |
| (+)-63 | >5 | (-)-72 | 0.57±0.15 |
| (+)-64 | >15 | (+)-73 | 0.75±0.33 |
| (+)-68 | >5 | (-)-74 | 1.39 ±0.62 |
| (-)- 69 | 1.92 ±0.50 | (-)-81 | 2.5 |
|  | | | |
| (+)-247 | 0.98±0.26 | (+)-255 | >1.5 |
| (+)-248 | 1.22±0.15 | (+)-256 | 0.102±0.18 |
| (+)-249 | 0.1 | (+)-258 | 0.86±0.39 |
| (+)-250 | 0.78±0.36 | (+)-260 | 0.81±0.28 |
| (+)-251 | >1.5 | (+)-267 | 15 |
| (+)-252 | 1.5 | (+)-268 | 15 |
| (+)-253 | 1.5 | (+)-269 | 1.5 |
| (+)-254 | 1.5 | | |
|  | | | |
| (+)-195 | >1.5 | (-)-195 | >1.5 |
| (+)-196 | 1.12±0.45 | (-)-196 | 0.73±0.25 |
| (+)-199 | >1.5 | (-)-199 | >1.5 |
| (+)-197 | >1.5 | (+)-200 | >1.5 |
|  | | | |
| (+)-201 | 0.172±0.007 | (+)-204 | 0.150±0.035 |
| (+)-202 | 0.457±0.178 | (+)-207 | 0.192±0.075 |
| (+)-203 | 0.158±0.045 | | |
| Флавоноиды | | | |
| (+)-226 | >1.5 | (+)-244 | 0.81±0.39 |
| (-)-226 | >1.5 | (+)-245 | 0.69±0.27 |

| | | | |
|----------------|------------------|--|--|
| (-)-228 | >1.5 | | |
| (+)-232 | >1.5 | | |
| (-)-232 | 0.74±0.34 | | |

По результатам скрининга, приведённым в таблице 7, можно отметить, что высокой ингибирующей активностью по отношению к Tdp1 обладают многие производные УК. Можно заметить, что относительно невысокую активность проявляют энантиомеры УК и енамины с алифатическим заместителем (**58, 60, 63, 64, 68, 81**). Измеренная ингибирующая концентрация для енаминовых соединений с ароматическим заместителем (**69-74**) составила менее 2 мкМ, причём наличие заместителя в ароматическом кольце имеет значение. Атомы брома (соединения **(+)-72, (+)-73**) и гидроксильная группа и **((+)-55**) позволяют снизить ингибирующую концентрацию соединения до 10^{-7} М. Для соединений **(+)-69** и **(+)-72** подтверждён выраженный синергетический эффект при совместном действии с известным антинеопластическим средством кампотечином на опухолевых клетках MDA (рак молочной железы), а для соединений **(+)-71** и **(+)-73** на клетках MCF-7 (также рак молочной железы). Аналогичная тенденция в зависимости «структура-активность» наблюдается для производных (+)-УК группы ауранов – наиболее низкими ингибирующими концентрациями обладают аураны с шестичленным ароматическим кольцом, т.е. имеющие замещённый фенильный или пиридилный заместитель. Среди них наиболее активны (ИК₅₀ 0.1 мкМ) *para*-бром- **(+)-249** и диметокси- **(+)-256** замещённые производные. Фурановый или же алифатический фрагмент повышают действующую концентрацию соединений до 1.5 – 15 и более мкМ. Метоксизамещённые хальконы и флавоны активнее (ИК₅₀ <1 мкМ) своих незамещённых аналогов (**226**) и халькона с хлором в пара-положении бензольного кольца **((+)-228)**.

Нами обнаружен класс производных УК с выдающейся ингибирующей активностью по отношению к Tdp1. Соединения, содержащие тиазольный цикл с фенилгидразоновым заместителем, ингибируют активность фермента в диапазоне концентраций 0.150-0.457 мкМ. Очевидно, что гидразоновый фрагмент играет важнейшую роль в связывании с ферментом, поскольку соединения сходного строения, но имеющие вместо гидразонового аминный фрагмент (**199, 200**), или же содержащие углеводородный заместитель (**195-197**) в тиазольном цикле, на два порядка менее активны.

Для большинства соединений не исследовались пары энантиомеров, поэтому на данном этапе нельзя сделать выводы о влиянии строения хирального центра на ингибирующую активность соединений.

Полученные данные позволяют рассматривать производные УК как высокоперспективные компоненты для комбинированной терапии рака в комплексе с известным антинеопластическим средством кампотечином.

4.4 Антимикобактериальная активность производных усниновых кислот

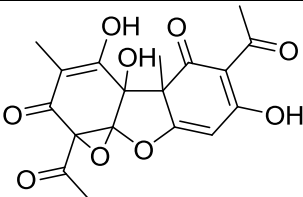
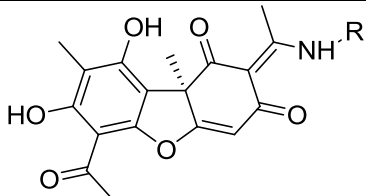
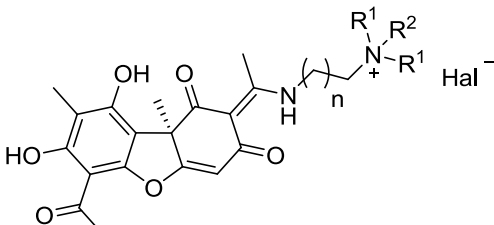
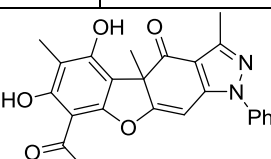
Туберкулез является причиной около 2 миллионов смертей в год во всем мире. Одной из причин трудности лечения этой болезни является массовое возникновение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у возбудителя туберкулеза, как к традиционным противотуберкулезным лекарствам, так называемого первого ряда (особенно к рифампицину и изониазиду), так и к препаратам второго ряда (фторхинолонам и аминогликозидам).

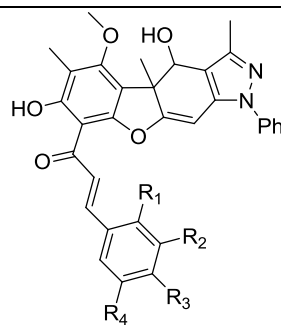
Из литературных данных известно, что оба энантиомера УК проявляют заметную противотуберкулёзную активность в концентрациях 23-46 мкМ⁷⁴. При этом ни одно из протестированных авторами работы¹⁰ полусинтетических производных УК не показало антимикобактериальной активности выше, чем нативные УК.

Синтезированные нами производные УК были протестированы в лаборатории генетики микроорганизмов Института общей генетики РАН в тест-системе *Mycobacterium smegmatis* mc2 для выявления потенциальных противотуберкулёзных агентов. *M. smegmatis* является быстрорастущей непатогенной бактерией и используется в качестве модельного организма по отношению к микобактериям туберкулеза и для первичного скрининга противотуберкулезных препаратов³²⁷. Критерием отбора является концентрация вещества на диске, которая должна быть не более чем 10 нМ. Метод испытания включает количественную оценку зоны подавления роста вокруг бумажных дисков, пропитанных тестируемыми соединениями при культивировании микобактерий на агаризованной среде. В таблице 8 приведены экспериментальные данные по скринингу производных УК в этой тест-системе.

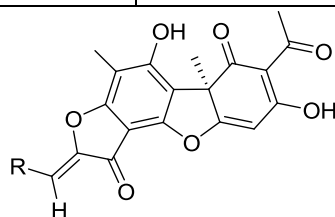
Таблица 8. Минимальная ингибирующая концентрация производных УК в отношении *M. smegmatis*.

| Соединение | <i>M. smegmatis</i> Зона ингиб./ МИК мм/ нмоль на диск | Соединение | <i>M. smegmatis</i> Зона ингиб./ МИК мм/ нмоль на диск |
|------------|--|------------|--|
| (+)-1 | 8/75 | (-)-1 | 8/75 |

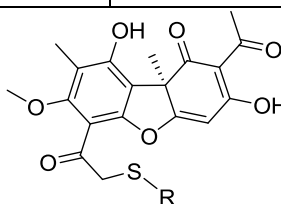
| | | | |
|--|---------------|----------------|---------------|
|  | | | |
| (+)-151 | 8/75 | (-)-151 | неактив |
|  | | | |
| (+)-28 | 8/75 | (-)-28 | 7.5/100 |
| (+)-55 | 8/75 | (-)-55 | 7.5/100 |
| (+)-59 | 7.5/100 | (-)-59 | 8/100 |
| (+)-69 | 8/100 | (-)-69 | 7.5/100 |
| (+)-70 | 8/75 | (-)-70 | 8/100 |
| (+)-72 | 8/75 | (-)-72 | 8/75 |
| (+)-73 | 8/100 | (-)-73 | 8/100 |
| (+)-74 | 8/50 | (-)-74 | 8/75 |
| (+)-60 | 9.5/10 | (+)-109 | 7.3/100 |
|  | | | |
| (+)-64 | 7.5/10 | (-)-64 | 7.5/10 |
| (+)-66 | 7.5/10 | (-)-66 | 7.7/10 |
| (+)-67 | 9/20 | (-)-67 | 8/20 |
| (+)-68 | 8.5/20 | (-)-68 | 7.5/20 |
| (+)-65 | 9/20 | | |
|  | | | |
| (+)-35 | неактив | (-)-35 | неактив |



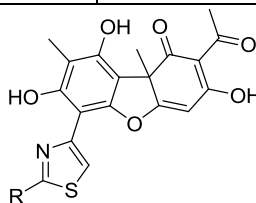
| | | | |
|----------------|---------|----------------|---------|
| (+)-226 | неактив | (-)-226 | неактив |
| (+)-228 | неактив | (-)-228 | неактив |
| (+)-232 | 8/75 | (-)-232 | неактив |



| | | | |
|----------------|--------------|----------------|----------------|
| (+)-246 | неактив | (+)-249 | 7.5/100 |
| (+)-247 | 7.5/100 | (+)-250 | 7.2/100 |
| (+)-248 | 7.5/100 | (+)-251 | 7.5/100 |
| (+)-261 | 8/4.2 | (-)-261 | 7.5/4.2 |



| | | | |
|----------------|---------|----------------|------|
| (+)-177 | 9/100 | (+)-182 | 8/20 |
| (+)-180 | 7.5/100 | | |



| | | | |
|----------------|---------------|----------------|---------------|
| (+)-193 | 9/5 | (-)-193 | 8.5/5 |
| (+)-195 | 8/10 | (-)-195 | 10/10 |
| (+)-196 | 7.5/100 | (-)-196 | 8/100 |
| (+)-197 | 8/100 | (-)-197 | 7.5/10 |
| (+)-198 | 7.5/10 | (-)-198 | 7.5/10 |
| (+)-199 | 7.5/10 | | |
| (+)-200 | 7.5/10 | (-)-200 | 8/10 |
| (+)-203 | 8/100 | (+)-205 | 8/20 |

| | | | |
|---------|------|---------|-------|
| (+)-204 | 8/70 | (+)-206 | 8/100 |
|---------|------|---------|-------|

Из данных таблицы 8 видно, что оба энантиомера УК подавляют рост *M. smegmatis* в высокой концентрации. Многие тестированные соединения проявляют более высокую, чем УК, активность, но поскольку критерием отбора является концентрация 10 нМ в качестве перспективных кандидатов можно рассматривать только некоторые соединения. Активными по результатам тестирования в этой системе соединениями следует считать соединения с кватернизованным атомом азота ((±)-64, (±)-66), большинство тиазолов ((±)-193, (±)-195, ((±)-198, (+)-199, (±)-200)) и ауроны, полученные реакцией с фурфуролом ((±)-261).

Представленные в таблице 8 результаты скрининга четвертичных аммониевых солей позволяют проследить определенную зависимость активности соединения от структуры заместителя с кватернизованным атомом азота, увеличение длины линкера между атомами азота приводит к снижению активности соединения. Примерно та же тенденция наблюдается для тиазолов. Наиболее активны в тест-системе *Mycobacterium smegmatis* mc2 незамещенные аминотиазолы, а наименее – гидразинотиазолы ((+)-203-(+)-206), имеющие наиболее длинный и объёмный заместитель в тиазольном цикле. Самую высокую ингибирующую рост *M. smegmatis* активность из исследованных производных УК показали фурилиденфураноновые производные (оба энантиомера, (±)-261).

Для выявления возможного механизма антимикобактериального действия активные в системе *M. smegmatis* четвертичные аммониевые соли 64-68 тестировались в системе *Streptomyces lividans* APHVIII+. Тест *S. lividans* APHVIII+ выявляет ингибиторы серинтреониновых протеинкиназ эукариотического типа человека и бактерий (СТПК). СТПК, найденные в патогенных бактериях, играют ключевую роль в регуляции микробного выживания, вирулентности и патогенности. Они регулируют формирование бактериальных биопленок, устойчивость и выживаемость сложных популяций микроорганизмов, в том числе микобактерий. Поэтому подавление бактериальных протеинкиназ стало привлекательной мишенью для лечения инфекций. Определение активности вещества проводилось методом бумажных дисков. Экспериментальные данные приведены в таблице 9.

Таблица 9. Активность соединений 1, 64-68 в системе *S. lividans* APHVIII+

| Соединение | <i>S. lividans</i> APHVIII+ Зона ингиб. мм/ СИК ^а , |
|------------|---|
| (+)-1 | неактив/100 |
| (-)-1 | 9/100 |
| (+)-64 | Неактив/100 |

| | |
|--------|-------------|
| (-)-64 | Неактив/100 |
| (+)-66 | Неактив/100 |
| (-)-66 | Неактив/100 |
| (+)-67 | 14/20 |
| (-)-67 | 14/50 |
| (+)-68 | 14/70 |
| (-)-68 | 12/50 |
| (+)-65 | 12/20 |

а СИК – субингибирующая концентрация, нмоль/диск

Результаты тестирования соединений в системе *Streptomyces lividans* APHVIII+ показали, что механизм антимикобактериального действия соединений либо не связан с ингибированием серин-треониновых протеинкиназ, либо СПТК не являются основной мишенью в микроорганизмах. Для одного из активных в отношении *M. smegmatis* соединений с кватернизованным атомом азота (+)-66 была определена острая токсичность вещества. В эксперименте на инбредных мышах линии Balb/C, проводимом в течение 30 дней, была определена полуметальная доза вещества (ЛД₅₀), которая составила 975 мг/кг.

Соединения с наиболее выраженной активностью в отношении *M. smegmatis* тестировались в Центральном институте туберкулеза на культуре *M. tuberculosis* H37Rv. Проведенные исследования по оценке эффективности действия соединений (+)-193 и (-)-193 на микобактериях туберкулеза *in vitro* показали, что соединения обладают бактериостатической активностью в отношении лабораторного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv. Минимальная ингибирующая рост *M. tuberculosis* концентрация (+)-193 и (-)-193 по данным культуральных исследований в системе Bactec MGIT 960 составила 50 мкг/мл. В концентрации 25 мкг/мл (-)-193 более эффективен, т.к. задерживает рост микобактерий на 4 дня дольше, чем (+)-193. Исследование цитотоксического действия этих соединений на эукариотические клетки, проведенное на перитонеальных макрофагах мыши, показало, что соединение (+)-193 менее токсично, чем (-)-193. Лизис интактных макрофагов под воздействием соединения (+)-193 в концентрации 25 мкг/мл превышал спонтанный на 26%, тогда как аналогичная концентрация соединения (-)-193 приводила к гибели большинства макрофагов в течение 3 дней.

Наиболее полное исследование активности в отношении *M. tuberculosis* H37Rv проводилось для соединений (+)-261 и (-)-261 в рамках выполнения государственного контракта № 12411.1008799.13.002 от 25 апреля 2012 г. «Доклинические исследования противотуберкулезного лекарственного средства на основе полусинтетических производных усниновой кислоты», Шифр «2.1 Кислота 2012». Исследовано бактерицидное действие

соединения **(-)-261** с определением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в отношении *M. tuberculosis* H37Rv и МЛУ-штамма (5 мкг/мл). Его минимальная бактерицидная концентрация составила 25 мкг/мл, вещество обладает бактерицидной активностью как в отношении чувствительного лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, так и клинического штамма с МЛУ.

Таким образом, нами обнаружена высокая противотуберкулёзная активность некоторых производных УК: соединений, содержащих аминотиазольный (соединения **(+)-193** и **(-)-193**), фурилиденфураноновый (соединения **(+)-261** и **(-)-261**) фрагменты и соединений типа четвертичных аммониевых солей (**64-68**). Изучение влияния структуры вновь введённого фрагмента на активность производных в отношении микобактерий показало, что замена первичной аминогруппы в тиазоле на вторичную аминогруппы, алкильные или ароматические фрагменты приводит к снижению биологической активности, а замена фуранового кольца в фурилиденфураноновом производном на бензольное приводит к полной потере активности. Увеличение длины линкера между атомами азота в кватернизованных соединениях приводит к снижению активности соединений.

4.5 Гиполипидемическая активность (+)-усниновой кислоты и её производных

В настоящее время не вызывает сомнений, что ведущим фактором риска атеросклеротических поражений является повышение концентрации общего холестерина в крови, и особенно холестерина, содержащегося в липопротеинах низкой плотности (так называемый "плохой холестерин"). Актуальность и приоритетность применения современных липид- и холестерин- снижающих лекарственных средств у лиц с гиперхолестеринемией, атеросклерозом и сердечно-сосудистыми заболеваниями не вызывают сомнений. Многочисленными исследованиями доказано, что медикаментозное снижение уровня липидов и, особенно, холестерина крови приводит к снижению риска развития осложнений атеросклеротических заболеваний, к регрессии атеросклеротических очагов артерий, к купированию в них воспалительного процесса и, в конечном счете - к снижению сердечнососудистой смертности.

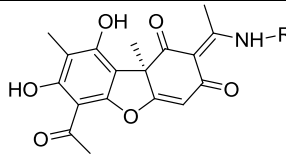
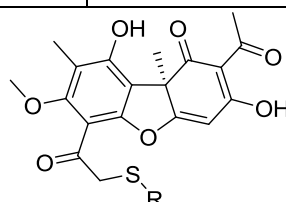
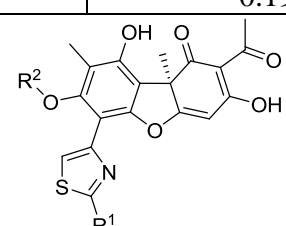
В настоящее время в мировой практике проводятся разработки препаратов, регулирующих количество уже синтезированного организмом или полученного с пищей холестерина и позволяющих поддерживать его количество в приемлемых рамках. В плазме крови холестерин в основном находится в составе липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Из крови ЛПНП поступают в печень (до 75%) и другие ткани, где они связываются ЛПНП-рецепторами, после чего транспортируются внутрь клеток. Уровень экспрессии ЛПНП-

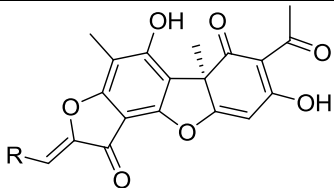
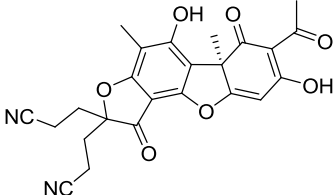
рецепторов зависит от внутриклеточной концентрации холестерина и регулируется преимущественно на транскрипционном уровне по механизму отрицательной обратной связи³²⁸. Так как избыточные ЛПНП значительно повышают риск атеросклероза из-за неспецифического накопления в стенках сосудов, мембранные ЛПНП-рецепторы играют ключевую роль в регуляции концентрации холестерина в крови. По этой причине лекарственные соединения, способствующие увеличению экспрессии ЛПНП рецепторов клетками печени, будут эффективны для снижения концентрации холестерина в плазме крови. Поскольку механизм действия соединений - регуляторов экспрессии гена ЛПНП, не включает в себя ингибирование биосинтеза холестерина, убихинона и связанных соединений, есть основания полагать, что препараты такого типа будут свободны от побочных эффектов, присущих наиболее широко распространённым на рынке гиполипидемическим препаратам - статинам.

Нами изучено влияние УК и её производных в концентрациях 5, 10, 20, 40 мкг/мл на уровень экспрессии (возрастание в соответствующее число раз) гена ЛПНП в клетках линии HepG2; уровень экспрессии измеряли относительно контрольного образца без добавления тестируемых соединений. В качестве препарата сравнения использовали другое природное вещество, гиполипидемическая активность которого хорошо известна – алкалоид берберин. Нами обнаружено, что (+)-УК в значительной степени (эффективнее, чем берберин) увеличивает экспрессию гена ЛПНП при концентрациях 10 мкг/мл и более, однако, в эффективных концентрациях она является токсичной для здоровых клеток. Целью исследования было найти такое производное УК, которое проявляло бы гиполипидемические свойства в диапазоне нетоксичных концентраций. Были протестированы некоторые производные УК, представляющие различные структурные типы, данные скрининга цитотоксической активности соединений и уровня экспрессии гена ЛПНП приведены в таблице 10.

Таблица 10. Относительная цитотоксичность производных УК и влияние различных концентраций соединений на уровень экспрессии гена ЛПНП.

| | Концентрация (мкг/мл) | относительная цитотоксичность | Экспрессия гена ЛПНП |
|----------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| (+) -1 | 40 | 0.11 | 5.85 |
| | 20 | 0.41 | 6.75 |
| | 10 | 0.26 | 2.41 |
| | 5 | 1.74 | 1.13 |
| берберин | 40 | 0.51 | 4.93 |
| | 20 | 0.84 | 3.26 |
| | 10 | 1.34 | 0.48 |
| | 5 | 1.37 | 1.32 |

| | | | |
|---|----|-------------|-------------|
| (+) -213 | 40 | 1.91 | 4.06 |
| | 20 | 1.16 | 3.18 |
| | 10 | 2.63 | 0.80 |
| | 5 | 1.07 | 0.80 |
| (+) -153 | 40 | 2.46 | 1.01 |
| | 20 | 8.12 | 0.63 |
| | 10 | 4.58 | 0.66 |
| | 5 | 3.21 | 1.01 |
|  | | | |
| (+) -63 | 40 | 0.04 | 7.03 |
| | 20 | 1.12 | 5.97 |
| | 10 | 1.45 | 3.17 |
| | 5 | 0.70 | 1.69 |
| (+) -68 | 40 | 0.91 | 2.05 |
| | 20 | 0.62 | 1.47 |
| | 10 | 1.19 | 1.00 |
| | 5 | 0.28 | 0.96 |
|  | | | |
| (+) -174 | 40 | 0.22 | 3.58 |
| | 20 | 0.24 | 1.68 |
| | 10 | 0.41 | 1.70 |
| | 5 | 0.31 | 1.99 |
| (+) -177 | 40 | 0.34 | 1.33 |
| | 20 | 1.14 | 0.93 |
| | 10 | 1.37 | 1.29 |
| | 5 | 1.51 | 0.90 |
| (+) -180 | 40 | 0.05 | 9.88 |
| | 20 | 0.06 | 0.00 |
| | 10 | 1.26 | 0.60 |
| | 5 | 0.10 | 1.46 |
| (+) -181 | 40 | 1.43 | 2.46 |
| | 20 | 1.51 | 2.02 |
| | 10 | 1.14 | 1.15 |
| | 5 | 1.02 | 1.07 |
| (+) -183 | 40 | 0.36 | 5.84 |
| | 20 | 0.27 | 1.79 |
| | 10 | 1.69 | 0.69 |
| | 5 | 0.19 | 2.34 |
|  | | | |

| | | | |
|---|----|-------------|-------------|
| (+) -194 | 40 | 0.41 | 4.31 |
| | 20 | 0.16 | 5.70 |
| | 10 | 2.52 | 0.90 |
| | 5 | 1.95 | 1.25 |
| (+) -195 | 40 | 0.72 | 3.91 |
| | 20 | 0.33 | 2.98 |
| | 5 | 0.14 | 3.77 |
| (+) -196 | 40 | 0.93 | 2.58 |
| | 20 | 0.91 | 2.96 |
| | 10 | 1.86 | 3.17 |
| | 5 | 1.45 | 2.98 |
| (+) -197 | 40 | 0.31 | 3.84 |
| | 20 | 1.63 | 2.20 |
| | 10 | 3.93 | 0.70 |
| | 5 | 0.04 | 0.41 |
| (+) -198 | 40 | 0.37 | 4.21 |
| | 20 | 1.27 | 0.88 |
| | 10 | 0.70 | 0.59 |
| | 5 | 1.27 | 0.71 |
| (+) -199 | 40 | 2.29 | 1.65 |
| | 20 | 5.14 | 1.71 |
| | 10 | 2.82 | 3.15 |
| | 5 | 0.90 | 2.63 |
| (+) -200 | 40 | 0.80 | 3.09 |
| | 20 | 1.27 | 4.39 |
| | 10 | 0.12 | 3.07 |
| | 5 | 0.48 | 2.65 |
|  | | | |
| (+) -251 | 10 | 0.99 | 4.91 |
| | 5 | 0.74 | 3.68 |
| (+) -260 | 40 | 3.60 | 3.26 |
| | 20 | 0.78 | 1.53 |
| | 10 | 1.01 | 0.80 |
| | 5 | 1.29 | 0.51 |
| (+) -261 | 40 | 0.07 | 4.53 |
| | 20 | 0.31 | 3.02 |
| | 10 | 0.59 | 4.67 |
| | 5 | 0.49 | 2.70 |
| (+) -264 | 40 | 1.29 | 4.09 |
| | 20 | 1.35 | 4.84 |
| | 10 | 0.55 | 3.86 |
| | 5 | 2.56 | 0.93 |
|  | | | |

| | | | |
|----------|----|------|------|
| (+) -223 | 40 | 1.65 | 2.59 |
| | 20 | 2.72 | 1.13 |
| | 10 | 3.94 | 1.06 |
| | 5 | 1.61 | 0.98 |

Из анализа данных таблицы 10 можно выделить структурную группу тиазолсодержащих производных УК, среди которых несколько соединений ((+)-**196**, (+)-**199**, (+)-**200**) экспрессируют уровень гена ЛПНП хоть и в меньшей степени, чем УК, но в безопасных для терапевтического использования диапазонах концентраций. Среди перспективных производных УК также соединения структурноподобные ауранам, содержащие пара-метоксифенильный ((+)-**251**) и тиофеновый ((+)-**264**) заместители. В значительной степени, сравнимой с таковой УК, повышает экспрессию гена енаминового производное УК (+)-**63**, содержащее морфолиновый заместитель, при этом его эффективные концентрации ниже, чем у УК, а токсичность проявляется в более высоких концентрациях. Также следует отметить гидроксिलированное производное УК (+)-**213**, которое не токсично во всём диапазоне исследованных концентраций, при этом повышает уровень экспрессии гена ЛПНП в разы.

Важно отметить, что некоторые соединения ((+)-**199**, (+)-**196**, (+)-**200**, (+)-**251**) существенно повышают экспрессию гена ЛПНП уже в концентрации 5 мкг/мл, являясь при этом нетоксичными.

Таким образом, нами показана перспективность использования ряда синтетических производных УК в качестве гипохолестеринемических агентов, что подтверждается экспериментальными данными о выраженном эффекте ряда производных в отношении экспрессии гена рецептора липопротеидов низкой плотности, не уступающем по значениям известному регулятору уровня холестерина берберину. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности поиска среди производных УК новых гиполипидемических агентов и дальнейших исследований этих соединений *in vivo*.

4.6 Инсектицидная активность усниновой кислоты и её производных

В Институте систематики и экологии животных (ИСЭЖ) СО РАН изучались синергетические свойства УК в качестве компонента инсектицидов на основе энтомопатогенных грибов. Исследования проводились на гусеницах пчелиной огнёвки (*Galleria mellonella*), личинках колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) и гусеницах непарного шелкопряда (*Limantria dispar*). Наиболее чувствительны к действию (+)-УК оказались гусеницы непарного шелкопряда, смертность которых при использовании 0.01%

УК в препарате на основе *Metarhizium anisopliae* увеличилась в 10 раз. Для других видов насекомых и для препаратов с использованием гриба *Beauveria bassiana* синергетический эффект УК также был хорошо выражен, приводя к увеличению смертности в 2-4 раза в сравнении с действием индивидуального биопрепарата. В полевых экспериментах продемонстрировано, что биологическая эффективность коммерческих биопрепаратов «боверин» и «битоксибацилин», а также коммерческих вирусных инсектицидных препаратов «вириин-диприон» и «вириин НШ» при добавлении в них 0.01% (+)-УК повышается в 2-3 раза.

Скрининг инсектицидных свойств производных (+)- и (-)-УК по отношению к колорадскому жуку проводился также в ИСЭЖ СО РАН в лаборатории патологии насекомых. Биотестирование проводили на личинках 3-го возраста колорадского жука с целью выявить среди производных УК возможных синергистов энтомопатогенного гриба *B. bassiana*. Оценка возможности применения наиболее перспективных соединений проводилась в полевых условиях против личинок колорадского жука.

Первичный скрининг производных УК показал, что большинство из 35 тестируемых соединений, синтезированных на основе как (+)-, так и (-)-УК, в концентрации 0.05% не вызывают достоверного увеличения уровня смертности личинок по сравнению с монозаражением *B. bassiana* (смертность на уровне 40%). Введение в структуру молекулы УК енаминового (соединения (+)-**58**, (+)-**62**, (-)-**62**, (+)-**59**, (-)-**59**) и енаминокислотного ((+)-**77**, (-)-**77**) фрагментов в большинстве случаев не повысило показатели тестируемой активности. Практически все исследованные пиразольные производные УК ((+)-**93** - (+)-**98**, (+)-**102**, (+)-**104** - (+)-**106**, (+)-**108**) также не вызвали достоверного повышения уровня смертности личинок. Небольшое, но статистически значимое, увеличение смертности (15–35%, $P < 0.05$) наблюдали при обработке соединениями (-)-**1**, (+)-**69**, (+)-**103**, (+)-**110**. Следует отметить, что все они относились к разным типам производных. Отметим, (-)-энантиомер УК проявил большую, чем соответствующий (+)-изомер, энтомоцидную активность, тогда как для остальных пар энантиомеров (соединения **59**, **62**, **77**) активность либо не различалась, либо незначительно токсичнее был (+)-энантиомер. Наибольшее достоверное увеличение уровня смертности личинок вызвала смесь полифторсодержащих производных УК (соединения (+)-**130** и (+)-**131**, соотношение 5:2 по ЯМР), полученная в реакции (+)-УК с гексафторпропеном (рис. 34).

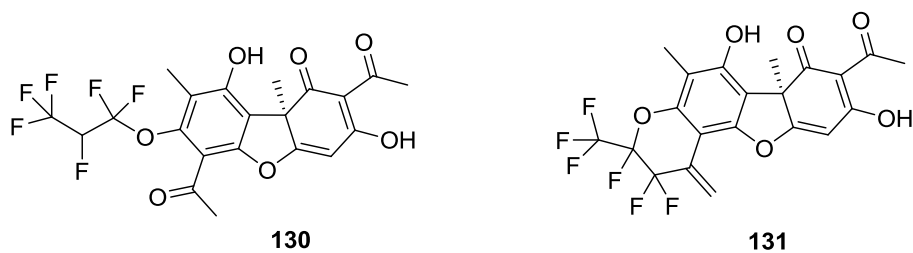


Рисунок 34. Структура соединений **130** и **131**.

Каждое из этих производных в отдельности было протестировано на личинках III возраста колорадского жука и, было показано, что оба соединения обладают инсектицидной активностью: Регрессионный анализ показал отсутствие достоверных различий в смертности личинок от соединений (+)-**130** и (+)-**131**. Однако отмечена тенденция увеличения смертности от соединения (+)-**131**. Так, при концентрациях 0,01%, 0,02% и 0,05% в данном случае отмечена 35, 75 и 100% смертность соответственно, тогда как от соединения (+)-**130** – 20, 40 и 95% соответственно. Во всех случаях отмечалась задержка роста и линьки личинок, обработанных исследуемыми компонентами. На основании данных об инсектицидном действии смеси (+)-**130** и (+)-**131**, сравнимом с активностью ее отдельных компонентов, а также вследствие нерентабельности хроматографического разделения этих соединений, в полевых тестах соединения (+)-**130** и (+)-**131** не разделяли, а использовали как композицию.

В полевом эксперименте, проведенном в условиях Юго-Восточного Казахстана, наблюдался синергизм действия смеси (+)-**130** и (+)-**131** и *B. bassiana*. При этом смертность от обработки смесью (+)-**130** и (+)-**131** не отличалась от контроля, составляя лишь 4%. Биологическая эффективность при внесении смеси агентов составила 98%, а при внесении гриба – 62%. Важно отметить, что в вариантах «(+)-**130** и (+)-**131**» и «*B. bassiana* + (+)-**130** и (+)-**131**» отмечена слабая поврежденность листьев. Дефолиация картофеля на 10–12 сут опыта составляла в этих случаях всего лишь 15–20%, тогда как в варианте «*B. bassiana*» – 60–70%, а в контроле – 80–90%.

Таким образом, наиболее перспективным синергистом *B. bassiana* оказалась смесь полифторсодержащих соединений – (+)-**130** и (+)-**131**. Данные соединения обладали антифидантными свойствами и, по всей видимости, вызывали кишечный токсикоз, приводя к гибели части особей и задержке развития выживших личинок. Указанные явления приводили к резкому повышению чувствительности личинок к энтомопатогенному грибу, проникающему в тело хозяина через наружные покровы. Подобные эффекты нередко наблюдают при бинарной обработке насекомых грибами и агентами (биологическими или химическими) с выраженным кишечным или системным механизмом действия. Выявленное сочетание может быть перспективным для создания высокоэффективных комбинированных препаратов против личинок колорадского жука.

4.7 Заключение

Таким образом, в результате изучения биологической активности полученных нами в процессе настоящей работы производных УК было обнаружено, что часть из них можно рассматривать в качестве соединений-лидеров для разработки новых лекарственных средств, а именно:

- впервые обнаружены производные УК, обладающие заметной противовирусной активностью в отношении штамма вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1pdm09). Показано, что производные (+)-УК, как правило, проявляют более высокую ингибирующую активность, чем сама (+)-УК, в то время как левовращающие производные менее активны, чем природная (-)-УК. Выявлена зависимость противовирусной активности производных УК, содержащих фрагмент халкона, от расположения метоксигрупп в ароматическом кольце халконового фрагмента.

- установлено, что производные УК, структурноподобные ауранам и хальконам (соединения **226-228**, **246-251**, **257**), обладают значительной цитотоксической активностью в отношении некоторых опухолевых линий клеток крови.

- обнаружен новый класс соединений, содержащих гидразинотиазольный фрагмент (соединения **201-204**, **207**), обладающих выдающейся ингибирующей активностью по отношению к репарационному ферменту Tdp1, эти соединения можно рассматривать как высокоперспективные компоненты для комбинированной терапии рака в комплексе с противораковыми препаратами ингибиторами Top1. Установлено, что изменение структуры через замену гидразинового фрагмента на аминный приводит к потере ингибирующей активности.

- показано, что производные УК, содержащие енаминовый фрагмент с ароматическим заместителем, обладают высокой ингибирующей способностью в отношении Tdp1, для соединения (+)-**72** подтверждён выраженный синергетический эффект при совместном действии с известным антинеопластическим средством кампотечином на опухолевых клеточных линиях MDA (рак груди), а для соединения (+)-**55** на клеточных линиях MCF. Выявлены структурные закономерности, влияющие на ингибирующую активность енаминовых производных.

- выявлены производные УК, обладающие селективным ингибирующим эффектом в отношении репарационных ферментов PARP1 или β -полимеразы.

- обнаружена высокая противотуберкулёзная активность некоторых производных УК: соединений на основе обоих энантиомеров УК, содержащих аминотиазольный (соединения

(+)-**193** и (-)-**193**) и фурилиденфураноновый (соединения (+)-**261** и (-)-**261**) фрагменты. Изучено влияние структуры вновь введённого фрагмента на активность производных в отношении микобактерий. Показано, что замена первичной аминогруппы в тиазоле на вторичную аминогруппы, алкильные или ароматические фрагменты приводит к снижению биологической активности, а замена фуранового кольца в фурилиденфураноновом производном на бензольное приводит к полной потере активности. Сочетание высокой активности и низкой токсичности соединения (-)-**261** привело к продолжению исследования его биологической активности в рамках государственного контракта № 12411.1008799.13.002 от 25 апреля 2012 г. «Доклинические исследования противотуберкулезного лекарственного средства на основе полусинтетических производных усниновой кислоты», Шифр «2.1 Кислота 2012»

- найдены новые соединения на основе УК, позволяющие эффективно повышать уровень экспрессии гена липопротеинов низкой плотности в нетоксичных концентрациях, что позволяет рассматривать их как перспективные гиполипидемические препараты.

- выявлены производные УК - перспективные синергисты энтомопатогенного гриба *B. bassiana*. Использование смеси полифторсодержащих соединений – (+)-**130** и (+)-**131**, приводит к резкому повышению чувствительности личинок к энтомопатогенному грибу. Выявленное сочетание может быть перспективным для создания высокоэффективных комбинированных препаратов против личинок колорадского жука.

Результаты, изложенные в настоящей главе, опубликованы нами в следующих публикациях: 276, 329, 311, 330, 265, 331, 278, 312, 332, 333, 334, 335, 336, 337.

5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

(+)-Усниновую кислоту **1** $\{[\alpha]_{\text{D}}^{20} +478 (c 0.1; \text{CHCl}_3)\}$ выделяли из смеси лишайников рода *Usnea*, (-)-усниновую кислоту $\{[\alpha]_{\text{D}}^{20} -458 (c 0.1; \text{CHCl}_3)\}$ выделяли из лишайника *Cladonia Stellaris* по методике²⁵⁵.

Оптимизация выделения (-)-УК и (+)-УК

Сначала воздушно-сухую порцию лишайника измельчали на ножевой мельнице (мощность 4 кВт, частота вращения ротора 1400 об/мин, диаметр отверстий в сменной решетке, регулирующей измельчение – 10 мм, производительность 20-50 кг/час). Полученное таким образом сырье загружали в аппарат для экстракции (объем 100 л, эмалированная внутренняя поверхность, обогрев паром) и дважды кипятили с хлороформом.

1 экстракция. Загрузка 8.7 кг измельченного лишайника загружали в аппарат, заливали 63 л хлороформа, кипятили 3 часа. Затем хлороформ сливали (было слито 58 л), отогнали из слитого экстракта 53 л на перегонной установке (объем 63 л, эмалированная внутренняя поверхность, обогрев паром). Кубовый остаток составил 1.5 л (потеря 3.5 л).

2 экстракция. Не выгружая из аппарата сырье, заливали 53 л хлороформа, кипятили 3 часа. Хлороформ сливали (было слито 53 л), отогнали из слитого экстракта 50 л на перегонной установке. Кубовый остаток составил 1.5 л (потеря 1.5 л). Общая потеря хлороформа после двух экстракций составила 13 л.

Кубовые остатки после двух экстракций объединяли, фильтровали через бумажный фильтр методом горячего фильтрования и дополнительно концентрировали на ротационном испарителе до объема 1 л. УК осаждалась из сконцентрированного раствора путем добавления трех объемов этилового спирта (3 л). По истечении суток осадок отфильтровывали через бумажный фильтр и промывали этанолом.

Выделяли 155.4 г (-)-усниновой кислоты, что составило 1.78% от массы сырья. $\alpha_{\text{D}}^{23} = -457 (c=0.6, \text{CHCl}_3)$.

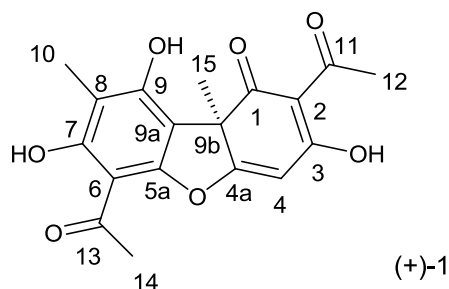
Выделяли 310.8 г (+)-усниновой кислоты, что составило 3.57% от массы сырья. $\alpha_{\text{D}}^{23} = +483 (c=0.6, \text{CHCl}_3)$.

Контроль чистоты полученной УК осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Измерения выполнялись на метрологически аттестованном оборудовании: хроматограф жидкостной микроколоночный «Милихром А-02», представляющий собой аналитический комплекс функционально объединенных средств измерений, вспомогательных устройств и программного обеспечения, который обеспечивает

разделение и исследование растворов смесей веществ методом высокоэффективной микроколоночной хроматографии. Использовали колонку 2×75 мм, заполненную сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ (BISCHOF) и термостатированную при 35 °С. Детекцию осуществляли в многоволновом режиме (210, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 360 нм), а после сканирования ультрафиолетового спектра в процессе хроматографирования веществ использовали длины волн 240, 260, 280 нм. Элюент: А – 0.1% ТФУ (трифторуксусная кислота), Б – метиловый спирт, скорость элюирования 150 мкл/мин, использовали изократический режим элюции – 80% метиловый спирт – 0.1% ТФУ.

Хроматографическая чистота выделенной (+)-УК составила 99.9%.

Нумерация атомов в соединениях дана для отнесения сигналов в спектрах ЯМР на основе общепринятой нумерации для структуры усниновой кислоты и не всегда совпадает с нумерацией атомов в номенклатурном названии.



Спектральные характеристики соединений приведены только для синтезированных на основе (+)-УК. Для их энантиомеров, полученных на основе (-)-УК приведены только номенклатурные названия и значения удельного вращения.

Аналитические и спектральные исследования были выполнены в Химическом Сервисном Центре коллективного пользования СО РАН.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C записывали на спектрометрах AV-400 фирмы Bruker с рабочей частотой 400.13 МГц для ^1H и 100.61 МГц для ^{13}C , DRX-500 фирмы Bruker с рабочей частотой 500.13 МГц для ^1H и 125.76 МГц для ^{13}C для растворов веществ в CDCl_3 . В качестве внутреннего стандарта использовали сигналы растворителя – хлороформа (δ_{H} 7.24 м.д., δ_{C} 76.90 м.д.). Строение соединений устанавливали методом ЯМР на основании анализа спектров ЯМР ^1H с использованием спектров двойного резонанса ^1H - ^1H и двумерных спектров гомоядерной ^1H - ^1H корреляции (^1H - ^1H COSY), а также анализа спектров ЯМР ^{13}C с привлечением двумерной гетероядерной корреляционной спектроскопии ^{13}C - ^1H COSY ($^1\text{J}_{\text{C,H}}$ 160 Гц) и SOLOC ($^2,3\text{J}_{\text{C,H}}$ 10 Гц). Для определения величин прямых КССВ $^1\text{J}_{\text{C,H}}$ записывали спектр монорезонанса. Мультиплетность сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C определяли по

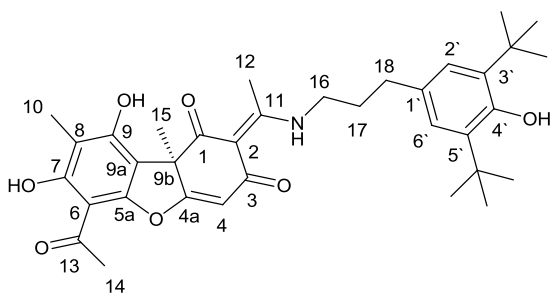
спектрам, записанным в режиме J-модуляции (JMOD). Спектры ЯМР ^{19}F получены на спектрометре «Bruker WP 400 SY» (188 МГц) относительно внутренних эталонов ГМДС, C_6F_6 . Масс-спектры (энергия ионизирующих электронов 70 эВ) регистрировали на масс-спектрометре высокого разрешения DFS Thermo Scientific. ИК-спектры записывали на спектрометре Vector22 (KBr). Температуру плавления измеряли на столике Кофлера. Удельное вращение выражено в $(\text{град}\cdot\text{мл})\cdot(\text{г}\cdot\text{дм})^{-1}$, а концентрации растворов в $\text{г}\cdot(100\text{ мл})^{-1}$.

Контроль реакции осуществлялся по ТСХ и по спектрам ЯМР ^1H . Для колоночной хроматографии использовался силикагель Merck (70-230 μ). Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинках Sorbfil (UV 254). Нумерация атомов в соединениях дана для отнесения сигналов в спектрах ЯМР и не всегда совпадает с нумерацией атомов в номенклатурном названии.

Синтез соединений 55-63.

К 1 ммоль УК 1 добавили 1.1 ммоль амина и растворили смесь в 12 мл этилового спирта. Кипятили на водяной бане 2-3 часа. Охладили, добавили 10 мл дистиллированной воды. Если выпадает осадок, то его отфильтровывали, промывали водой и сушили на воздухе. Если осадок не формируется или мелкодисперсный, экстрагировали хлороформом три раза, экстракт сушили над MgSO_4 б/в, растворитель отгоняли на вакуумном ротационном испарителе. Полученные осадок или экстракт хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - градиент метилового спирта в хлористом метиле от 0 до 10%.

(R,E)-6-ацетил-2-(1-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-пропиламино)этилиден)-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1,3(2H,9bH)-дион (+)-55. Светло-жёлтый аморфный порошок.



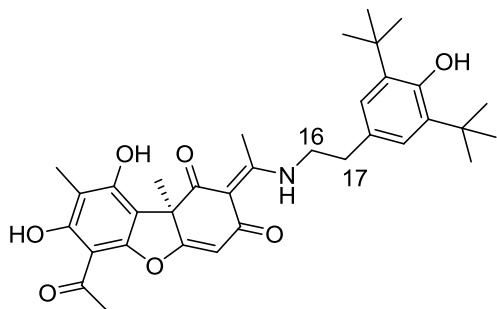
Выход 91%, т. пл. 83-87 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{29} +228$ (с 0.24, CHCl_3). ИК спектр (ν , см^{-1}): 1057, 1139, 1189, 1289, 1371, 1435, 1469, 1557, 1699, 2955, 3433, 3635. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.43 (18H, с, H-tBu), 1.69 (3H, с, H-15), 2.03 (2H, м, H-17), 2.09 (3H, с, H-10), 2.58 (3H, с, H-12), 2.67 (3H, с, H-14), 2.68 (2H, т, J = 7.5, H-18), 3.46 (2H, д.т, J = 7.2 и 6.4, H-16), 5.10 (1H, с, OH-4'), 5.78 (1H, с, H-4), 6.96 (2H, с, H-2' и H-6'), 12.04 (с, OH-9), 13.36 и 13.53 (с и ш.с, NH и OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.3 (C-10), 18.1 (C-12), 30.2 (6C-tBu), 30.5 (C-17), 31.0 (C-14), 31.8 (C-15), 32.5 и 34.2 (C-16,C-18), 43.1 (2C-tBu), 55.5 (C-9b), 101.3 (C-6), 102.4 (C-4), 102.4 (C-2), 105.9 (C-9a), 107.8 (C-8), 124.6 (C-2' и C-6'), 130.4 (C-1'), 136.2 (C-5' и C-3'), 152.2 (C-4'), 155.8 (C-

5a), 158.3 (C-9), 163.4 (C-7), 173.9 (C-11), 174.7 (C-4a), 189.9 (C-3), 198.1 (C-1), 200.5 (C-13).

Найдено: m/z 589.3027 $[M]^+$ $C_{35}H_{43}O_7N$. Вычислено: $M = 589.3034$

(*S,E*)-6-ацетил-2-(1-(3,5-ди-*tert*-бутил-4-гидроксифенил-пропиламино)этилиден)-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1,3(2H,9bH)-дион (-)-55 $[\alpha]_D^{29} -223$ (с 0.22, $CHCl_3$).

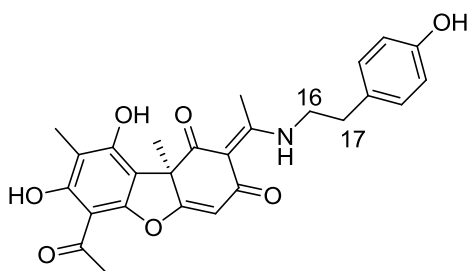
(*R,E*)-6-ацетил-2-(1-(3,5-ди-*tert*-бутил-4-гидроксифенилэтиламино)этилиден)-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1,3(2H,9bH)-дион (+)-56. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 93%, т. пл. 103-105⁰C. $[\alpha]_D^{30} +202$ (с 0.24, $CHCl_3$). ИК спектр (ν , cm^{-1}): 1072, 1119, 1189, 1290, 1343, 1468, 1557, 1626, 1700, 2956, 3633. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.42 (18H, с, H-*t*Bu), 1.68 (3H, с, H-15), 2.08 (3H, с, H-10), 2.46 (3H, с, H-12), 2.66 (3H, с, H-14), 2.91 (2H, т, J = 7.1, H-17), 3.68 (2H, д.т, J = 6.1

и 7.1, H-16), 5.17 (1H, с, OH-4'), 5.78 (1H, с, H-4), 6.99 (2H, с, H-2' и H-6'), 12.08 (1H, с, OH-9), 13.36 и 13.59 (1H и 1H, с и ш.с, NH и OH-7). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.3 (C-10), 18.0 (C-12), 30.1 (6C-*t*Bu), 31.1 (C-14), 31.8 (C-15), 34.2 (C-17), 35.4 (C-16), 45.9 (2C-*t*Bu), 55.7 (C-9b), 101.5 (C-6), 102.4 (C-4), 102.9 (C-2), 106.0 (C-9a), 107.8 (C-8), 125.2 (C-2' и C-6'), 127.5 (C-1'), 136.3 (C-5' и C-3'), 155.7 (C-4'), 152.8 (C-5a), 158.2 (C-9), 163.3 (C-7), 174.0 (C-11), 174.7 (C-4a), 189.9 (C-3), 198.3 (C-1), 200.5 (C-13). Найдено: m/z 575.2895 $[M]^+$ $C_{34}H_{41}O_7N$. Вычислено: $M = 575.2883$.

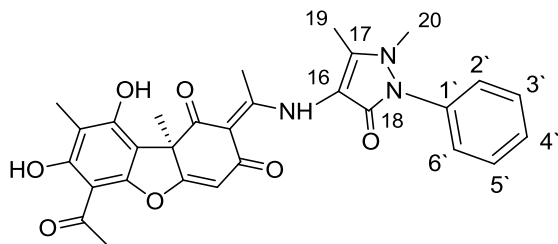
(*E*)-6-ацетил-2-(1-(4-гидроксифенилэтиламино)этилиден)-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1,3(2H,9bH)-дион (+)-57. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 78%, т. пл. 115-117⁰C. $[\alpha]_D^{28} +254$ (с 0.22, $CHCl_3$). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.70 (3H, с, H-15), 2.11 (3H, с, H-10), 2.57 (3H, с, H-12), 2.67 (3H, с, H-14), 2.96 (2H, т, J = 6.7, H-17), 3.73 (2H, д.т, J = 6.7 и 5.5, H-16), 5.81 (1H, с, H-4), 6.81 (2H, д, J = 8.3, H-3' и H-5'), 7.11 (2H, д, J = 8.3, H-2' и H-6'), 11.89 (1H, с, OH-9), 13.22 (1H,

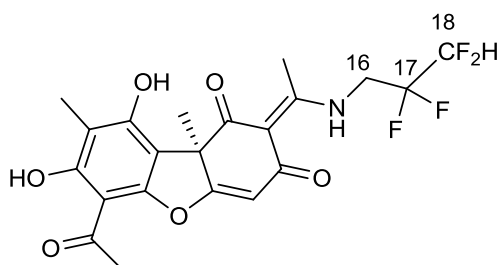
ш.с, NH), 13.59 (1H, с, OH-7). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.27 (C-10), 18.15 (C-12), 31.04 (C-14), 31.76 (C-15), 34.11 (C-17), 45.54 (C-16), 57.01 (C-9b), 101.15 (C-6), 102.03 (C-4), 102.60 (C-2), 104.81 (C-9a), 107.84 (C-8), 115.70 (C-3' и C-5'), 129.68 (C-1'), 129.68 (C-2' и C-6'), 155.11 (C-4'), 155.64 (C-5a), 158.00 (C-9), 163.25 (C-7), 174.80 (C-11), 174.7 (C-4a), 189.9 (C-3), 198.14 (C-1), 200.53 (C-13). Найдено: m/z 463.1620 $[M]^+$ $C_{26}H_{25}O_7N$. Вычислено: $M = 463.1626$.

(E)-6-ацетил-2-(1-(1,5-диметил-3-оксо-2-фенетил-2,3-дигидро-1H-пиразол-4-иламино)этилиден)-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1,3(2H,9bH)-дион (+)-58. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 72%, т. пл. 195⁰С. $[\alpha]_D^{28} +220$ (с 0.38, CHCl₃). ИК спектр (ν , см⁻¹): 891, 1069, 1133, 1272, 1362, 1545, 1706, 2924, 3436. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.77 (3H, с, Н-15), 2.11 (3H, с, Н-10), 2.33 (3H, с, Н-19), 2.72 (6H, с, 3H-12 и 3H-14), 3.24 (3H, с, Н-20), 5.88 (1H, с, Н-4), 7.42 и 7.52 (3H, м и 2H, м, Н-аром), 11.83 (1H, с, ОН-9), 13.38 (1H, с, ОН-7), 14.31 (1H, ш.с, NH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.0 (C-10), 10.4 (C-19), 20.0 (C-12), 30.8 (C-14), 30.4 (C-15), 35.2 (C-20), 57.1 (C-9b), 100.9 (C-6), 101.8 (C-4), 102.8 (C-2), 104.6 (C-16), 107.4 (C-9a), 107.7(C-8), 124.3 (C-5` и C-3`), 127.3 (C-4`), 129.1 (C-6` и C-2`), 133.6 (C-7`), 149.0 (C-17), 155.3 (C-5a), 157.8 (C-9), 159.7 (C-18), 163.1 (C-7), 174.3 (C-11), 176.3 (C-4a), 190.6 (C-3), 198.2 (C-1), 200.2 (C-13). Найдено: m/z 529.1845 [M]⁺ C₂₉H₂₇O₇N₃. Вычислено: M = 529.1844.

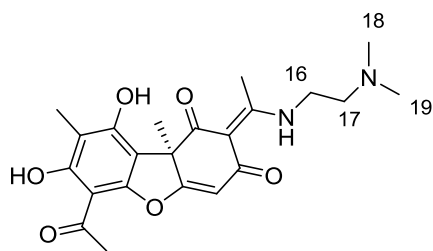
(R,E)-6-Ацетил-7,9-дигидрокси-8,9b-диметил-2-(1-(2`,2`,3`,3`-тетрафторпропиламино)этилиден)дибензо[b,d]фуран-1,3-дион (+)-59 Жёлтый аморфный порошок.



Выход 92%; т. пл. 155⁰С, $[\alpha]_D +324$ (с 0.34, CHCl₃). ИК спектр (KBr, ν , см⁻¹): 1061, 1103, 1288, 1373, 14601, 1560, 1630, 1699, 2989, 3016. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.74 (3H, с, Н-15), 2.13 (3H, с, Н-10), 2.65 (3H, с, Н-14), 2.68 (3H, с, Н-12), 3.75 (1H, с, N-H), 4.11 (2H, м, Н-16), 5.85 (1H, с, Н-4), 5.97 (1H, м, Н-18), 11.57 (1H, с, 9-OH), 13.34 (1H, с, 7-OH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.4 (C-10), 17.9 (C-12), 31.1 (C-15), 31.7 (C-14), 41.9 (м, C-16), 57.5 (C-9b), 101.3 (C-4), 102.0 (C-6), 103.1 (C-9a), 108.1 (C-8), 109.6 (C-2), 115.2 (C-18, тт, ¹J_{C-F}=240), 110.2 (C-17, тт, ¹J_{C-F}=250), 155.6 (C-5a), 157.9 (C-9), 163.4 (C-7), 174.5 (C-4a), 176.5 (C-11), 190.9 (C-3), 198.7 (C-1), 200.6 (C-13). Найдено: m/z 457.1141; [M]⁺ C₂₁H₁₉O₆N₁F₄. Вычислено: 457.1143.

(S,E)-6-Ацетил-7,9-дигидрокси-8,9b-диметил-2-(1-(2`,2`,3`,3`-тетрафторпропиламино)этилиден)дибензо[b,d]фуран-1,3-дион (-)-59, $[\alpha]_D^{26} -320$ (с 0.3; CHCl₃);

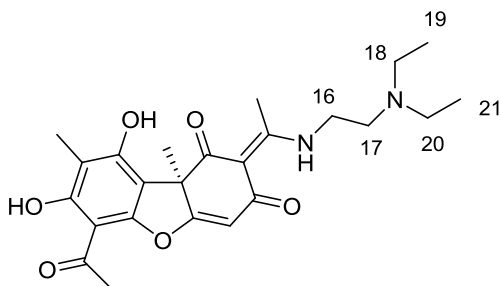
(2R,4E)-10-ацетил-4-(1-{2-(диметиламино)этил}амио)этилиден)-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (+)-60. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 86 %, т. пл. 84⁰С. $[\alpha]_D +290$ (*c* 0.685; CHCl₃).
Спектр ЯМР ¹Н (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.67 (3Н, с, Н-15), 2.06 (3Н, с, Н-10), 2.31 (6Н, с, 3Н-18 и 3Н-19), 2.61 и 2.64 (6Н, с, 3Н-12 и 3Н-14), 2.60 (2Н, т, J = 6.0, 2Н-17), 3.50 (2Н, д.т, J = 5.7, J = 6.0, Н-16), 5.75 (1Н, с, Н-4), 12.02 (1Н, ш.с, ОН-9), 13.33 (1Н, ш.с и 1Н, ш.с, NH и ОН-7). ЯМР ¹³С (CDCl₃, δ, м.д.): 7.0 (С-10), 18.3 (С-12), 30.8 (С-14), 31.5 (С-15), 41.6 (С-16), 44.9 (С-18 и С-19), 56.7 (С-17), 59.0 (С-9b), 102.1 (С-4), 100.9 (С-6), 101.2 (С-2), 104.7 (С-9a), 107.4 (С-8), 155.5 (С-5a), 157.9 (С-9), 163.0 (С-7), 173.5 (С-11), 174.0 (С-4a), 192.1 (С-3), 197.5 (С-1), 200.2 (С-13). Найдено: *m/z* 414.1796 [M]⁺ C₂₂H₂₆O₆N₂. Вычислено: M = 414.1791.

(2S,4E)-10-ацетил-4-(1-{[2-(диметиламино)этил]амино}этилиден)-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (-)-60. $[\alpha]_D -279^\circ$ (*c* 0.370; CHCl₃).

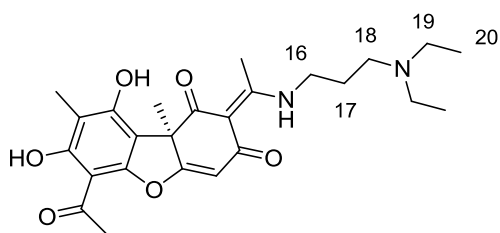
(2R,4E)-10-ацетил-4-(1-{[2-(диэтиламино)этил]амино}этилиден)-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (+)-61. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 88 %, т. пл. 68⁰С. $[\alpha]_D +366$ (*c* 0.390; CHCl₃). ИК спектр (*v*, см⁻¹): 841, 1061, 1287, 1370, 1555, 1627, 1701, 2926, 3387. Спектр ЯМР ¹Н (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.16 (6Н, т, J = 7.1, 3Н-19 и 3Н-21), 1.73 (3Н, с, Н-15), 2.13 (3Н, с, Н-10), 2.67 (6Н, с, 3Н-12 и 3Н-14), 2.69 (4Н; кв, J = 7.1, 2Н-18 и 2Н-20), 2.86 (2Н, т, J = 6.0, Н-17), 3.66 (2Н, д.т, J = 5.7, J = 6.0, Н-16), 5.82 (1Н, с, Н-4), 12.01 (1Н, ш.с, ОН-9), 13.36 и 13.39 (1Н, с и 1Н, с, NH и ОН-7). ЯМР ¹³С (CDCl₃, δ, м.д.): 7.3 (С-10), 11.5 (С-19 и С-21), 18.7 (С-12), 31.8 (С-14), 31.9 (С-15), 42.3 (С-16), 46.7 (С-18 и С-20), 50.8 (С-17), 59.0 (С-9b), 102.5 (С-4), 101.2 (С-6), 105.0 (С-2), 105.1 (С-9a), 107.7 (С-8), 155.8 (С-5a), 158.2 (С-9), 163.7 (С-7), 173.7 (С-11), 174.3 (С-4a), 191.5 (С-3), 197.9 (С-1), 200.6 (С-13). Найдено: *m/z* 442.2110 [M]⁺ C₂₄H₃₀O₆N₂. Вычислено: M = 442.2098.

(2S,4E)-10-ацетил-4-(1-{[2-(диэтиламино)этил]амино}этилиден)-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (-)-61. $[\alpha]_D -370^\circ$ (*c* 0.340; CHCl₃).

(2R,4E)-10-ацетил-4-(1-{[2-(диэтиламино)пропил]амино}этилиден)-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (+)-62. Светло-жёлтый аморфный порошок.

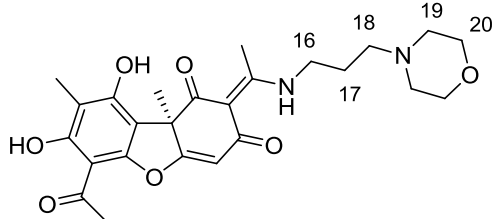


Выход 98 %. $[\alpha]_D +331$ (*c* 0.278; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.00 (6H, т, J = 7.0, H-20), 1.67 (3H, с, H-15), 1.83 (2H, м, H-17), 2.06 (3H, с, H-10), 2.50 (6H, м, 3H-18 и 3H-19), 2.61 (3H, с, H-12), 2.65 (3H, с, H-14), 3.52 (2H; м, H-16), 5.75 (1H, с, H-4),

11.98 (1H, ш.с, OH-9), 13.26 (1H, ш.с, NH), 13.34 (1H, с OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.3 (C-10), 11.5 (2C-20), 18.1 (C-12), 26.7 (C-17), 31.1 (C-14), 31.8 (C-15), 41.9 (C-16), 46.6 (2C-19), 49.4 (C-18), 56.8 (C-9b), 101.2 (C-2), 102.1 (C-6), 102.4 (C-4), 105.0 (C-9a), 107.7 (C-8), 155.8 (C-5a), 158.2 (C-9), 163.3 (C-7), 173.8 (C-11), 174.7 (C-4a), 189.8 (C-3), 197.9 (C-1), 200.5 (C-13). Найдено: m/z 456.2251 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{N}_2$. Вычислено: $M = 456.2255$.

(2S,4E)-10-ацетил-4-(1-{[2-(диэтиламино)пропил]амино}этилиден)-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (-)-62. $[\alpha]_D -325^\circ$ (*c* 0.340; CHCl_3).

(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-4-(1-{[2-(морфолин-4-ил)пропил]амино}этилиден)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (+)-63. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 97 %. $[\alpha]_D +325$ (*c* 0.450; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.68 (3H, с, H-15), 1.87 (2H, м, H-17), 2.07 (3H, с, H-10), 2.44 (6H, м, 3H-18 и 3H-19), 2.63 (3H, с, H-12), 2.65 (3H, с, H-14), 3.52 (2H; м, H-16), 3.69 (4H, т, J = 4.6, H-20), 5.76 (1H, с, H-4),

11.95 (1H, ш.с, OH-9), 13.30 (1H, ш.с, NH), 13.34 (1H, с OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.3 (C-10), 18.1 (C-12), 25.6 (C-17), 31.1 (C-14), 31.8 (C-15), 41.6 (C-16), 53.5 (2C-19), 55.1 (C-18), 56.8 (C-9b), 66.7 (2C-20), 101.2 (C-2), 102.1 (C-6), 102.3 (C-4), 104.9 (C-9a), 107.7 (C-8), 155.7 (C-5a), 158.1 (C-9), 163.3 (C-7), 173.8 (C-11), 174.7 (C-4a), 189.9 (C-3), 197.9 (C-1), 200.5 (C-13). Найдено: m/z 470.2056 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_7\text{N}_2$. Вычислено: $M = 470.2048$.

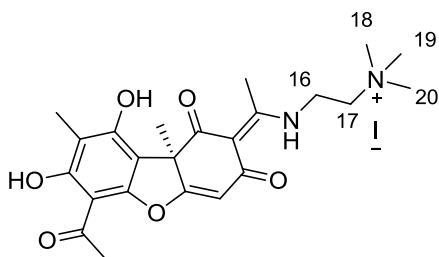
(2S,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-4-(1-{[2-(морфолин-4-ил)пропил]амино}этилиден)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (-)-63. $[\alpha]_D -320^\circ$ (*c* 0.440; CHCl_3).

Синтез соединений 64, 66-68

К 1.1 ммоль аминов **60-63** в 10 мл хлористого метилена добавили 3 ммоль йодистого метила. Реакционную смесь выдерживали 3 суток, выпадает белый или желтоватый осадок. Образующийся осадок отфильтровывали, промывали хлороформом, после чего высушивали на воздухе.

(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-4-(1-{[2-(триметиламино)этил]амино}этилиден)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион иодид (+)-64. Белый аморфный порошок.

Выход 88 %. т. пл. 240⁰С. $[\alpha]_D +203$ (с 0.310; CH₃OH).

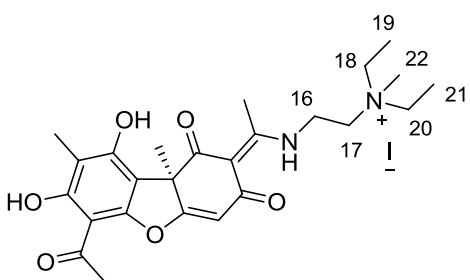


Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆, δ, м.д., J Гц): 1.67 (3H, с, Н-15), 1.98 (3H, с, Н-10), 2.64 (3H, с, Н-12), 2.66 (3H, с, Н-14), 3.17 (9H, с, 3Н-18, 3Н-19, 3Н-20), 3.69 (2H, т, J=6.0, Н-17), 4.08 (2H, д.т, J=5.5 и J=6.0, Н-16), 5.93 (1H, с, Н-4), 12.15 (1H, с, ОН-9), 13.07 (1H, т, J=5.5, NH), 13.41 (1H, с, ОН-7). ЯМР

¹³С (CDCl₃, δ, м.д.): 7.5 (С-10), 18.5 (С-12), 31.1 и 31.6 (С-14 и С-15), 37.6 (С-16), 52.8, (С-18, С-19, С-20), 56.5 (С-17), 62.8 (С-9b), 100.9 (С-6), 102.2 (С-2), 102.4 (С-4), 105.0 (С-9a), 106.4 (С-8), 155.8 (С-5a), 157.6 (С-9), 162.6 (С-7), 173.2 (С-11), 176.0 (С-4a), 188.9 (С-3), 197.6 (С-1), 201.0 (С-13). Элементный анализ: Найдено, % : С 50.80, Н 5.80, N 4.77, I 22.74. Вычислено, % : С 49.65, Н 5.25, N 5.03, I 22.81. C₂₃H₂₉IO₆N₂.

(2S,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-4-(1-{[2-(триметиламино)этил]амино}этилиден)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион иодид (-)-64. $[\alpha]_D -201^\circ$ (с 0.146; CH₃OH).

(2R,4E)-10-ацетил-4-[1-({2-[диэтил(метил)амино]этил}амино)этилиден]-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион иодид (+)-66. Белый аморфный порошок.

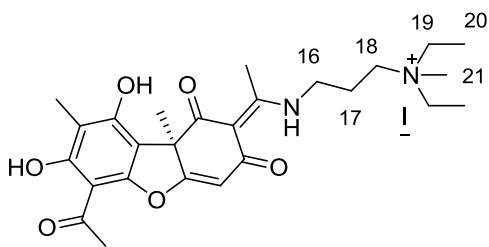


Выход 64 %. т. пл. 125⁰С. $[\alpha]_D +198$ (с 0.164; CH₃OH). Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆, δ, м.д., J Гц): 1.22 (6H, т, J=7.1, 3Н-19 и 3Н-21), 1.60 (3H, с, Н-15), 1.90 (3H, с, Н-10), 2.57 (3H, с, Н-12), 2.64 (3H, с, Н-14), 3.05 (3H, с, Н-22), 3.38 (4H, кв, J=7.1, 2Н-18 и 2Н-20), 3.59 (2H, т, J=6.0, Н-17), 4.04 (2H, д.т, J=5.7 и J=6.0, Н-16), 5.83 (1H, с, Н-4), 12.06 (1H, с, ОН-9), 12.97 и 13.32 (1H, с, NH и 1H, с, ОН-7). ЯМР

¹³С (CDCl₃, δ, м.д.): 7.6 (С-10), 7.7 (С-19 и С-21), 18.6 (С-12), 31.2 и 31.8 (С-14 и С-15), 37.2 (С-16), 47.1 (С-22), 56.4, 56.6, 57.5 (С-17, С-18, С-20), 59.0 (С-9b), 100.1 (С-6), 102.4 (С-4), 102.4 (С-2), 105.4 (С-9a), 106.6 (С-8), 155.8 (С-5a), 157.6 (С-9), 162.6 (С-7), 173.3 (С-11), 176.2 (С-4a), 189.0 (С-3), 197.7 (С-1), 201.1 (С-13). Элементный анализ: Найдено, %: С 52.48, Н 6.13, N 4.78, I 21.00. Вычислено, % : С 51.38, Н 5.69, N 4.79, I 21.71. C₂₅H₃₃IO₆N₂.

(2S,4E)-10-ацетил-4-[1-({2-[диэтил(метил)амино]этил}амино)этилиден]-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион иодид (-)-66. $[\alpha]_D -207^\circ$ (с 0.240; CH₃OH).

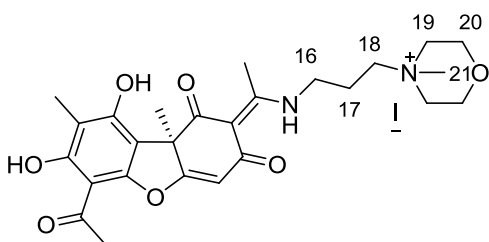
(2R,4E)-10-ацетил-4-[1-({3-[диэтил(метил)амино]пропил}амино)этилиден]-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион иодид (+)-67. Белый аморфный порошок.



Выход 67 %. $[\alpha]_D^{29} +224$ (с 0.20, CH₃OH). Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆, δ, м.д., J Гц): 1.22 (6H, т, J=7.1, H-20), 1.65 (3H, с, H-15), 1.97 (3H, с, H-10), 2.06 (2H, м, H-17), 2.63 (6H, с, H-12 и H-14), 2.97 (3H, с, H-21), 3.33 (6H, м, 2H-18, 4H-19), 3.65 (2H, м, H-16), 5.89 (1H, с, H-4), 12.23 (1H, с, OH-9), 13.04 (1H, т, J=5.6, NH), 13.39 (1H, с, OH-7). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.5 (C-10), 7.6 (2C-20), 18.3 (C-12), 21.7 (C-17), 31.0 и 31.7 (C-14 и C-15), 40.7 (C-16), 46.8 (C-21), 55.9 (2C-19), 56.3 (C-9b), 56.6 (C-18), 100.9 (C-6), 101.8 (C-2), 102.4 (C-4), 105.1 (C-9a), 106.4 (C-8), 155.7 (C-5a), 157.6 (C-9), 162.5 (C-7), 173.0 (C-11), 175.3 (C-4a), 188.8 (C-3), 197.3 (C-1), 200.9 (C-13). Элементный анализ: Найдено, %: С 51.97, Н 5.89, N 4.70, I 21.09. Вычислено, % : С 52.18, Н 5.89, N 4.68, I 21.20. C₂₆H₃₅IO₆N₂.

(2S,4E)-10-ацетил-4-[1-({3-[диэтил(метил)амино]пропил}амино)этилиден]-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион иодид (-)-67. $[\alpha]_D^{29} -212$ (с 0.15, MeOH).

(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-4-(1-{{3-(4-метил-1,4λ⁴-морфолин-4-ил)пропил}амино)этилиден)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион иодид (+)-68. Белый аморфный порошок.



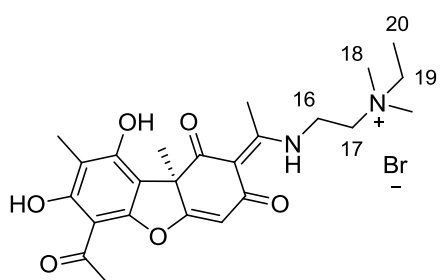
Выход 53 %. $[\alpha]_D^{29} +220$ (с 0.20, CH₃OH). Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆, δ, м.д., J Гц): 1.65 (3H, с, H-15), 1.96 (3H, с, H-10), 2.14 (2H, м, H-17), 2.63 (6H, с, H-12 и H-14), 3.17 (3H, с, H-21), 3.47 (4H, H-19), 3.56 (2H, м, H-16), 3.64 (2H, м, H-18), 3.94 (4H, м, H-20), 5.89 (1H, с, H-4), 12.24 (1H, с, OH-9), 13.05 (1H, т, J=5.6, NH), 13.39 (1H, с, OH-7). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.5 (C-10), 18.3 (C-12), 21.2 (C-17), 31.0 и 31.7 (C-14 и C-15), 40.6 (C-16), 46.7 (C-21), 56.3 (2C-19), 56.3 (C-9b), 59.8 (2C-20 и C-18), 100.9 (C-6), 101.8 (C-2), 102.3 (C-4), 105.1 (C-9a), 106.3 (C-8), 155.7 (C-5a), 157.6 (C-9), 162.5 (C-7), 173.0 (C-11), 175.3 (C-4a), 188.8 (C-3), 197.3 (C-1), 200.9 (C-13). Элементный анализ: Найдено, %: С 49.96, Н 5.61, N 4.45, I 20.40. Вычислено, % : С 50.99, Н 5.43, N 4.57, I 20.72. C₂₆H₃₃IO₇N₂.

(2S,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-4-(1-{{3-(4-метил-1,4λ⁴-морфолин-4-ил)пропил}амино)этилиден)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион иодид (-)-68. $[\alpha]_D^{29} -219$ (с 0.20, CH₃OH).

Синтез соединения (+)-65.

К 1.1 ммоль амина (+)-**60** в 10 мл хлористого метилена добавили 5 ммоль бромистого этила. Реакционную смесь выдерживали 5 суток, выпадает белый осадок. Образующийся осадок отфильтровывали, промывали хлороформом, после чего высушивали на воздухе. Выделяли соединение (+)-**65**.

(2R,4E)-10-ацетил-4-(1-{[2-(этилдиметиламино)этил]амино}этилиден)-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион бромид (+)-65. Светло-жёлтый аморфный порошок.

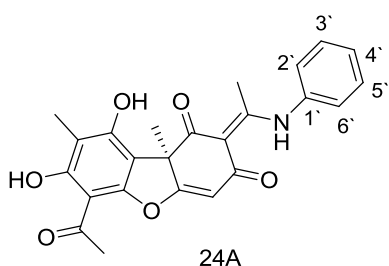


Выход 42 %. $[\alpha]_D^{29} +225$ (с 0.13, MeOH). Спектр ЯМР ^1H (DMSO- d_6 , δ , м.д., J Гц): 1.27 (3H, т, J=6.8, H-20), 1.65 (3H, с, H-15), 1.97 (3H, с, H-10), 2.63 и 2.66 (6H, 2с, 3H-12 и 3H-14), 3.10 (6H, с, H-18), 3.45 (2H, м, H-19), 3.65 (2H, м, H-17), 4.07 (2H, м, H-16), 5.91 (1H, с, H-4), 12.14 (1H, с, OH-9), 13.01 (1H, ш.с, NH), 13.39 (1H, с, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.3 (C-10), 7.7 (C-20), 18.3 (C-12), 30.9 и 31.5 (C-14 и C-15), 37.1 (C-16), 49.6 (2C-18), 56.3 (C-9b), 59.3 и 59.8 (C-17 и C-19), 100.7 (C-6), 102.0 (C-2), 102.2 (C-4), 104.9 (C-9a), 106.2 (C-8), 155.6 (C-5a), 157.4 (C-9), 162.4 (C-7), 173.0 (C-11), 175.9 (C-4a), 188.7 (C-3), 197.4 (C-1), 200.8 (C-13). Элементный анализ: Найдено, % : C 53.48, H 5.99, N 5.13, Br 15.28. Вычислено, %: C 53.57, H 5.97, N 5.35, Br 15.27. C₂₄H₃₁BrO₆N₂.

Синтез соединений 69-74

К 1 ммоль УК **1** добавили 1.1 ммоль соответствующего анилина и растворили смесь в 12 мл этилового спирта. Кипятили на водяной бане 2-3 часа. Охладили, добавили 10 мл дистиллированной воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили на воздухе. После чего осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - градиент метилового спирта в хлористом метилене от 0 до 10%.

(2R,4E)-10-ацетил-4-[1-(фениламино)этилиден]-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (+)-69. Светло-жёлтый аморфный порошок.

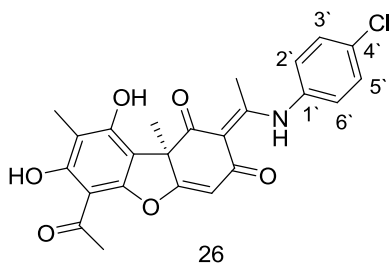


Выход 90%. $[\alpha]_D^{31} +253$ (с 0.2; CHCl₃). Спектр ЯМР ^1H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.77 (3H, с, H-15), 2.11 (3H, с, H-10), 2.66 (3H, с, H-12), 2.76 (3H, с, H-14), 5.90 (1H, с H-4), 7.20-7.55 (5H, м, все-аром), 11.90 (1H, с OH-9), 13.41 (1H, с, OH-7), 15.10 (1H, с, NH). ЯМР ^{13}C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.37 (C-10), 20.49 (C-12), 31.17 (C-14), 31.76 (C-15), 57.39 (C-9b), 101.24 (C-6), 102.10 (C-4), 102.51 (C-9a), 104.81 (C-2), 108.04 (C-8), 125.58 (C-3' и C-5'), 128.12 (C-4'), 129.54 (C-2' и C-6'), 135.90 (C-1'), 155.63 (C-5a), 158.07 (C-9), 163.41 (C-7), 173.81 (C-11), 174.63 (C-4a),

190.87 (C-3), 198.68 (C-1), 200.51 (C-13). Найдено: m/z 419.1356 $[M]^+$ $C_{24}H_{21}O_6N$. Вычислено: $M = 419.1363$.

(2*S*,4*E*)-10-ацетил-4-[1-(фениламино)этилиден]-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (-)-69. $[\alpha]_D^{31} -250$ (c 0.2; $CHCl_3$).

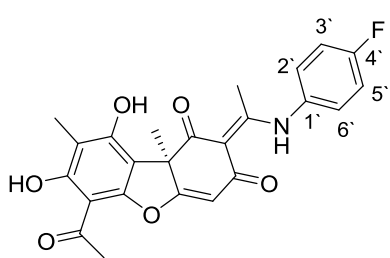
(*R,E*)-6-ацетил-2-(1-(4-хлорфениламино)этилиден)-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензо[*b,d*]фуран-1,3(2*H*,9*bH*)-дион (+)-70. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 87%, т. пл. 110⁰С. $[\alpha]_D^{30} +247$ (c 0.2; $CHCl_3$). ИК спектр (ν , cm^{-1}): 844, 1065, 1136, 1205, 1280, 1367, 1462, 1546, 1630, 1698, 2927, 3455. Спектр ЯМР ¹H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.71 (3H, с, H-15), 2.05 (3H, с, H-10), 2.54 (3H, с, H-12), 2.64 (3H, с, H-14), 5.83 (1H, с, H-4), 7.14 (2H, д, J = 8.5, H-2' и H-6'), 7.43 (2H, д, J = 8.5, H-3' и H-5'), 11.68 (1H, с OH-9), 13.31 (1H, с, OH-7), 15.06 (1H, с, NH). ЯМР ¹³C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.3 (C-10), 20.4 (C-12), 31.1 (C-14), 31.7 (C-15), 57.5(C-9b), 101.2 (C-6), 102.0 (C-4), 102.7 (C-9a), 104.7 (C-2), 108.1 (C-8), 126.9 (C-2' и C-6'), 129.7 (C-3' и C-5'), 133.9 (C-4'), 134.5 (C-1'), 155.6 (C-5a), 157.9 (C-9), 163.4 (C-7), 173.7 (C-11), 174.7 (C-4a), 190.9 (C-3), 198.7 (C-1), 200.4 (C-13). Найдено: m/z 453.0966 $[M]^+$ $C_{24}H_{20}O_6NCl$. Вычислено: $M = 453.0971$.

(*S,E*)-6-ацетил-2-(1-(4-хлорфениламино)этилиден)-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензо[*b,d*]фуран-1,3(2*H*,9*bH*)-дион (-)-70. $[\alpha]_D^{30} -240$ (c 0.3; $CHCl_3$).

(2*R*,4*E*)-10-ацетил-4-{1-[(4-фторфенил)амино]этилиден}-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (+)-71. Светло-жёлтый аморфный порошок.

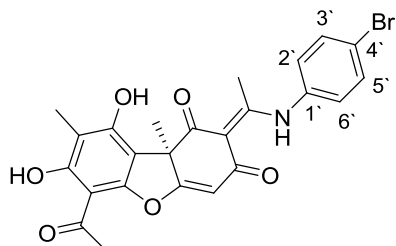


Выход 70%. Т.пл. 73 °С. $[\alpha]_D^{31} +253$ (c 0.2; $CHCl_3$). ИК спектр (ν , cm^{-1}): 1061, 1133, 1200, 1286, 1365, 14592, 1546, 1628, 1699, 2921, 3434. Спектр ЯМР ¹H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.72 с (3H, C¹⁵H₃), 2.06 с (3H, C¹⁰H₃), 2.54 с (3H, C¹²H₃), 2.65 с (3H, C¹⁴H₃), 5.84 с (H⁴), 7.15 -7.17 м (4H, C^{2'}H и C^{6'}H, C^{3'}H и C^{5'}H), 11.75 с (C⁹-OH), 13.34 (C⁷-OH), 15.00 (NH). ЯМР ¹³C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.4 (C¹⁰), 20.4 (C¹²), 31.2 (C¹⁴), 31.8 (C¹⁵), 57.5(C^{9b}), 101.3, 102.7, 104.8 (C⁶, C^{9a}, C²), 102.1 (C⁴), 108.1 (C⁸), 116.7 д (²J_{C-F} = 23, C^{3'} и C^{5'}), 127.5 (³J_{C-F} = 8, C^{2'} и C^{6'}), 161.9 д (¹J_{C-F} = 248, C^{4'}), 132.1 (⁴J_{C-F} = 3, C^{1'}), 155.7 (C^{5a}), 158.1 (C⁹), 163.5 (C⁷), 174.2 (C¹¹), 174.8 (C^{4a}), 191.0 (C³), 198.8 (C¹), 200.6 (C¹³). Найдено: m/z 437.1263 $[M]^+$ $C_{24}H_{20}O_6NF$. Вычислено: $M = 437.1269$

(2S,4E)-10-ацетил-4-{1-[(4-фторфенил)амино]этилиден}-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (-)-71. $[\alpha]_D^{30}$ -232 (*c* 0.3; CHCl₃).

(2R,4E)-10-ацетил-4-{1-[(4-бромфенил)амино]этилиден}-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (+)-72.

Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 87%, т. пл. 182-185⁰С. $[\alpha]_D^{30}$ +192 (*c* 0.34; CHCl₃).

ИК спектр (ν , см⁻¹): 843, 1065, 1137, 1206, 1276, 1365, 1462, 1543, 1634, 1698, 2725, 2925. Спектр ЯМР ¹Н (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.76 (3H, с, Н-15), 2.11 (3H, с, Н-10), 2.58 (3H, с, Н-12), 2.69 (3H, с, Н-14), 5.89 (1H, с Н-4), 7.11 (2H, д, J=8.5, Н-2' и Н-6'), 7.61 (2H, д, J=8.5, Н-3' и Н-5'), 11.74 (1H, с ОН-9), 13.38 (1H, с, ОН-7), 15.10 (1H, с, NH).

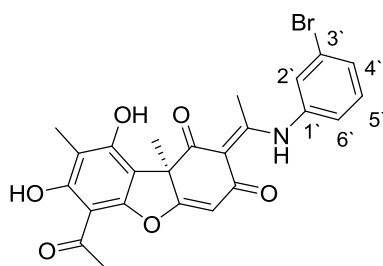
ЯМР ¹³С (CDCl₃, δ , м.д.): 7.3 (C-10), 20.4 (C-12), 31.1 (C-14), 31.7 (C-15), 57.5(C-9b), 101.2 (C-6), 102.0 (C-4), 102.7 (C-9a), 104.7 (C-2), 108.1 (C-8), 126.9 (C-2' и C-6'), 129.7 (C-3' и C-5'), 133.9 (C-4'), 134.5 (C-1'), 155.6 (C-5a), 157.9 (C-9), 163.4 (C-7), 173.7 (C-11), 174.7 (C-4a), 190.9 (C-3), 198.7 (C-1), 200.4 (C-13). Найдено: *m/z* 497.04342 [M]⁺ C₂₄H₂₀O₆NBr. Вычислено: M = 497.04590.

(2S,4E)-10-ацетил-4-{1-[(4-бромфенил)амино]этилиден}-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (-)-72.

$[\alpha]_D$ -254 (*c* 0.62; CHCl₃).

(2R,4E)-10-ацетил-4-{1-[(3-бромфенил)амино]этилиден}-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (+)-73.

Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 84%. т. пл. 176-178 °С; $[\alpha]_D^{30}$ +218 (*c* 0.2; CHCl₃);

ИК спектр (ν , см⁻¹): 1062, 1136, 1188, 1286, 1365, 1459, 1541, 1624, 1695, 2921, 3440. Спектр ЯМР ¹Н (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.74 (с, 3H, Н-15), 2.09 (с, 3H, Н-10), 2.58 (с, 3H, Н-12), 2.68 (с, 3H, Н-14), 5.87 (с, Н-4), 7.15 (д, J = 8 Hz, Н-6'), 7.35 (дд, J = 8 Hz и J = 8 Hz, Н-5'), 7.39 (с, Н-2'), 7.53 (д, J = 8 Hz, Н-4'), 11.68

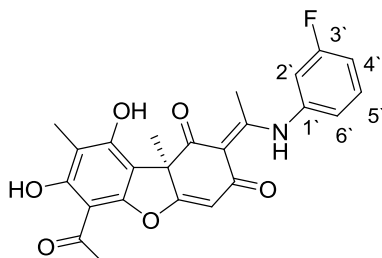
(с, С9-ОН), 13.34 (с, С7-ОН), 15.14 (с, NH). ЯМР ¹³С (CDCl₃, δ , м.д.): 7.4 (C-10), 20.4 (C-12), 31.1 (C-14), 31.7 (C-15), 57.5(C-9b), 101.2, 102.7 и 104.7 (C-6, C-9a и C-2), 102.0 (C-4), 108.1 (C-8), 123.0 (C-3'), 124.4 и 128.8 (C-2' и C-6'), 130.8 и 131.2 (C-5' и C-4'), 137.3 (C-1'), 155.6 (C-5a), 157.9 (C-9), 163.5 (C-7), 173.7 (C-11), 174.8 (C-4a), 190.9 (C-3), 198.8 (C-1), 200.4 (C-13). Найдено: *m/z* 497.0466; [M]⁺ C₂₄H₂₀O₆NBr; Вычислено: M = 497.0469.

(2S,4E)-10-ацетил-4-{1-[(3-бромфенил)амино]этилиден}-11,13-дигидрокси-2,12-

диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (-)-73,
 $[\alpha]_D^{30}$ -228 (*c* 0.2; CHCl₃).

**(2R,4E)-10-ацетил-4-{1-[(3-фторфенил)амино]этилиден}-11,13-дигидрокси-2,12-
 диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (+)-74.**

Светло-жёлтый аморфный порошок.



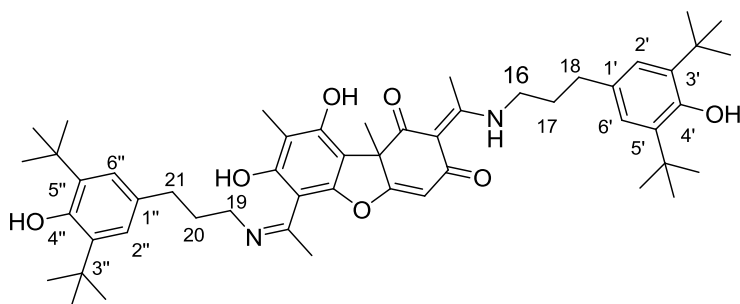
Выход 75%. т. пл. 89-91 °С. $[\alpha]_D^{31}$ +248 (*c* 0.2; CHCl₃); ИК спектр (ν , см⁻¹): 1063, 1132, 1188, 1282, 1366, 1461, 1545, 1629, 1699, 2927, 3434. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.73 (с, 3H, H-15), 2.07 (с, 3H, H-10), 2.58 (с, 3H, H-12), 2.66 (с, 3H, H-14), 5.86 (с, H-4), 6.95 (д, *J* = 8.5 Hz, H-2'), 7.01 (д, *J* = 8 Hz, H-6'), 7.10 (дд, *J* = 8.5 Hz и *J* = 8 Hz, H-4'), 7.44 (дд, *J* = 8 Hz и *J* = 8 Hz, H-5'), 11.69 (с, C9-OH), 13.34 (с, C7-OH), 15.14 (с, NH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.3 (C-10), 20.4 (C-12), 31.1 (C-14), 31.7 (C-15), 57.5 (C-9b), 101.2, 102.7 и 104.7 (C-6, C-9a и C-2), 102.0 (C-4), 108.1 (C-8), 113.2 (д, ²*J*_{C-F} = 23 Hz, C-4'), 115.2 (д, ²*J*_{C-F} = 23 Hz, C-2'), 121.5 (д, ⁴*J*_{C-F} = 3 Hz, C-6'), 130.9 (д, ³*J*_{C-F} = 9 Hz, C-5'), 137.4 (д, ³*J*_{C-F} = 9 Hz, C-1'), 162.8 (д, ¹*J*_{C-F} = 249 Hz, C-3'), 155.6 (C-5a), 157.9 (C-9), 163.4 (C-7), 173.8 (C-11), 174.7 (C-4a), 190.9 (C-3), 198.8 (C-1), 200.4 (C-13); Найдено: *m/z* 437.1267 [M]⁺ C₂₄H₂₀O₆NF, Вычислено: M = 437.1269.

**(2S,4E)-10-ацетил-4-{1-[(3-фторфенил)амино]этилиден}-11,13-дигидрокси-2,12-
 диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-3,5-дион (-)-74,**
 $[\alpha]_D^{31}$ -256 (*c* 0.2; CHCl₃);

Синтез соединений 75, 76.

К 1 ммоль (+)-УК 1 добавили 3 ммоль аминов и растворили смесь в 12 мл спирта. Кипятили на водяной бане 3 часа. Охладили, добавили 10 мл дистиллированной воды. Выпадал светлый осадок. Осадок отфильтровали, промыли водой, сушили на воздухе. Реакционную смесь делили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент – хлороформ.

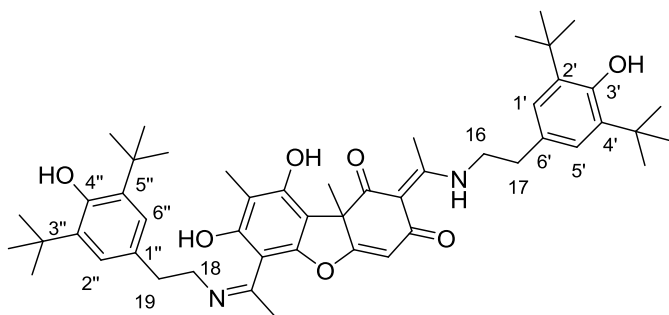
**(E)-2-(1-3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибенпропиламино)этилиден)-6-((E)-1-(3,5-ди-
 трет-бутил-4-гидроксибенпропиламино)-7,9-дигидрокси-8,9b-
 диметилдибензо[b,d]фуран-1,3(2H,9bH)-дион (+)-75.** Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 22 %, т. пл. 92-96⁰С. ИК спектр (ν , см⁻¹): 1189, 1235, 1369, 1436, 1466, 1558, 1623, 1697, 2955, 3431, 3639. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.42 (18H, с, H-tBu' и 18H, с, H-

tBu`), 1.74 (3H, с, H-15), 1.83 (2H, м, H-17), 2.09 (2H, м, H-20), 2.10 (3H, с, H-10), 2.50 (2H, м, H-18 и 2H, м, H-21), 2.64 (3H, с, H-12), 2.67 (3H, с, H-14), 2.91 (2H, м, H-19), 3.29 (2H, м, H-16), 5.04 и 5.07 (1H, с и 1H, с, OH-4' и OH-4`), 5.94 (1H, с, H-4), 6.92 – 6.96 (4H, м, H-аром.), 11.22 (1H, ш.с, OH-9), 13.32 (1H, ш.с, OH-7), 17.97 (1H, ш.с, NH). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.9 (C-10), 17.5 (C-14), 18.0 (C-12), 30.1 (12C-tBu), 30.5, 31.3, 32.5, 32.9 (C-17, C-18, C-20, C-21), 31.9 (C-15), 34.1 (4C-tBu), 42.9 (C-16), 45.3 (C-19), 57.2 (C-9b), 98.9 (C-6), 101.3 (C-4), 101.9 (C-2), 106.0 (C-9a), 108.6 (C-8), 124.5 и 124.6 (C-2', C-6', C-2'', C-6''), 130.4 и 131.3 (C-1' и C-1''), 135.7 и 135.9 (C-5', C-3' и C-5'', C-3''), 151.7 и 152.0 (C-4' и C-4''), 155.2 (C-5a), 158.3 (C-9), 170.4 (C-7), 170.5 (C-13), 174.4 и 174.6 (C-4a и C-11), 189.9 (C-3), 198.6 (C-1).
Найдено: m/z 834.5161 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{52}\text{H}_{70}\text{O}_7\text{N}_2$. Вычислено: $M = 834.5178$

(E)-2-(1-3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензиламино)этилиден)-6-((E)-1-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензиламино)-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1,3(2H,9bH)-дион (+)-76. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 20 %. т. пл. 85⁰С. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 1076, 1189, 1235, 1370, 1436, 1466, 1558, 1623, 1697, 2957, 3433, 3639. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.40 и 1.42 (18H, с, H-tBu' и 18H, с, H-tBu''), 1.65 (3H, с, H-15), 2.12 (3H, с, H-10), 2.27 (3H, с, H-14), 2.46 (3H, с, H-12), 2.91 (2H,

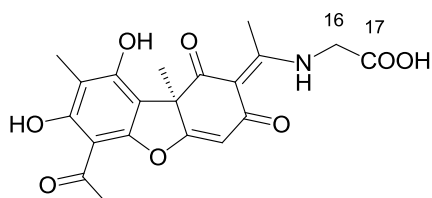
т, $J=7.2$, H-19), 2.96 (2H, т, $J=7.0$, H-17), 3.67 (2H, д.т, $J=6.3$ и $J=7.0$, H-16), 3.73 (2H, т, $J=7.2$, H-18), 5.11 и 5.17 (1H, с, OH-4' и 1H, с, OH-4''), 5.68 (1H, с, H-4), 6.99 – 7.01 (4H, м, H-аром.), 11.43 (1H, ш.с, OH-9), 13.56 (1H, ш.с, OH-7), 17.97 (1H, ш.с, NH). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.9 (C-10), 17.3 (C-14), 17.9 (C-12), 30.1 (12C-tBu), 32.0 (C-15), 34.1 (4C-tBu), 35.5 (C-17), 36.4 (C-19), 45.9 (C-16), 48.4 (C-18), 57.2 (C-9b), 99.0 (C-6), 101.3 (C-4), 102.0 (C-2), 106.1 (C-9a), 108.6 (C-8), 125.2 и 125.5 (C-2', C-6', C-2'', C-6''), 127.7 и 129.2 (C-1' и C-1''), 135.9 и 136.3 (C-5', C-3' и C-5'', C-3''), 152.4 и 152.7 (C-4' и C-4''), 155.1 (C-5a), 158.3 (C-9), 170.2 (C-7), 170.6 (C-13), 174.4 и 174.6 (C-4a и C-11), 189.9 (C-3), 198.6 (C-1). Найдено: m/z 806.4856 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{50}\text{H}_{66}\text{O}_7\text{N}_2$. Вычислено: $M = 806.4865$

Синтез соединений 28, 77-82.

3 ммоль аминокислоты растворили в 10 мл водно-спиртового раствора (1:1 по объёму). Добавили 0.2 г КОН (или более до pH ~ 9.5). Кипятили на водяной бане 10 мин. Порциями добавляли взвесь 1 ммоль (344 мг) УК в 5 мл спирта в течение 30 минут. Кипятили на водяной бане 3 часа, поддерживая pH на уровне ~ 9.5. Охладили, добавили разбавленной HCl до pH ~ 5. Если выпадает осадок, то его отфильтровывали, промывали водой и сушили на

воздухе. Если осадок не формируется или мелкодисперсный, экстрагировали хлороформом три раза, экстракт сушили над $MgSO_4$ б/в, растворитель отгоняли на вакуумном ротационном испарителе. Полученные осадок или экстракт хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - хлороформ с градиентом этилацетата от 0 до 50%.

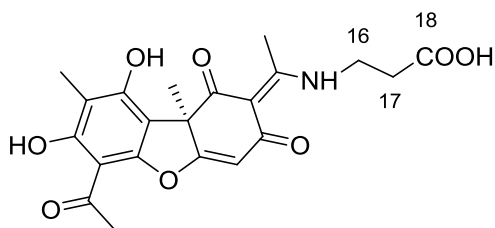
2-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)уксусная кислота (+)-28. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 88%, т. пл. 210 °С с разложением. $[\alpha]_D^{20} +207$ (с 0.04; MeOH). ИК спектр (ν , cm^{-1}): 843, 1213, 1288, 1370, 1455, 1552, 1628, 1698, 1734, 3080, 3421. Спектр ЯМР 1H (DMSO- d^6 , δ , м.д., J Гц): 1.65 с (3H, $C^{15}H_3$), 1.97 с (3H, $C^{10}H_3$), 2.55 с (3H, $C^{12}H_3$), 2.64 с (3H, $C^{14}H_3$), 4.48 д (2H, $C^{16}H_2$), 5.90 с (H^4), 12.21 с (C^9 -OH), 13.14 ш.с (NH), 13.40 с (C^7 -OH). ЯМР ^{13}C (DMSO- d^6 , δ , м.д.): 7.4 (C^{15}), 18.7 (C^{12}), 30.9 (C^{14}), 31.6 (C^{10}), 45.4 (C^{16}), 56.3 (C^{9b}), 100.8 (C^2), 101.8 (C^6), 102.3 (C^4), 105.1 (C^{9a}), 106.3 (C^8), 155.7 (C^{5a}), 157.6 (C^9), 162.5 (C^7), 169.2 (C^{11}), 172.9 (C^{17}), 174.9 (C^{4a}), 188.6 (C^3), 197.5 (C^1), 201.1 (C^{13}). Найдено: m/z 401.11090 $[M]^+$ $C_{20}H_{19}NO_8$. Вычислено: $M = 401.11105$.

2-({1-[(2S,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)уксусная кислота (-)-28 $[\alpha]_D^{20} -201$ (с 0.04; MeOH).

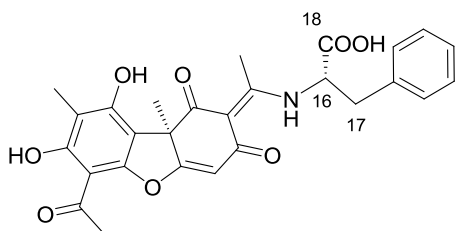
3-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)пропановая кислота (+)-77. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 55%, т. пл. 105-110 °С. $[\alpha]_D^{30} +353$ (с 0.26; $CHCl_3$). ИК спектр (ν , cm^{-1}): 668, 1068, 1289, 1372, 1464, 1559, 1626, 1695, 1727, 3023. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.65 с (3H, $C^{15}H_3$), 2.04 с (3H, $C^{10}H_3$), 2.61 с (3H, $C^{12}H_3$), 2.64 с (3H, $C^{14}H_3$), 2.79 т (2H, J = 6.1, $C^{17}H_2$), 3.79 д.т. (2H, J = 6.1 и 5.8, $C^{16}H_2$), 5.80 с (H^4), 11.71 с (C^9 -OH), 13.36 ш.с (NH), 13.27 с (C^7 -OH). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.5 (C^{15}), 18.3 (C^{12}), 31.2 (C^{14}), 32.0 (C^{10}), 33.4 (C^{17}), 39.4 (C^{16}), 57.4 (C^{9b}), 101.3 (C^6), 102.0 (C^4), 102.3 (C^2), 104.9 (C^{9a}), 108.1 (C^8), 155.8 (C^{5a}), 158.1 (C^9), 163.5 (C^7), 173.7 (C^{11}), 174.7 (C^{17}), 175.5 (C^{4a}), 190.5 (C^3), 198.5 (C^1), 200.7 (C^{13}). Найдено: m/z 415.12671 $[M]^+$ $C_{21}H_{21}NO_8$. Вычислено: $M = 415.12670$.

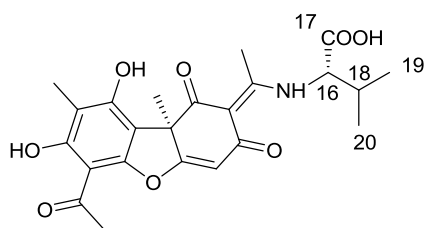
3-({1-[(2S,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)пропановая кислота (-)-77 $[\alpha]_D -367$ (с 0.48; $CHCl_3$);

(2S)-2-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден]этил}амино)-3-фенилпропановая кислота (+)-78. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 59%, т. пл. 240 °С с разложением. $[\alpha]_D^{30} +154$ (*c* 0.3; CHCl₃). ИК спектр (ν , см⁻¹): 848, 1070, 1201, 1287, 1372, 1460, 1542, 1632, 1701, 1738, 2926, 3042, 3436. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.63 с (3H, C¹⁵H₃), 1.97 с (3H, C¹⁰H₃), 2.39 с (3H, C¹²H₃), 2.63 с (3H, C¹⁴H₃), 3.15 и 3.29 д (2H, C¹⁸H₂), 5.06 д (H¹⁶), 5.84 с (H⁴), 7.20-7.27 (5H^{аром}), 12.02 с (C⁹-OH), 13.35 ш.с (NH), 13.35 с (C⁷-OH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.5 (C¹⁵), 18.5 (C¹²), 31.0 (C¹⁴), 31.6 (C¹⁰), 38.1 (C¹⁸), 56.4 (C^{9b}), 57.3 (C¹⁶), 100.8 (C²), 101.7 (C⁶), 102.4 (C⁴), 105.0 (C^{9a}), 106.4 (C⁸), 127⁸.1 1с, 128.4 2с, 129.5 2с, 135.4 1с – все аром., 155.7 (C^{5a}), 157.6 (C⁹), 162.5 (C⁷), 170.8 (C¹¹), 172.9 (C¹⁷), 174.5 (C^{4a}), 188.8 (C³), 197.7 (C¹), 200.9 (C¹³). Найдено: *m/z* 491.15982 [M]⁺ C₂₇H₂₅NO₈. Вычислено: M = 491.15800.

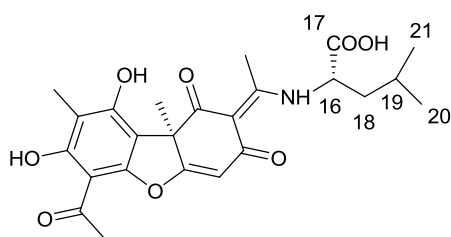
(2S)-2-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден]этил}амино)-3-метилбутановая кислота (+)-79. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 61%, т. пл. 210 °С с разложением. ИК спектр (ν , см⁻¹): 850, 1067, 1132, 1186, 1287, 1373, 1475, 1555, 1627, 1701, 1741, 2963, 3109. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.12 д и 1.16 д (3H и 3H, J = 6.8, C¹⁹ и C²⁰), 1.73 с (3H, C¹⁵H₃), 2.09 с (3H, C¹⁰H₃), 2.48 д.септ. (H¹⁸, J = 4.6 и 6.8), 2.63 с (3H, C¹²H₃), 2.68 с (3H, C¹⁴H₃), 4.41 д.д (H¹⁶, J = 4.6 и 8.1), 5.88 (H⁴), 9.09 (C¹⁷OOH), 11.78 ш.с (C⁹-OH), 13.32 (C⁷-OH), 13.90 ш.с (NH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.4 (C¹⁵), 18.7 (C¹²), 17.6 и 19.0 (C¹⁹ и C²⁰), 31.1 (C¹⁴), 31.4 (C¹⁰), 38.9 (C¹⁸), 57.3 (C^{9b}), 61.9 (C¹⁶), 101.3 (C⁶), 102.2 и 102.3 (C² и C⁴), 104.8 (C^{9a}), 108.1 (C⁸), 155.7 (C^{5a}), 158.0 (C⁹), 163.4 (C⁷), 172.7 (C¹⁷), 174.6 (C¹¹), 175.1 (C^{4a}), 190.7 (C³), 198.6 (C¹), 200.7 (C¹³). Найдено: *m/z* 443.15820 [M]⁺ C₂₃H₂₅NO₈. Вычислено: M = 443.15800.

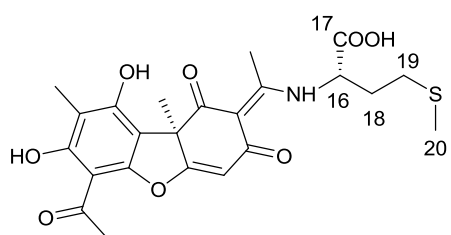
(2S)-2-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден]этил}амино)-4-метилпентановая кислота (+)-80. Светло-жёлтый аморфный порошок.

Выход 47%, т. пл. 105 °С. $[\alpha]_D^{30} +290$ (*c* 0.35; CHCl₃). ИК спектр (ν , см⁻¹): 844, 1064, 1135, 1189, 1289, 1371, 1468, 1553, 1629, 1699, 1745, 2960, 3090. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 0.99 д и 1.05 д (3H и 3H, J = 6.4, C²¹ и C²⁰), 1.74 с (3H, C¹⁵H₃), 1.85 м (H¹⁹), 1.94 м (H¹⁸), 2.10 с (3H, C¹⁰H₃), 2.65 с (3H, C¹²H₃), 2.69 с (3H, C¹⁴H₃), 4.53 м (H¹⁶), 5.87 с (H⁴), 8.26



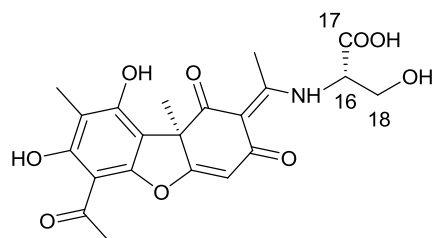
ш.с ($C^{17}OON$), 11.76 ш.с (C^9-OH), 13.34 (C^7-OH), 13.80 ш.с (NH). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.0 (C^{15}), 18.3 (C^{12}), 21.4 и 22.2 (C^{21} и C^{20}), 24.4 (C^{19}) 30.8 (C^{14}), 31.5 (C^{10}), 40.9 (C^{18}), 54.7 (C^{16}), 60.1 (C^{9b}), 97.9 (C^2), 100.9 (C^6), 101.9 (C^4), 104.4 (C^{9a}), 107.8 (C^8), 155.3 (C^{5a}), 157.7 (C^9), 163.1 (C^7), 173.6 (C^{11}), 174.3 (C^{4a}), 174.4 (C^{17}), 190.3 (C^3), 198.3 (C^1), 200.3 (C^{13}). Найдено: m/z 457.17270 $[M]^+$ $C_{24}H_{27}NO_8$. Вычислено: $M = 457.17365$.

(2S)-2-((1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден]этил)амино)-4-(метилсульфанил)бутановая кислота (+)-81. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 17%, т. пл. 100-102 $^{\circ}C$. $[\alpha]_D^{29} +269$ (с 0.27, $CHCl_3$). ИК спектр (ν , cm^{-1}): 841, 1066, 1140, 1190, 1289, 1370, 1464, 1551, 1630, 1700, 1742, 2923, 3080. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.69 с (3H, $C^{15}H_3$), 2.04 с (3H, $C^{10}H_3$), 2.12 с (3H, $C^{20}H_3$), 2.35 м (2H, $C^{18}H_2$), 2.64 с (3H, $C^{12}H_3$), 2.65 м (2H, $C^{19}H_2$) 2.67 с (3H, $C^{14}H_3$), 4.82 м (H^{16}), 5.85 с (H^4), 8.69 ш.с ($C^{17}OON$), 11.66 с (C^9-OH), 13.27 (C^7-OH), 13.61 ш.с (NH). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.5 (C^{15}), 15.3 (C^{20}), 18.9 (C^{12}), 29.8 (C^{18}) 31.3 (C^{14}), 31.6 (C^{19}), 32.1 (C^{10}), 54.9 (C^{16}), 57.4 (C^{9b}), 101.4 (C^6), 102.2 (C^4), 102.8 (C^2), 104.9 (C^{9a}), 108.2 (C^8), 155.8 (C^{5a}), 158.1 (C^9), 163.5 (C^7), 172.4 (C^{11}), 174.8 (C^{17}), 175.5 (C^{4a}), 190.6 (C^3), 198.7 (C^1), 200.9 (C^{13}). Найдено: m/z 475.12480 $[M]^+$ $C_{23}H_{25}NO_8S$. Вычислено: $M = 475.13007$.

(2S)-2-((1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден]этил)амино)-3-гидроксипропановая кислота (+)-82. Светло-жёлтый аморфный порошок.



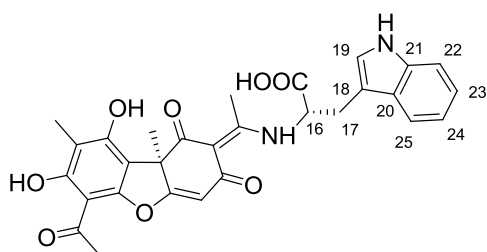
Выход 29%, т.пл. 105-108 $^{\circ}C$. ИК спектр (ν , cm^{-1}): 844, 1065, 1119, 1190, 1286, 1371, 1465, 1557, 1629, 1698, 1745, 2928, 3393. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.58 с (3H, $C^{15}H_3$), 1.97 с (3H, $C^{10}H_3$), 2.60 с (3H, $C^{12}H_3$), 2.68 с (3H, $C^{14}H_3$), 4.22 и 4.34 д.д (2H, АВ-система, J = 44.7 и 11.5, $C^{18}H_2$), 4.78 м (H^{16}), 5.52 (H^4), 11.32 ш.с (C^9-OH), 13.24 (C^7-OH), 13.58 ш.д (NH, J = 7.6). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.5 (C^{15}), 19.2 (C^{12}), 30.9 (C^{14}), 31.8 (C^{10}), 58.3 (C^{16}), 58.6 (C^{9b}), 62.9 (C^{18}), 101.0 и 101.3 (C^6 и C^4), 102.7 (C^{9a}), 103.9 (C^2), 108.4 (C^8), 155.2 (C^{5a}), 157.4 (C^9), 163.7 (C^7), 170.2 (C^{17}), 174.4 и 175.1 (C^{11} и C^{4a}), 190.5 (C^3), 198.8 (C^1), 200.3 (C^{13}). Найдено: m/z 431.1222 $[M]^+$ $C_{21}H_{21}O_9N$. Вычислено: $M = 431.1216$

Синтез соединений 81, 83.

1 ммоль (344 мг) УК и 1.2 ммоль аминокислоты растворили в этиловом спирте, добавили 1 мл Et₃N, кипятили 5 часов. Охладили, добавили разбавленной соляной кислоты до pH ~ 5. Выпадает осадок, его отфильтровывали, промывали водой и сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент - хлороформ с градиентом этилацетата от 0 до 50%. По такой методике получены соединения **81**, **83**.

(2S)-2-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)-4-(метилсульфанил)бутановая кислота (+)-81. Выход 79%.

(2S)-2-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),6,10,12-тетраен-4-илиден}этил)амино)-3-(1H-индол-3-ил)пропановая кислота (+)-83. Светло-жёлтый аморфный порошок.

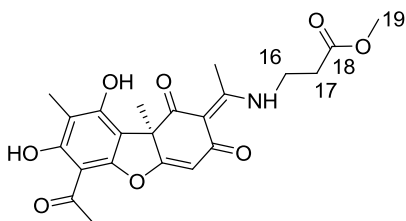


Выход 86%. т.пл. 165 – 167 °С. $[\alpha]_D^{20} +270$ (с 0.14, CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆, δ, м.д., J Гц): 1.57 (с, 3H, CH₃-15), 1.92 (с, 3H, CH₃-10), 2.34 (с, 3H, CH₃-12), 2.59 (с, 3H, CH₃-14), 3.32 (м, 2H, CH-17, CH-17' и 1H, NH), 5.02 (м, 1H, CH-16), 5.79 (с, 1H, CH-4), 6.91 (т, 1H, CH-23, *J* = 7.4 Hz), 7.01 (т, 1H, CH-24, *J* = 7.4 Hz), 7.11 (д, 1H, CH-19, *J* = 2.0 Hz), 7.29(д, 1H, CH-25, *J* = 8.0 Hz), 7.43 (д, 1H, CH-22, *J* = 8.0 Hz), 10.96(с, 1H, OH-9), 12.08 (с, 1H, COOH), 13.36 (с, 1H, OH-7), 13.64 (ш.с, 1H, NH). ЯМР ¹³C (DMSO-d₆, δ, м.д.): 7.5 (C-10), 18.7 (C-15), 28.4 (C-17), 31.1 (C-12), 31.7 (C-14), 56.4 (C-16), 57.0 (C-9b), 100.9 (C-2), 101.8 (C-6), 102.4 (C-4), 105.1 (C-9a), 106.3 (C-8), 107.6 (C-18), 111.5 (C-22), 118.1 (C-25), , 118.6 (C-23), 121.1 (C-24), 124.6 (C -19), 127.1 (C-20), 136.1 (C-21), 155.7 (C-7), 157.6 (C-5a), 162.5 (C-9), 171.3 (COOH), 172.9 (C-11), 174.4 (C-4a), 188.8 (C-3), 197.6 (C-1), 200.9 (C-13). Найдено: *m/z* 530.1574 [M]⁺. C₂₉H₂₆N₂O₈. Вычислено: M = 530.1684.

Синтез соединений **84**, **85**.

К 0.011моль β-аланина в 10мл MeOH или EtOH при перемешивании и охлаждении добавляют 0.023моль SOCl₂ по каплям. Кипятили реакционную смесь 2 часа. Удалили растворитель. Получили метиловый или этиловый эфир β-аланина в виде белого порошка. В реакции с УК эфиры использовались без очистки. 1 ммоль (344 мг) УК и 1.2 ммоль эфира β-аланина растворили в этиловом спирте, добавили 1 мл Et₃N, кипятили 5 часов. Охладили, добавили разбавленной соляной кислоты до pH ~ 5. Выпадает осадок, его отфильтровывали, промывали водой и сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент - хлороформ с градиентом этилацетата от 0 до 50%.

Метилловый эфир 3-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)пропановой кислоты (+)-84. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 81%. Т.пл. 101-103 °С. $[\alpha]_D^{20} +314$ (с 0.3; CHCl₃).

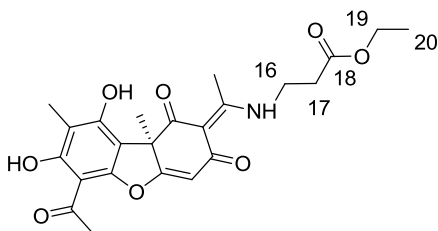
Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.67 (3H, с, Н- 5), 2.06 (3H, с, Н-10), 2.64 (6H, с, Н-12, Н-14), 2.73 (2H, т, J 6.6, Н-17), 3.74 (3H, с, Н-19), 3.76 (2H, д.т., J 6.2 и 6.6, Н-16), 5.75 (1H, с, Н-4), 11.98 (1H, с, Н-9), 13.33 (1H, с, Н-7), 13.64 (1H, с, NH).

ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ м.д.) 7.35 (C-15), 18.03 (C-12), 31.16, 31.79 (C-14, C-10), 33.32 (C-17), 39.12 (C-16), 52.21 (C19), 57.27 (C9b), 101.22 (C-6), 102.11 (C-4), 102.23 (C-2), 104.90 (C-4a), 107.86 (C-8), 155.72 (C-5a), 158.10 (C-9), 163.34 (C-7), 170.64 (C18), 172.38 (C-11), 174.83 (C-4a), 189.88 (C-3), 198.28 (C-1), 200.55 (C-13). Найдено: *m/z* 429.1420 [M]⁺ C₂₂H₂₃O₈N. Вычислено: M = 429.1418.

Метилловый эфир 3-({1-[(2S,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)пропановой кислоты (-)-84.

$[\alpha]_D^{20} -312$ (с 0.36; CHCl₃).

Этиловый эфир 3-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)пропановой кислоты (+)-85. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 48%. $[\alpha]_D^{27} +310$ (с 0.36; CHCl₃). Спектр ЯМР

¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.27 (3H, т, J 7.2, Н-20), 1.67 (3H, с, Н(15)), 2.06 (3H, с, Н(10)), 2.64 (6H, с, Н(12), Н(14)), 2.71 (2H, т, J 6.6, Н-17), 4.20 (2H, кв, J 7.2, Н-19), 2.73 (2H, т, J=, Н(17)), 3.76 (2H, д.т., J 6.2 и 6.6, Н-16), 5.75 (1H, с, Н(4)),

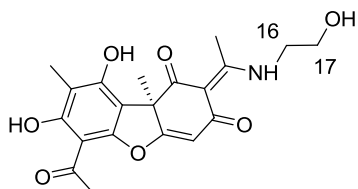
11.91 (1H, с, Н(9)), 13.32 (1H, с, Н(7)), 13.62 (1H, с, NH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ м.д.) 7.02 (C-15), 13.70 (C-20), 17.10 (C-12), 30.82 и 31.49 (C-14, C-10), 31.49 (C-19), 33.25 (C-17), 38.85 (C-16), 60.96 (C-9b), 100.90 (C-6), 101.90 (C-2), 101.91 (C-4), 104.59 (C-9a), 107.53 (C-8), 155.41 (C-5a), 157.80 (C-9), 163.03 (C-7), 169.86 (C-18), 173.65 (C-4a), 174.47 (C-11), 190.23 (C-3), 197.95 (C-1), 200.22 (C-13). Найдено: *m/z* 443.1574 [M]⁺ C₂₃H₂₅O₈N. Вычислено: M = 443.1575.

Синтез соединений 86, 87.

1 ммоль (344 мг) УК и 1.2 ммоль аминспирта растворили в 15 мл этилового спирта, перемешивали при комнатной температуре 5 часов. Добавили воды, разбавленной соляной кислоты до pH ~ 5. Выпадает осадок, его отфильтровывали, промывали водой и сушили на

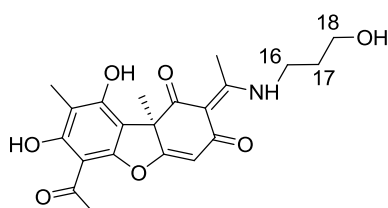
воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - хлороформ с градиентом этилацетата от 0 до 50%.

(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-4-{1-[(2-гидроксиэтил)амино]этилиден}-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-3,5-дион (+)-86. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход: 94%. Т.пл. 116-117 °С. $[\alpha]_D^{28} +345$ (с 0.23; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆, δ м.д., J/Гц) 1.62 (3H, с, Н-15), 1.94 (3H, с, Н-10), 2.59 и 2.60 (6H, с, Н-12, Н-14), 3.58-3.68 (4H, м, Н-16 и Н-17), 5.18 (1H, т, J 4.8, OH), 5.82 (1H, с, Н-4), 12.31 (1H, с, Н-9), 13.37 (1H, с, Н(7)), 13.09 (1H, м, NH). ЯМР ¹³C (DMSO-d₆, δ м.д.) 7.49 (C-15), 18.43 (C-12), 31.00 и 31.77 (C-14, C-10), 46.12 (C-16), 56.24 (C-17), 58.79 (C-9b), 100.81 (C-6), 101.61 (C-2), 102.350 (C-4), 105.14 (C-9a), 106.28 (C-8), 155.73 (C-5a), 157.69 (C-9), 162.52 (C-7), 172.80 (C-4a), 174.96 (C-11), 188.78 (C-3), 197.17 (C-1), 200.84 (C-13). Найдено: m/z 387.1306 [M]⁺ C₂₀H₂₁O₇N. Вычислено: M = 387.1313.

(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-4-{1-[(3-гидроксипропил)амино]этилиден}-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-3,5-дион (+)-87. Светло-жёлтый аморфный порошок.



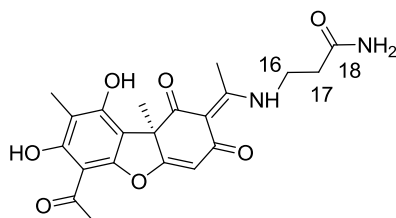
Выход 97%. Т.пл. 86-87 °С. $[\alpha]_D^{28} +350$ (с 0.35; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ м.д., J Гц): 1.66 (3H, с, Н-15), 1.96 (2H, м, Н-17), 2.05 (3H, с, Н-10), 2.62 и 2.63 (6H, с, Н-12, Н-14), 3.63 (2H, д.т., J 6.0 и 6.5, Н-16), 3.81 (2H, ш.т., J 6.0, Н-18), 5.73 (1H, с, Н-4), 11.93 (1H, с, Н-9), 13.32 (1H, с, Н(7)), 13.29 (1H, с, NH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ м.д.) 7.35 (C-15), 18.18 (C-12), 31.14 и 31.90 (C-14, C-10), 31.14 (C-17), 40.78 (C-16), 56.92 (C-18), 59.25 (C-9b), 101.21 (C-6), 102.14 (C-2), 102.30 (C-4), 104.96 (C-9a), 107.82 (C-8), 155.75 (C-5a), 158.15 (C-9), 163.32 (C-7), 173.95 (C-4a), 174.93 (C-11), 190.08 (C-3), 198.08 (C-1), 200.60 (C-13). Найдено: m/z 401.1468 [M]⁺ C₂₁H₂₃O₇N. Вычислено: M = 401.1469.

Синтез соединения 88.

Амид β -аланина получали по следующей методике: 280 мг метилового эфира β -аланина растворили в 10 мл метилового спирта. Добавили 5 мл водного аммиака и кипятили 4 часа. Реакционную смесь упарили. В реакцию с (+)-УК вводили реакционную смесь без дальнейшей очистки, по данным ЯМР ¹H содержание амида β -аланина в смеси составляет 60%. 344 мг (1 ммоль) УК и 280 мг реакционной смеси, содержащей амид β -аланина растворили в смеси 15 мл этилового спирта и 3 мл воды, кипятили 2 часа. Охладили, добавили воды. Выпадает осадок, его отфильтровывали, промывали водой и сушили на

воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - хлороформ с градиентом метилового спирта от 0 до 5%.

3-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)пропанами́д (+)-88. Светло-жёлтый аморфный порошок.



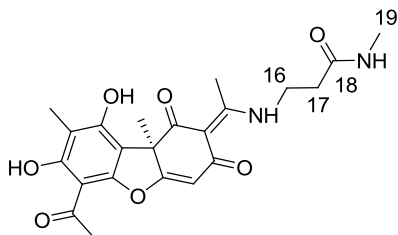
Выход 74%. Т.пл. 117-118 °С $[\alpha]_D^{20} +252$ (*c* 0.40; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.64 (3H, с, H-15), 2.05 (3H, с, H-10), 2.62-2.61 (6H, м, H-12, H-14), 2.66 (2H, т, J=, H-17), 3.75-3.81 (2H, м, C-16), 5.7 (1H, с, H-4), 6.14-6.30 (2H, 2с, NH₂), 11.81 (1H, с, H-9), 13.30 (1H, с, H-7), 13.30 (1H, с, NH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ м.д.) 7.37 (C-15), 18.05 (C-12), 31.15 и 31.85 (C-14, C-10), 34.30 (C-17), 39.43 (C-16), 57.04 (C-9b), 101.21 (C-6), 102.19 (C-4), 104.83 (C-2), 104.88 (C-9a), 107.87 (C-8), 155.68 (C-5a), 158.07 (C-9), 163.34 (C-7), 171.52 (C-18), 174.08 (C-4a), 174.94 (C-11), 190.23 (C-3), 198.22 (C-1), 200.56 (C-13). Найдено: *m/z* 414.1415 [M]⁺ C₂₁H₂₂O₇N₂. Вычислено: M = 414.1422.

3-({1-[(2S,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)пропанами́д (-)-88. $[\alpha]_D^{20} -247$ (*c* 0.46; CHCl₃)

Синтез соединения 89.

Метиламид β -аланина получали согласно методике³³⁸. 1.2 ммоль метиламида β -аланина и 1 ммоль (344 мг) УК растворили в 20 мл этилового спирта, добавили 1 мл Et₃N, кипятили 2 часа. Охладили, добавили воды, разбавленной HCl до pH ~ 5. Экстрагировали хлороформом три раза, экстракт сушили над MgSO₄ б/в, растворитель отгоняли на вакуумном ротационном испарителе. Полученный экстракт хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - хлороформ с градиентом метилового спирта от 0 до 2%.

3-({1-[(2R,4E)-10-ацетил-11,13-дигидрокси-2,12-диметил-3,5-диоксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-4-илиден}этил)амино)-N-метилпропанами́д (+)-89. Светло-жёлтый аморфный порошок.



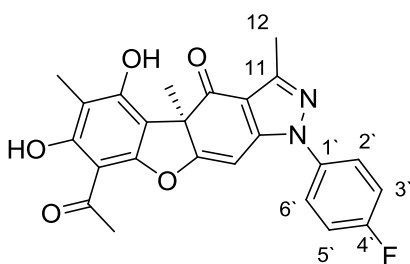
Выход: 77%, Т.пл. 104-105 °С $[\alpha]_D^{28} +290$ (*c* 1.25; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.65 (3H, с, H-15), 2.05 (3H, с, H-10), 2.57 (2H, т, J 6.6, H-17), 2.62 и 2.63 (6H, 2с, H-12 и H-14), 2.83 (3H, д, J = 4.8, H-17), 3.80 (2H, м, C-16), 5.72 (1H, с, H-4), 5.77 (NH), 6.14-6.30 (2H, дс, NH₂), 11.90 (1H, с, H-9), 13.33 (1H, с, H-7), 13.46 (1H, ш.с, NH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ м.д.) 7.34 (C-15), 18.13 (C-12), 26.42 (C-19), 31.15 и 31.83 (C-14, C-10), 34.97 (C-17), 39.81 (C-16), 56.94 (C-9b), 101.17 (C-6), 102.25

(C-4), 102.25 (C-2), 104.90 (C-9a), 107.80 (C-8), 155.70 (C-5a), 158.09 (C-9), 163.29 (C-7), 169.42 (C-18), 173.91 (C-4a), 174.90 (C-11), 190.23 (C-3), 198.15 (C-1), 200.57 (C-13). Найдено: m/z 428.1575 $[M]^+$ $C_{22}H_{24}O_7N_2$. Вычислено: $M = 428.1578$.

Синтез соединений 93-99.

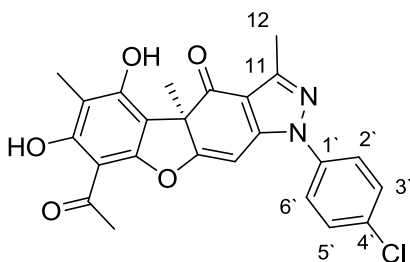
В реакциях замещённые гидразины использовались либо в виде оснований, либо в форме гидрохлоридов, гидробромидов. При использовании гидрохлоридов или гидробромидов фенилгидразинов перед проведением реакции 1.1 ммоль соли в 10 мл спирта кипятили на водяной бане 5 мин с добавлением эквимольного количества (0.1 мл) пиридина до полного растворения реагента. Свободные основания (1.1 ммоль) растворяли в 10 мл этилового спирта. К кипящему раствору добавляли взвесь 1 ммоль (+)-УК в 5 мл этилового спирта. Кипятили на водяной бане 2 ч. Охлаждали, добавили 30 мл дистиллированной воды. Выпадал осадок светложёлтого цвета. Осадок отфильтровали, промыли горячей водой, сушили на воздухе, хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - градиент метилового спирта в хлористом метиле от 0 до 10%.

(1R)-6-ацетил-12-(4-фторфенил)-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-93. Светложёлтый аморфный порошок.



Выход 88 %, т. пл. 208-211⁰С. ИК спектр, cm^{-1} : 3094, 2926, 1679, 1625, 1519, 1289, 1221, 1181, 1148, 1052, 845. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.82 с (3H, C¹⁵H₃), 2.10 с (3H, C¹⁰H₃), 2.59 с (3H, C¹⁴H₃), 2.64 с (3H, C¹²H₃), 6.20 с (H⁴), 7.26-7.29 м и 7.56-7.60 м (по 2H_{аром}), 11.07 с (C⁹-OH), 13.31 с (C⁷-OH). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ , м.д., (J, Гц): 7.4 (C¹⁰), 13.1 (C¹²), 30.3 (C¹⁵), 31.1 (C¹⁴), 60.3 (C^{9b}), 88.8 (C⁴), 101.4 (C⁶), 103.8 (C^{9a}), 108.3 (C⁸), 110.6 (C²), 116.4 и 116.7 (C³ и C⁵), 125.7 и 125.8 (C² и C⁶), 134.0 (C¹), 148.3 (C¹¹), 151.4 (C³), 155.2 (C^{5a}), 157.5 (C⁹), 162.3 д (C⁴, ¹J_{C,F} 248), 163.5 (C⁷), 173.1 (C^{4a}), 196.1 (C¹), 200.2 (C¹³). Найдено: m/z 434.12803 $[M]^+$, C₂₄H₁₉N₂O₅F. Вычислено: M 434.12779.

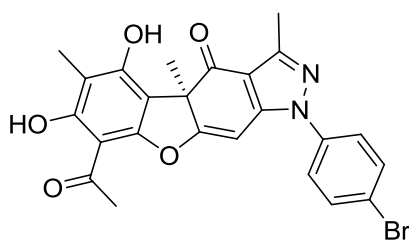
(1R)-6-ацетил-12-(4-хлорфенил)-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-94. Светложёлтый аморфный порошок.



Выход 89%, т. пл. 110-112⁰С. ИК спектр, cm^{-1} : 3094, 2923, 1675, 1626, 1507, 1369, 1289, 1178, 1149, 1046, 832. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м.д.: 1.82 с (3H, C¹⁵H₃), 2.11 с (3H, C¹⁰H₃), 2.59 с (3H, C¹⁴H₃), 2.65 с (3H, C¹²H₃), 6.23 с (H⁴), 7.55 с (4H_{аром}), 11.05 с (C⁹-OH), 13.32 с (C⁷-OH). Спектр ЯМР

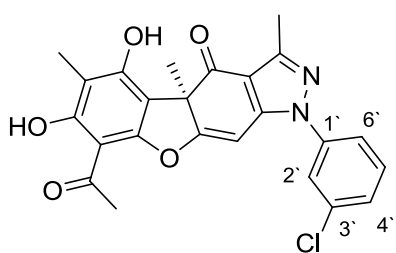
^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 7.4 (C^{10}), 13.1 (C^{12}), 30.3 (C^{15}), 31.1 (C^{14}), 60.4 (C^{9b}), 88.9 (C^4), 101.5 (C^6), 103.8 (C^{9a}), 108.3 (C^8), 110.7 (C^2), 125.0 (C^3 и C^5), 129.8 ($\text{C}^{2'}$ и C^6), 134.5 (C^1), 136.3 (C^4), 148.2 (C^{11}), 151.6 (C^3), 156.1 (C^{5a}), 157.5 (C^9), 163.5 (C^7), 173.3 (C^{4a}), 196.1 (C^1), 200.2 (C^{13}).
Найдено: m/z 450.09830 [M] $^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl}$. Вычислено: M 450.09824.

(1R)-6-ацетил-12-(4-бромфенил)-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-95. Светло-жёлтый аморфный порошок.



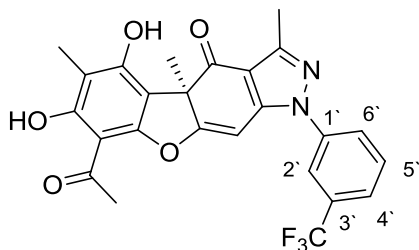
Выход 87%, т. пл. 130-132 °С. ИК спектр cm^{-1} : 3104, 2925, 1675, 1626, 1507, 1368, 1289, 1046, 826. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д., (J , Гц): 1.82 с (3H, C^{15}H_3), 2.11 с (3H, C^{10}H_3), 2.59 с (3H, C^{14}H_3), 2.65 с (3H, C^{12}H_3), 6.23 с (H^4), 7.49 д (2H, $\text{H}^{2'}$ и H^6) и 7.70 д (2H, H^3 и H^5) (AB -система, J 8.7), 11.04 с (C^9 -OH), 13.32 с (C^7 -OH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 7.4 (C^{10}), 13.1 (C^{12}), 30.3 (C^{15}), 31.1 (C^{14}), 60.4 (C^{9b}), 88.9 (C^4), 101.5 (C^6), 103.8 (C^{9a}), 108.3 (C^8), 110.8 (C^2), 122.4 (C^4), 125.2 ($\text{C}^{2'}$ и C^6), 132.8 (C^3 и C^5), 136.8 (C^1), 148.2 (C^{11}), 151.6 (C^3), 156.1 (C^{5a}), 157.49 (C^9), 163.5 (C^7), 173.3 (C^{4a}), 196.1 (C^1), 200.3 (C^{13}). Найдено: m/z 494.04902 [M] $^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{Br}$. Вычислено: M 494.04778.

(1R)-6-ацетил-12-(3-хлорфенил)-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-96. Светло-жёлтый аморфный порошок.



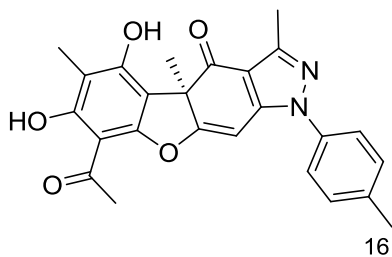
Выход 78%, т. пл. 100-102 °С. ИК спектр cm^{-1} : 3094, 2921, 1674, 1625, 1476, 1369, 1290, 1178, 1046, 777. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 1.82 с (3H, C^{15}H_3), 2.11 с (3H, C^{10}H_3), 2.59 с (3H, C^{14}H_3), 2.66 с (3H, C^{12}H_3), 6.26 с (H^4), 7.44-7.54 м (3H, H^4 , H^5 и H^6) и 7.64 м (1H, $\text{H}^{2'}$), 11.02 с (C^9 -OH), 13.32 с (C^7 -OH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 7.4 (C^{10}), 13.1 (C^{12}), 30.4 (C^{15}), 31.1 (C^{14}), 60.4 (C^{9b}), 88.9 (C^4), 101.5 (C^6), 103.8 (C^{9a}), 108.3 (C^8), 110.8 (C^2), 121.8 (C^6), 124.0 ($\text{C}^{2'}$), 128.7 (C^4), 130.6 (C^5), 135.4 (C^3), 138.8 (C^1), 148.3 (C^{11}), 151.7 (C^3), 156.1 (C^{5a}), 157.5 (C^9), 163.5 (C^7), 173.4 (C^{4a}), 196.1 (C^1), 200.3 (C^{13}). Найдено: m/z 450.09870 [M] $^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl}$. Вычислено: M 450.09824.

(1R)-6-ацетил-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-12-[3-(трифторметил)фенил]-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-97. Светло-жёлтый аморфный порошок.



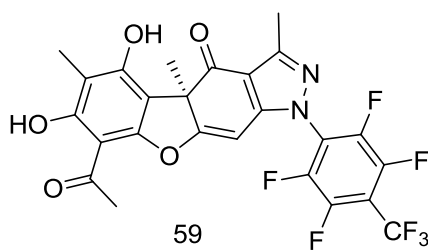
Выход 91%, т. пл. 162-165 °С. ИК спектр cm^{-1} : 3447, 3104, 2929, 1676, 1627, 1509, 1456, 1318, 1290, 1178, 1131, 1047, 794. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 1.85 с (3H, C^{15}H_3), 2.13 с (3H, C^{10}H_3), 2.61 с (3H, C^{14}H_3), 2.67 с (3H, C^{12}H_3), 6.24 с (H^4), 7.70-7.84 м (3H, H^4 , H^5 и H^6) и 7.90 м (1H, H^2), 11.01 с (C^9 -OH), 13.33 с (C^7 -OH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д., (J , Гц): 7.4 (C^{10}), 13.1 (C^{12}), 30.4 (C^{15}), 31.1 (C^{14}), 60.5 (C^{9b}), 88.6 (C^4), 101.5 (C^6), 103.7 (C^{9a}), 108.4 (C^8), 110.9 (C^2), 120.8 к (C^2 , $^1J_{\text{C,F}} 3.9$), 123.2 к (CF_3 , $^1J_{\text{C,F}} 173.0$), 125.2 к (C^4 , $^1J_{\text{C-F}} 3.9$), 126.8 (C^5), 130.3 (C^6), 132.5 к (C^3 , $^1J_{\text{C,F}} 33.3$), 138.4 (C^1), 148.4 (C^{11}), 151.9 (C^3), 156.1 (C^{5a}), 157.5 (C^9), 163.6 (C^7), 173.7 (C^{4a}), 196.1 (C^1), 200.3 (C^{13}). Найдено: m/z 484.1256 $[\text{M}]^+$, $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{F}_3$. Вычислено: M 484.1241.

(1R)-6-ацетил-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-12-[4-метилфенил]-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-98. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 95%, т. пл. 92-95 °С. ИК спектр cm^{-1} : 3110, 2922, 1675, 1626, 1521, 1369, 1289 1047, 815. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д., (J , Гц): 1.81 с (3H, C^{15}H_3), 2.10 с (3H, C^{10}H_3), 2.46 с (3H, C^{16}H_3), 2.59 с (3H, C^{14}H_3), 2.63 с (3H, C^{12}H_3), 6.22 с (H^4), 7.35 д (J 8, 2H, C^2 и C^6) и 7.46 д (2H, H^3 и H^5 , АВ-система, J 8), 11.14 с (C^9 -OH), 13.32 с (C^7 -OH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 7.4 (C^{10}), 13.2 (C^{12}), 21.1 (C^{16}), 30.4 (C^{15}), 31.1 (C^{14}), 60.2 (C^{9b}), 89.3 (C^4), 101.4 (C^6), 103.9 (C^{9a}), 108.1 (C^8), 110.5 (C^2), 123.7 (C^2 и C^6), 135.3 (C^4), 130.1 (C^3 и C^5), 138.9 (C^1), 148.0 (C^{11}), 151.2 (C^3), 156.2 (C^{5a}), 157.6 (C^9), 163.4 (C^7), 172.7 (C^{4a}), 196.1 (C^1), 200.3 (C^{13}). Найдено: m/z 430.15209 $[\text{M}]^+$, $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено: M 430.15286.

(1R)-6-ацетил-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-12-[2,3,5,6-тетрафтор-4-(трифторметил)фенил]-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-99. Светло-жёлтый аморфный порошок.



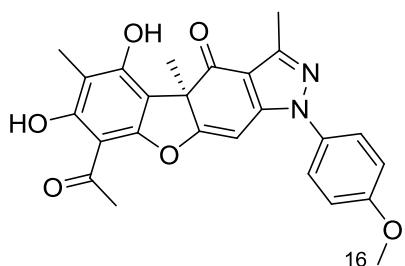
Выход 45%, т. пл. 145-149 °С. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 1.78 с (3H, C^{15}H_3), 2.13 с (3H, C^{10}H_3), 2.56 с (3H, C^{14}H_3), 2.60 с (3H, C^{12}H_3), 5.95 м (H^4), 10.76 с (C^9 -OH), 13.27 с (C^7 -OH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д., (J , Гц): 7.4 (C^{10}), 13.2 (C^{12}), 30.4 (C^{15}), 31.1 (C^{14}), 61.1 (C^{9b}), 88.2 (C^4), 86.6 (C^4), 101.6 (C^6), 103.5 (C^{9a}), 108.8 (C^8), 110.8 (C^2), 120.2 м (C^7 , $^1J_{\text{C,F}} 275$), 120.7 (C^1), 142.0 м (C^3 и C^5 , $^1J_{\text{C,F}} 140$), 145.6 м (C^2 и C^6 , $^1J_{\text{C,F}} 133$), 152.1 (C^3), 153.2 (C^{11}), 155.9 (C^{5a}),

157.3 (C^9), 163.7 (C^7), 174.9 (C^{4a}), 195.8 (C^1), 200.2 (C^{13}). Найдено: m/z 556.0861 [M]⁺, $C_{25}H_{15}N_2O_5F_7$. Вычислено: M 556.0864

Синтез соединений **100**, **101**.

Раствор натриевой соли сульфатов 1.1 ммоль гидразинов в водном этаноле (10 мл EtOH, 1 мл H₂O) кипятили с 0.4 мл конц. HCl на водяной бане 15 мин. Добавляли 0.5 г NaOAc в 5 мл воды и через 1 мин взвесить 1 ммоль (344 мг) (+)-УК в 5 мл спирта. Реакционную смесь кипятили 3 ч. Охладили, добавили 30 мл дистиллированной воды. Выпадал осадок светло-жёлтого цвета. Осадок отфильтровали, промыли горячей водой, сушили на воздухе, хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент - градиент метилового спирта в хлористом метиле от 0 до 10%.

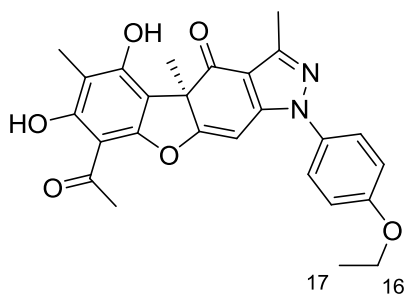
1R)-6-ацетил-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-12-[4-метоксифенил]-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-100. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 96%, т. пл. 167-172 °С. ИК спектр cm^{-1} : 3431, 2928, 1677, 1628, 1548, 1521, 1460, 1372, 1288, 1044, 840. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д., (*J*, Гц): 1.77 с (3H, C¹⁵H₃), 2.07 с (3H, C¹⁰H₃), 2.55 с (3H, C¹⁴H₃), 2.60 с (3H, C¹²H₃), 3.86 с (3H, C¹⁶H₃), 6.15 с (H⁴), 7.02 д (2H, H² и H⁶, *J* 9.05) и 7.45 д (2H, H³ и H⁵, *J* 9.05), 11.13 с (C⁹-OH), 13.29 с (C⁷-OH). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ, м.д.: 7.4 (C¹⁰), 13.2 (C¹²), 30.4 (C¹⁵), 31.1 (C¹⁴), 55.6 (C¹⁶), 60.2 (C^{9b}), 89.1 (C⁴), 101.4 (C⁶), 103.9 (C^{9a}), 108.1 (C⁸), 110.3 (C²), 114.6 (C² и C⁶), 125.3 (C³ и C⁵), 130.8 (C¹), 148.1 (C¹¹), 151.1 (C³), 156.2 (C^{5a}), 157.6 (C⁹), 159.7 (C⁴), 163.4 (C⁷), 172.6 (C^{4a}), 196.0 (C¹), 200.3 (C¹³). Найдено: m/z 446.14780 [M]⁺, C₂₅H₂₂N₂O₆. Вычислено: M 446.14777.

(1R)-6-ацетил-3,5-дигидрокси-12-(4-этоксифенил)-1,4,14-триметил-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-1061.

Светло-жёлтый аморфный порошок.



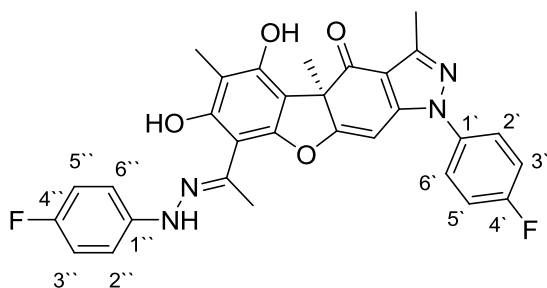
Выход 98%, т. пл. 200-202 °С. ИК спектр cm^{-1} : 3074, 2928, 1677, 1626, 1520, 1478, 1358, 1287, 1248, 1047, 829. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д., (*J*, Гц): 1.48 т (C¹⁷, *J* 6.9), 1.82 с (3H, C¹⁵H₃), 2.12 с (3H, C¹⁰H₃), 2.59 с (3H, C¹⁴H₃), 2.65 с (3H, C¹²H₃), 4.12 кв (3H, C¹⁶H₃, *J* 6.9), 6.19 с (H⁴), 7.04 д (2H, H² и H⁶, *J* 9), 7.47 д (2H, H³ и H⁵, *J* 9), 11.18 с (C⁹-OH), 13.33 с (C⁷-OH). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ, м.д.: 7.4 (C¹⁰), 13.2 (C¹²), 14.6 (C¹⁷), 30.4 (C¹⁵), 31.1 (C¹⁴), 60.2 (C^{9b}), 63.8 (C¹⁶), 89.2 (C⁴), 101.4 (C⁶), 103.9 (C^{9a}), 108.1 (C⁸), 110.3 (C²), 115.1 (C² и C⁶), 125.3 (C³ и C⁵), 130.6 (C¹), 148.1 (C¹¹), 151.1 (C³), 156.2 (C^{5a}), 157.6 (C⁹), 159.1 (C⁴), 163.4

(C⁷), 172.6 (C^{4a}), 196.0 (C¹), 200.3 (C¹³). Найдено: m/z 460.15639 [M]⁺, C₂₆H₂₄N₂O₆.
Вычислено: M 460.16342.

Синтез соединений **102-108**.

К раствору 3 ммоль солей гидразина в 10 мл спирта добавляли 0.3 мл пиридина, кипятили на водяной бане 5 мин до полного растворения гидразина или же. 3 ммоль свободного гидразина растворяли в 10 мл этилового спирта. К кипящему раствору добавляли взвесь 1 ммоль (+)-УК в 5 мл этилового спирта. Кипятили на водяной бане 2 ч. Охладили, добавили 30 мл дистиллированной воды. Выпадал осадок светло-жёлтого цвета. Осадок отфильтровали, промыли горячей водой, сушили на воздухе, хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент - градиент метилового спирта в хлористом метиле от 0 до 10%.

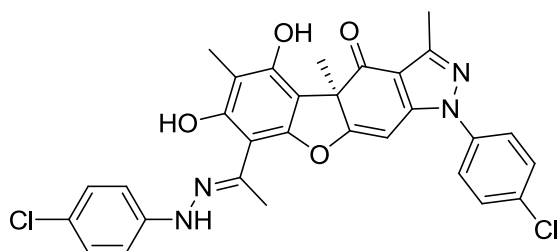
(1R)-12-(4-фторфенил)-6-[(1E)-1-[2-(4-фторфенил)гидразин-1-илиден]этил]-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-**102**.



Соединение **102** охарактеризовано из смеси с соединением **93** в соотношении 1:0.7 (ЯМР ¹H). Спектр ЯМР ¹H соединения **102** (CDCl₃), δ, м.д.: 1.74 с (3H, C¹⁵H₃), 2.11 с (3H, C¹⁰H₃), 2.39 с (3H, C¹⁴H₃), 2.54 с (3H, C¹²H₃), 6.06 с (H⁴), 6.93-6.97 м, 7.26-7.29 м и 7.56-7.60 м (4H, 2H и 2H_{аром}), 7.12 ш.с

NH, 10.51 с (C⁹-OH), 12.84 с (C⁷-OH). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ, м.д., (J, Гц): 8.0 (C¹⁰), 13.1 (C¹²), 15.1 (C¹⁵), 30.4 (C¹⁴), 60.4 (C^{9b}), 87.6 (C⁴), 100.1 (C⁶), 103.5 (C^{9a}), 108.1 (C⁸), 110.6 (C²), 114.0 и 114.1 (C^{3''} и C^{5''}), 115.8 и 116.0 (C^{2''} и C^{6''}), 116.3 и 116.4 (C^{3'} и C^{5'}), 125.7 и 125.8 (C^{2'} и C^{6'}), 134.1 (C^{1'}), 140.4 (C^{1''}), 146.2 (C¹³), 148.6 (C¹¹), 151.4 (C³), 152.2 (C⁹), 153.1 (C^{5a}), 156.4 (C⁷), 157.3 д и 162.2 д (C^{4'} и C^{4''}, ¹J_{C,F} 197), 173.7 (C^{4a}), 196.0 (C¹). Найдено: m/z 542.16790 [M]⁺, C₃₀H₂₄N₄O₄F₂. Вычислено: M 542.17655.

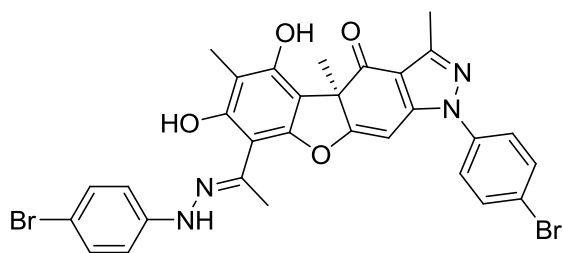
(1R)-12-(4-хлорфенил)-6-[(1E)-1-[2-(4-хлорфенил)гидразин-1-илиден]этил]-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-**103**



Соединение **103** охарактеризовано из смеси с соединением **94** в соотношении 1:0.3 (ЯМР ¹H). Спектр ЯМР ¹H соединения **103** (CDCl₃), δ, м.д.: 1.80 с (3H, C¹⁵H₃), 2.18 с (3H, C¹⁰H₃), 2.45 с (3H, C¹⁴H₃), 2.59 с (3H, C¹²H₃), 6.14 с (H⁴), 6.93-6.96 д, 7.24-7.27 д и 7.55 с (2H, 2H и 4H_{аром}), 7.12 ш.с NH, 10.54 с (C⁹-OH), 12.75 с (C⁷-OH). Спектр

ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 8.0 (C^{10}), 13.2 (C^{12}), 15.2 (C^{15}), 30.4 (C^{14}), 60.5 (C^{9b}), 87.8 (C^4), 100.1 (C^6), 103.5 (C^{9a}), 108.3 (C^8), 110.8 (C^2), 114.1 ($\text{C}^{3''}$ и $\text{C}^{5''}$), 129.3 ($\text{C}^{2''}$ и $\text{C}^{6''}$), 125.0 (C^3 и C^5), 129.7 (C^2 и C^6), 129.8 ($\text{C}^{4''}$), 134.3 (C^4), 136.5 (C^1), 142.5 ($\text{C}^{1''}$), 146.4 (C^{13}), 148.5 (C^{11}), 151.5 (C^3), 152.4 (C^9), 153.2 (C^{5a}), 157.9 (C^7), 173.9 (C^{4a}), 196.2 (C^1). Найдено: m/z 574.11820 [M] $^+$, $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}_2$. Вычислено: M 574.11745.

(1R)-12-(4-бромфенил)-6-[(1E)-1-[2-(4-бромфенил)гидразин-1-илиден]этил]-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он.

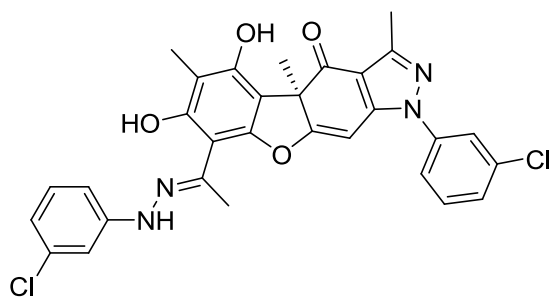


Соединение **104** охарактеризовано из смеси с соединением **95** в соотношении 1:0.2 (ЯМР ^1H).

Спектр ЯМР ^1H соединения **104** (CDCl_3), δ , м.д.: 1.74 с (3H, C^{15}H_3), 2.12 с (3H, C^{10}H_3), 2.38 с (3H, C^{14}H_3), 2.55 с (3H, C^{12}H_3), 6.09 с (H^4), 6.82-6.84 д, 7.31-7.34 д и 7.44-7.46 д и 7.64-7.66 д (по $2\text{H}_{\text{аром}}$), 7.13 ш.с NH, 10.49 с ($\text{C}^9\text{-OH}$), 12.72 с ($\text{C}^7\text{-OH}$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 8.0 (C^{10}), 13.1 (C^{12}), 15.1 (C^{15}), 30.4 (C^{14}), 60.4 (C^{9b}), 87.8 (C^4), 100.1 (C^6), 103.5 (C^{9a}), 108.2 (C^8), 110.7 (C^2), 114.4 ($\text{C}^{2''}$ и $\text{C}^{6''}$), 125.2 (C^2 и C^6), 132.1 (C^3 и C^5), 132.6 ($\text{C}^{3''}$ и $\text{C}^{5''}$), 112.9 ($\text{C}^{4''}$), 122.1 (C^4), 137.0 (C^1), 142.9 ($\text{C}^{1''}$), 146.5 (C^{13}), 148.4 (C^{11}), 151.5 (C^3), 152.3 (C^9), 153.1 (C^{5a}), 157.9 (C^7), 173.8 (C^{4a}), 196.1 (C^1). Найдено: m/z 662.01790 [M] $^+$, $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4\text{Br}_2$. Вычислено: M 662.01652.

((1R)-12-(3-хлорфенил)-6-[(1E)-1-[2-(3-хлорфенил)гидразин-1-илиден]этил]-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-

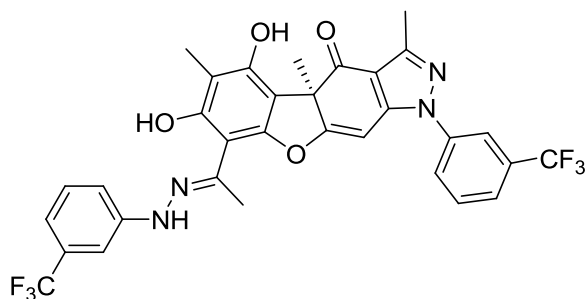
2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-105. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 95%, т. пл. 130-133 $^{\circ}\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д., J Гц): 1.79 с (3H, C^{15}H_3), 2.17 с (3H, C^{10}H_3), 2.44 с (3H, C^{14}H_3), 2.59 с (3H, C^{12}H_3), 6.18 с (H^4), 6.88 м (2H), 6.97 т (J 2.0, 1H), 7.20 т (1H, J 8.0), 7.46 м (1H), 7.50-7.52 м (2H) и 7.65-м (1H) - все $\text{C}_{\text{аром}}\text{H}$, 7.50 ш.с NH, 10.52 с ($\text{C}^9\text{-OH}$), 12.68 ш.с ($\text{C}^7\text{-OH}$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 7.9 (C^{10}), 13.0 (C^{12}), 15.1 (C^{15}), 30.4 (C^{14}), 60.5 (C^{9b}), 87.7 (C^4), 100.1 (C^6), 103.5 (C^{9a}), 108.3 (C^8), 110.8 (C^2), 111.0 ($\text{C}^{6''}$), 113.0 ($\text{C}^{2''}$), 120.6 (C^6), 121.7 (C^2), 123.9 ($\text{C}^{4''}$), 128.4 (C^4), 130.4 (C^5 и $\text{C}^{5''}$), 135.1 (C^3), 135.3 ($\text{C}^{3''}$), 139.0 (C^1), 145.1 ($\text{C}^{1''}$), 146.9 (C^{13}), 148.6 (C^{11}), 151.5 (C^3), 152.5 (C^9), 153.2 (C^{5a}), 157.9 (C^7), 173.9 (C^{4a}), 196.1 (C^1). Найдено: m/z 574.11760 [M] $^+$, $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}_2$. Вычислено: M 574.11745.

(1R)-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-12-[3-(трифторметил)фенил]-6-[(1E)-1-{2-[3-(трифторметил)фенил]гидразин-1-илиден}этил]-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-106.

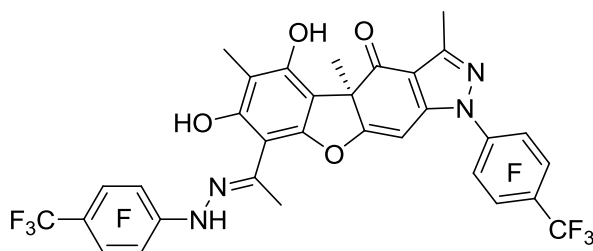
Соединение **106** охарактеризовано из смеси с соединением **97** в соотношении 1:0.2



(ЯМР ¹H). Спектр ЯМР ¹H соединения **106** (CDCl₃), δ, м.д., (J, Гц): 1.83 с (3H, C¹⁵H₃), 2.20 с (3H, C¹⁰H₃), 2.49 с (3H, C¹⁴H₃), 2.61 с (3H, C¹²H₃), 6.17 с (H⁴), 7.19 м (2H), 7.26 м (1H), 7.44 т (1H), 7.74 м (2H), 7.82 м (1H) и 7.90-м (1H) - все H_{аром}, 7.33 ш.с NH, 10.54 с (C⁹-OH), 12.59 ш.с (C⁷-OH).

Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), м.д.(J, Гц): 8.0 (C¹⁰), 13.1 (C¹²), 15.2 (C¹⁵), 30.4 (C¹⁴), 60.6 (C^{9b}), 87.6 (C⁴), 100.1 (C⁶), 103.5 (C^{9a}), 108.4 (C⁸), 110.9 (C²), 109.7 (C^{2''}), 115.7 (C^{6''}), 117.2 (C^{2'}), 120.7 (C^{6'}), 123.0 к и 125.0 к (2CF₃, ¹J_{C,F} 83.0), 125.0 (C^{4''}), 126.8 (C^{4'}), 130.1 к и 130.2 к (C^{5'} и C^{5''}), 132.0 к (C^{3'} и C^{3''}, J 32.3 и 33.3), 138.5 (C^{1'}), 144.2 (C^{1''}), 147.0 (C¹³), 148.6 (C¹¹), 151.8 (C³), 152.5 (C⁹), 153.2 (C^{5a}), 157.9 (C⁷), 174.2 (C^{4a}), 196.2 (C¹). Найдено: m/z 642.16897 [M]⁺, C₃₂H₂₄N₄O₄F₆. Вычислено: M 642.17016.

(1R)-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-12-[2,3,5,6-тетрафтор-4-(трифторметил)фенил]-6-[(1E)-1-{2-[2,3,5,6-тетрафтор-4-(трифторметил)фенил]гидразин-1-илиден}этил]-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-107. Светло-жёлтый аморфный порошок.

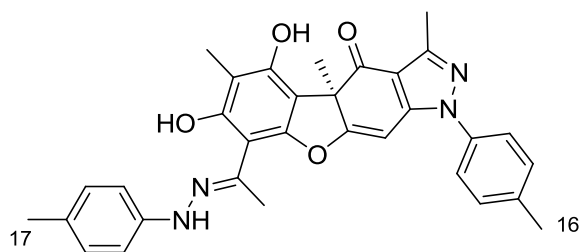


Выход 39%, т. пл. 140-143 °С.. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д.: 1.79 с (3H, C¹⁵H₃), 2.09 с (3H, C¹⁰H₃), 2.57 с (3H, C¹⁴H₃), 2.61 с (3H, C¹²H₃), 5.95 м (H⁴), 7.30 ш.с. (NH), 10.77 с (C⁹-OH), 13.28 с (C⁷-OH). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ,

м.д., (J, Гц): 8.0 (C¹⁵), 13.1 (C¹²), 15.0 (C¹⁴), 30.7 (C¹⁰), 61.1 (C^{9b}), 87.4 (C⁴), 101.5 (C⁶), 103.5 (C^{9a}), 108.7 (C⁸), 110.8 (C²), 120.7 м (C⁷), 120.7 (C^{1'}), 142.0 м (C^{3'} и C^{5'}, ¹J_{C,F} 140), 145.6 м (C^{2'} и C^{6'}, ¹J_{C,F} 133), 147.0 (C¹³), 148.6 (C¹¹), 151.8 (C³), 152.5 (C⁹), 153.2 (C^{5a}), 157.9 (C⁷), 174.2 (C^{4a}), 196.2 (C¹).

(1R)-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-12-(4-метилфенил)-6-[(1E)-1-[2-(4-метилфенил)гидразин-1-илиден]этил]-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-108.

Соединение **108** охарактеризовано из смеси с соединением **98** в соотношении 1:0.8 (ЯМР ¹H). Спектр ЯМР ¹H соединения **108** (CDCl₃), δ, м.д.: 1.80 с (3H, C¹⁵H₃), 2.19 с (3H,

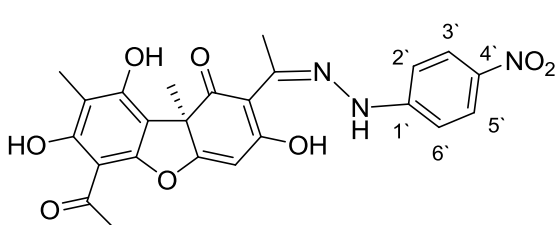


^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 7.9 (C^{10}), 13.0 (C^{12}), 14.9 (C^{15}), 20.4 (C^{10}), 20.9 (C^{16}), 30.4 (C^{10}), 60.3 (C^{9b}), 87.9 (C^4), 100.2 (C^6), 103.5 (C^{9a}), 108.2 (C^8), 110.5 (C^2), 113.1 ($\text{C}^{2''}$ и $\text{C}^{6''}$), 123.7 ($\text{C}^{2'}$ и C^6), 129.8 (C^3 и C^5), 129.9 ($\text{C}^{3''}$ и $\text{C}^{5''}$), 130.0 ($\text{C}^{4''}$), 135.5 (C^1), 138.5 (C^4), 141.9 ($\text{C}^{1''}$), 145.2 (C^3), 148.4 (C^{11}), 151.0 (C^{13}), 152.2 (C^9), 153.1 (C^{5a}), 158.0 (C^7), 173.5 (C^{4a}), 196.2 (C^1). Найдено: m/z 534.22600 [M] $^+$, $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_4$. Вычислено: M 534.22669.

Синтез соединений 109, 110.

4-нитро- или 2, 4-динитрофенилгидразин (1.1 ммоль) растворяли в 10 мл этилового спирта. К кипящему раствору добавляли взвесь 1 ммоль (+)-УК в 5 мл этилового спирта. Кипятили на водяной бане 2 ч. Охлаждали, добавили 30 мл дистиллированной воды. Выпадал осадок красного цвета. Осадок отфильтровали, промыли горячей водой, сушили на воздухе, хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - градиент метилового спирта в хлористом метиле от 0 до 10%.

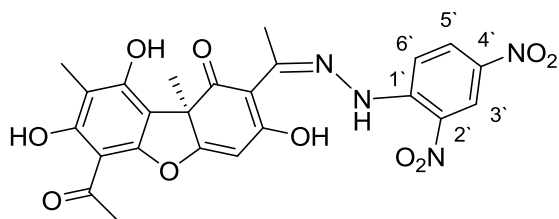
(R,Z)-6-ацетил-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметил-2-{1-[2-(4-нитрофенил)гидразоно]этил}дibenзо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-109. Красный аморфный порошок.



Выход 81 %, т. пл. 120-123 $^{\circ}\text{C}$. ИК спектр cm^{-1} : 3310, 3088, 2925, 1693, 1622, 1514, 1336, 1284, 1136, 1061, 833. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д., (J , Гц): 1.73 с (3H, C^{15}H_3), 2.05 с (3H, C^{10}H_3), 2.66 с (3H, C^{14}H_3), 2.75 с (3H, C^{12}H_3), 5.84 с (H^4), 6.88 д (J 9.1, 2H, H^2 и H^6), 7.38 (NH), 8.15 д (2H, H^3 и H^5 , J 9.1), 11.57 с (C^9 -OH), 13.35 с (C^7 -OH), 14.76 (C^3 -OH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 7.4 (C^{10}), 16.8 (C^{12}), 31.2 (C^{15}), 31.8 (C^{14}), 57.6 (C^{9b}), 101.3 (C^6), 101.8 (C^2), 101.8 (C^4), 104.6 (C^{9a}), 108.1 (C^8), 112.1 (C^2 и C^6), 126.1 (C^3 и C^5), 141.6 (C^4), 150.6 (C^1), 155.6 (C^{5a}), 157.8 (C^9), 163.4 (C^7), 176.7 (C^{4a}), 190.5 (C^3), 198.1 (C^1), 200.7 (C^{13}). Найдено: m/z 461.1218 Осколочный ион [M] $^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O} = \text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$. Вычислено для $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$: M 461.1228.

(R,Z)-6-ацетил-2-{1-[2-(2,4-динитрофенил)гидразоно]этил}-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдibenзо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-110. Тёмно-красный аморфный порошок.

Выход 87 %, т. пл. 93-95 $^{\circ}\text{C}$. ИК спектр cm^{-1} : 3310, 2924, 1624 1514, 1367, 1284, 1136, 1065, 834. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д. (J Гц): 1.80 с (3H, C^{15}H_3), 2.12 с (3H, C^{10}H_3), 2.71 с

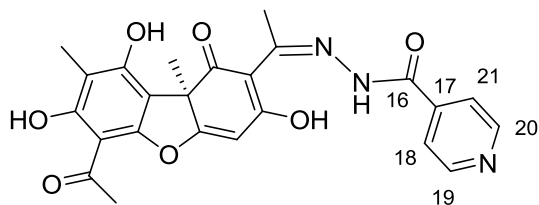


(3H, $C^{14}H_3$), 2.77 с (3H, $C^{12}H_3$), 5.98 с (H^4), 7.27 д (H^6 , J 9.3), 8.43 дд (H^5 , J 9.3 и 2.5), 9.22 д (H^3 , J 2.5), 10.32 с (NH), 11.25 с (C^9 -OH), 13.36 с (C^7 -OH), 15.62 с (C^3 -OH). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$), δ , м.д.: 7.4 (C^{10}), 16.5 (C^{12}), 31.2 (C^{15}), 31.7 (C^{14}), 58.3 (C^{9b}), 100.5 (C^4), 101.4 (C^6), 102.0 (C^2), 104.2 (C^{9a}), 108.7 (C^8), 114.1 (C^6), 123.6 (C^3), 129.9 (C^2), 131.0 (C^5), 139.3 (C^4), 145.0 ($C^{1'}$), 155.5 (C^{5a}), 157.6 (C^9), 163.6 (C^7), 172.2 (C^{11}), 176.0 (C^{4a}), 188.4 (C^3), 199.1 (C^1), 200.4 (C^{13}). Масс-спектр: 524(33), 506(16), 491(23), 461(26), 260(78), 234(60), 233(100), 217(39), 155(40), 69(88). Найдено: m/z 524.1164 $[M]^+$, $C_{24}H_{20}N_4O_{10}$. Вычислено: M 524.1174

Синтез соединения 111.

Изониазид (1.1 ммоль) и 1 ммоль (+)-УК растворили в 15 мл этилового спирта. Кипятили на водяной бане 2 ч. Охлаждали, добавили 30 мл дистиллированной воды. Выпадает осадок оранжевого цвета. Осадок отфильтровали, промыли горячей водой. Перекристаллизовывали из хлористого метилена.

N'-[(1Z)-1-[(2R)-10-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-3-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-4-ил]этилиден]пиридин-4-карбогидразид (+)-111. Оранжевый аморфный порошок.

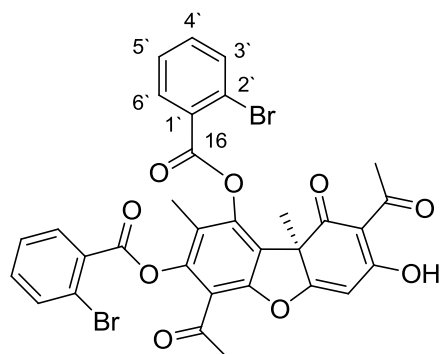


Выход 74 %, т. пл. 170-171⁰С. $[\alpha]_D^{30} +79$ (с 0.1; $CHCl_3$). Спектр ЯМР 1H ($DMSO-d_6$), δ , м.д. (J Гц): 1.68 с (3H, $C^{15}H_3$), 1.96 с (3H, $C^{10}H_3$), 2.63 с (3H, $C^{14}H_3$), 2.70 с (3H, $C^{12}H_3$), 5.94 с (H^4), 7.92 д (H^{18} и H^{21} , J 5.9), 8.82 д (H^{19} и H^{20} , J 5.9), 12.12 с (C^9 -OH), 13.39 с (C^7 -OH), 14.82 с (C^3 -OH). Спектр ЯМР ^{13}C ($DMSO-d_6$, δ , м.д.): 7.83 (C^{10}), 17.72 (C^{12}), 31.36 (C^{15}), 32.01 (C^{14}), 56.83 (C^{9b}), 101.03 (C^6), 101.20 (C^2), 102.61 (C^4), 105.38 (C^{9a}), 106.71 (C^8), 122.35 (C^{18} и C^{21}), 149.54 (C^{19} и C^{20}), 141.2 (C^{17}), 156.03 (C^{5a}), 157.86 (C^9), 162.85 (C^7), 163.58 (C^{16}), 173.76 (C^{11}), 178.60 (C^{4a}), 188.91 (C^3), 197.71 (C^1), 201.22 (C^{13}). Найдено: m/z 463.1372 $[M]^+$, $C_{24}H_{21}N_3O_7$. Вычислено: M 463.1374.

Синтез соединений 113-115

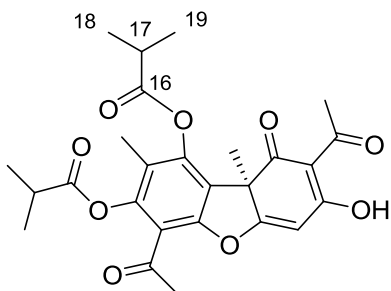
К 1 ммоль (+)-УК добавили 3 ммоль соответствующего хлорангидрида и растворили смесь в 15 мл серного эфира. Добавили 1.95 мл триэтиламина и 5 кристалликов DMAP. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 5 часов. Растворитель отогнали на ротационном испарителе. Полученную смесь делили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент – хлороформ.

(1R)-6,12-диацетил-3-(2-бромбензоилокси)-11-гидрокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-2,4,6,9,11-пентаен-5-ил-2-бромбензоат (+)-113. Светло-жёлтый аморфный порошок.



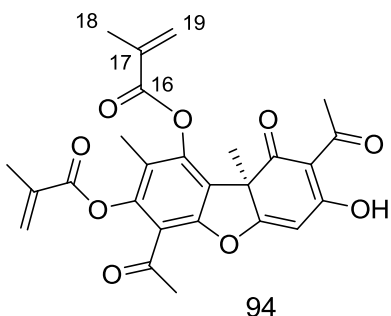
Выход 69 %. ИК спектр cm^{-1} : 843, 1091, 1218, 1690, 2929, 3017. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.86 с (3H, C15H3), 2.19 с (3H, C10H3), 2.39 с (3H, C12H3), 2.64 с (3H, C14H3), 5.90 с (1H, H4), 7.44 м (4H_{ар}), 7.76 м (2H_{ар}), 8.12 м (2H_{ар}), 18.19 с (1H, C3-OH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 10.6 (C-10), 25.3 (C-12), 30.5 (C-14), 31.6 (C-15), 59.1 (C-9b), 98.4 (C-4), 105.5 (C-2), 115.9 (C-9a), 122.1 (C-6), 122.1 (C-8), 122.5 и 123.5 (2C-2'), 127.1 (2C-5'), 129.9 (2C-1'), 131.8 (2C-3'), 133.1 (2C-6'), 134.4 (2C-4'), 147.8 (C-5a), 148.4 (C-9), 153.2 (C-7), 162.8 и 163.1 (2C-16), 177.1 (C-4a), 190.4 (C-3), 192.1 (C-1), 194.5 (C-13), 197.7 (C-11). Найдено: m/z 707.9628 [M]⁺C₃₂H₂₂O₉Br₂. Вычислено: M 707.9625.

(R)-4,8-диацетил-7-гидрокси-2,9а-диметил-9-оксо-9,9а-дигидродибензо[b,d]фуран-1,3-диил бис(2-метилпропаноат) (+)-114. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 63 %. ИК спектр cm^{-1} : 843, 1092, 1461, 1689, 2981, 3035. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.32 д и 1.33 д (12H, J 7.1 2C18H3 и 2C19H3), 1.80 с (3H, C15H3), 1.94 с (3H, C10H3), 2.51 с (3H, C12H3), 2.59 с (3H, C14H3), 2.84 септ и 2.99 септ (2H, J 7.1 2C17H), 5.88 с (1H, H4), 18.27 ш.с (1H, C3-OH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.5 (C-10), 18.2 и 18.3 (2C-19 и 2C-18), 25.5 (C-12), 30.4 (C-14), 31.4 (C-15), 33.6 (2C-17), 58.9 (C-9b), 98.1 (C-4), 105.5 (C-6), 115.7 (C-9a), 118.0 (C-2), 122.7 (C-8), 147.7 (C-5a), 148.4 (C-9), 152.8 (C-7), 174.1 и 174.2 (2C-16), 177.3 (C4-a), 190.3 (C-3), 192.2 (C-1), 194.5 (C-13), 197.7 (C-11). Найдено: m/z 484.1723 [M]⁺C₂₆H₂₈O₉. Вычислено: M 484.1728

(R)-4,8-диацетил-7-гидрокси-2,9а-диметил-9-оксо-9,9а-дигидродибензо[b,d]фуран-1,3-диил бис(2-метилацилат) (+)-115. Светло-жёлтый аморфный порошок.



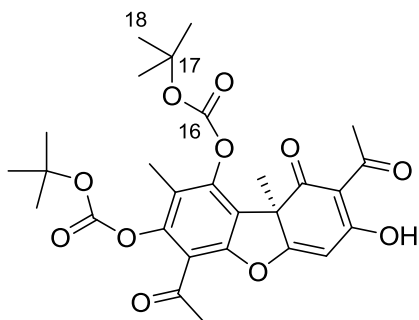
Выход 66 %. ИК спектр cm^{-1} : 794, 1115, 1456, 1689, 2928, 3032. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.80 с (3H, C15H3), 1.95 с (3H, C10H3), 2.07 с и 2.12 с (6H, 2C18H3), 2.45 с (3H, C12H3), 2.57 с (3H, C14H3), 5.25, 5.28, 6.28, 6.33 м (4H, C19H2), 5.86 с (1H, H4), 18.21 ш.с (1H, C3-OH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 10.1 (C10), 18.2 (2C18), 25.5 (C12), 30.6

(C14), 31.9 (C15), 59.3 (C9b), 98.5 (C4), 105.9 (C6), 113.8 (C9a), 116.1 (C2), 121.0 (C8), 128.1 (2C19), 134.9 (2C17), 146.2 (C5a), 148.2 (C7), 148.8 (C9), 164.8 (2C16), 177.5 (C4a), 190.6 (C3), 192.3 (C1), 194.7 (C13), 197.8 (C11). Найдено: m/z 480.1413 [M]⁺ C₂₆H₂₄O₉. Вычислено: M 480.1415

Синтез соединений 116 и 117.

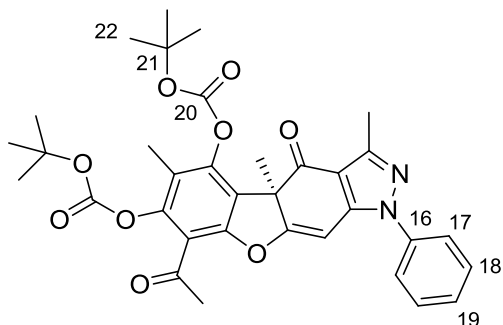
К раствору (+)-УК или соединения (+)-35 (1 ммоль) в 5 мл диэтилового эфира добавляют, 1 мл триэтиламина, маленький кристаллик DMAP и Вos₂O (6 ммоль). Перемешивают при комнатной температуре до полной конверсии субстрата (контроль по ТСХ). Реакционную смесь промывают водой, сушат над MgSO₄. Удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем, элюент – CHCl₃.

(R)-трет-бутил 4,8-диацетил-7-гидрокси-2,9а-диметил-9-оксо-9,9а-дигидродибензо[b,d]фуран-1,3-диил дикарбонат (+)-116. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 80%. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.50 и 1.54 (18H, с и с, H-18), 1.80 с (3H, C15H3), 1.94 с (3H, C10H3), 2.51 с (3H, C12H3), 2.59 с (3H, C14H3), 5.88 с (1H, H4), 18.27 ш.с (1H, C3-OH). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 9.5 (C-10), 25.5 (C-12), 27.47, 27.59 (6C-18); 30.4 (C-14), 31.4 (C-15), 58.9 (C-9b), 83.96, 84.11 (2C-17); 98.1 (C-4), 105.5 (C-6), 115.7 (C-9a), 118.0 (C-2), 122.7 (C-8), 147.7 (C-5a), 148.4 (C-9), 152.8 (C-7), 150.79 и 150.67 (2C-20); 177.3 (C-4a), 190.3 (C-3), 192.2 (C-1), 194.5 (C-13), 197.7 (C-11). Найдено: m/z 544.1949 [M]⁺ C₂₈H₃₂O₁₁. Вычислено: M = 544.1945.

(R)-8-ацетил-3,4а,6-триметил-4-оксо-1-фенил-4,4а-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-5,7-диил трет-бутил дикарбонат (+)-117. Светло-жёлтый аморфный порошок.

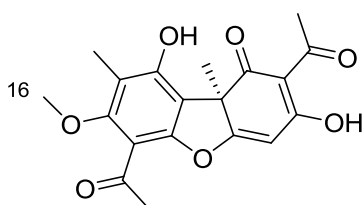


Выход 95%. [α]_D³⁰ +211 (с 0.2; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.50 и 1.54 (18H, с и с, H-22), 1.84 (3H, с, H-15), 2.06 (3H, с, H-10), 2.50 (3H, с, H-12), 2.55 (3H, с, H-14), 6.16 (1H, с, H-4), 7.39 (1H, с, H-19), 7.43-7.54 (4H, м, H-17 и H-18). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.) 9.42 (C-10); 12.80 (C-12); 27.47, 27.59 (6C-22); 29.30 (C-15); 31.73 (C-14); 60.58 (C-9b); 83.96, 84.11 (2C-21); 89.30 (C-4); 110.81 (C-9a); 115.69 (C-6); 119.30 (C-8); 122.49 (C-2); 123.57 (2C-17); 128.12 (C-19); 129.41 (2C-18); 138.06 (C-16); 145.30 (C-11); 146.60 (C-3); 147.87 (C-5a); 148.19 (C-7); 150.79, 150.67 (2C-20); 154.16 (C-9); 171.22 (C-4a); 190.39 (C-1); 195.07 (C-13). Найдено: m/z 616.2410 [M]⁺ C₃₄H₃₆O₉N₂. Вычислено: M = 616.2415.

Синтез соединения 118.

1 мМ УК в 20 мл ДМФА (перегнан над ВаО и непосредственно перед реакцией пропущен через колонку с прокаленным Al_2O_3) перемешивали с 828 мг прокаленного K_2CO_3 в течение двух или более часов при комнатной температуре до приобретения раствором темно-зеленой окраски. Затем добавляли 0.5 мл йодистого метила и перемешивали двое суток при комнатной температуре. Разбавляли реакционную смесь водой, выпавший смолистый осадок отфильтровывали на бумажном фильтре, промывали водой, высушивали и смывали хлороформом. Концентрировали на ротационном испарителе и хроматографировали полученный остаток на силикагеле, элюент – хлористый метилен.

(R)-1,1'-(3,9-дигидрокси-7-метокси-8,9b-диметил-1-оксо-1,9b-дигидродибензо[b,d]фуран-2,6-диил)диэтанон (+)-118. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 82%. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +460$ (*c* 0.48; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.71 (3H, с, H-15), 2.12 (3H, с, H-10), 2.55 (3H, с, H-12), 2.59 (3H, с, H-14), 3.71 (3H, с, H-16), 5.88 (1H, с, H-4), 10.76 (1H, с, OH-9), 18.76 (1H, с, OH-3). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.60 (C-10), 27.84 (C-12), 31.79 (C-15), 31.81 (C-14), 50.04 (C-9b), 62.20 (C-16), 97.87 (C-4), 108.32 (C-9a), 112.30 (C-6), 104.99 (C-2), 116.30 (C-8), 152.68 (C-5a), 154.81 (C-9), 159.35 (C-7), 179.97 (C-4a), 191.58 (C-13), 196.61 (C-3), 197.78 (C-1), 201.58 (C-11). Найдено: m/z 358.1046 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7$. Вычислено: $M = 358.1046$.

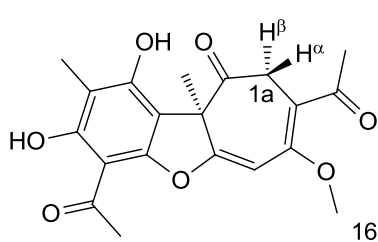
(S)-1,1'-(3,9-дигидрокси-7-метокси-8,9b-диметил-1-оксо-1,9b-дигидродибензо[b,d]фуран-2,6-диил)диэтанон (-)-118. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -450$ (*c* 0.40; CHCl_3).

Синтез соединения (+)-121

К раствору (+)-УК (1 ммоль) в 5 мл хлороформа, помещенного в термостат при температуре -35°C , осторожно при перемешивании приливают раствор диазометана, полученный из 2 г N-метил-N-нитрозомочевины, и оставляют при этой температуре до полной конверсии усниновой кислоты – 4-5 часов (контроль по ТСХ). Приливают 10% уксусную кислоту в диэтиловом эфире до прекращения выделения пузырьков газа. Удаляют из реакционной смеси растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – хлороформ.

(1R)-6,12-диацетил-3,5-дигидрокси-11-метокси-1,4-диметил-8-оксатрицикло[7.5.0.0^{2,7}]тетрадека-2,4,6,9,11-пентаен-14-он (+)-121. Светло-жёлтый аморфный порошок.

Выход 7%. Т.пл. 77-79 $^\circ\text{C}$. ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ м.д., J Гц): 1.58 (3H, с, H-15), 2.05 (3H, с, H-10), 2.47 (3H, с, H-12), 2.66 (3H, с, H-14), 2.81 (1H, дд, $^2J = 13.0$, $J_{1\alpha\beta,4} = 0.8$, H-1 $\alpha\beta$) 3.93

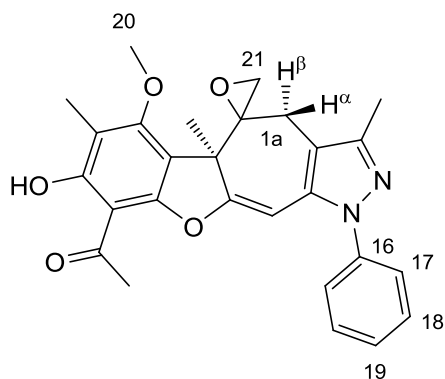


(3H, с, OCH₃-16), 4.20 (1H, д, ²J = 13.0, H-1α), 6.62 (1H, д, J_{4,1αβ} = 0.8, H-4), 9.55 (1H, с, OH-9), 13.32 (1H, с, OH-7). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.28 (к, C-10), 25.38 (к, C-15), 31.18 (к, C-14), 32.09 (к, C-12), 41.07 (т, C-1a), 57.89 (к, C-16), 61.33 (с, C-9b), 97.82 (д, C-4), 101.10 (с, C-6), 103.84 (с, C-9a), 108.26 (с, C-2), 108.87 (с, C-8), 154.46 (с, C-5a), 157.58 (с, C-9), 162.32 (с, C-3), 163.60 (с, C-7), 169.14 (с, C-4a), 195.38 (с, C-11), 200.52 (с, C-13), 217.21 (с, C-1). Найдено: *m/z* 372.1197 [M]⁺ C₂₀H₂₀O₇. Вычислено: M = 372.1204.

Синтез соединения 122

К раствору соединения **35** (1 ммоль) в 5 мл хлороформа осторожно при перемешивании приливают раствор диазометана, полученный из 2 г N-метил-N-нитрозомочевины, и оставляют при комнатной температуре до полного прекращения выделения пузырьков газа. Удаляют из реакционной смеси растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент – хлороформ.

1-[(10'R)-14'-гидрокси-12'-метокси-6',10',13'-триметил-4'-фенил-17'-окса-4',5'-дiazаспиро[оксиран-2,9'-тетрацикло[8.7.0.0^{3,7}.0^{11,16}]гептадекан]-1',3'(7'),5',11',13',15'-гексаен-15'-yl]этан-1-он (+)-122. Светло-жёлтый аморфный порошок.



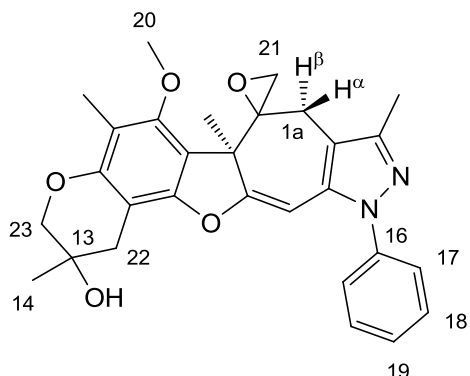
Выход 55%. Т.пл. 112-114 °С. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.73 (3H, с, H-15), 2.11 (3H, с, H-10), 2.14 (1H, дд, ²J = 4.7, J_{21,1αα} = 2.0, H-21), 2.24 (3H, с, H-12), 2.39 (1H, д, ²J = 17.0, H-1αβ), 2.44 (1H, д, ²J = 4.7, H'-21), 2.61 (3H, с, H-14), 3.66 (1H, дд, ²J = 17.0, J_{1αα,21} = 2.0, H-1αα), 3.93 (3H, с, OCH₃-20), 6.10 (1H, с, H-4), 7.34-7.38 (1H, м, H-19), 7.42-7.50 (4H, м, H-17, H-18), 13.30 (1H, с, OH-7). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 9.66 (к, C-10), 11.57 (к, C-12), 17.95 (к, C-15), 30.17 (т, C-1a), 31.44 (к, C-14), 50.84 (т, C-21), 52.07 (с, C-9b), 58.15 (с, C-1), 61.63 (к, C-20), 91.95 (д, C-4), 102.86 (с, C-6), 111.30 (с, C-9a), 111.35 (с, C-3), 112.75 (с, C-8), 125.19 (д, 2C-17), 127.43 (д, C-19), 129.06 (д, 2C-18), 133.33 (с, C-2), 139.37 (с, C-16), 147.90 (с, C-11), 156.49 (с, C-5a), 163.13 (с, C-9), 163.61 (с, C-7), 163.78 (с, C-4a), 201.62 (с, C-13). Найдено: *m/z* 458.1835 [M]⁺ C₂₇H₂₆O₅N₂. Вычислено: M = 458.1836.

Синтез соединений 123-124.

К раствору соединения **35** (1 ммоль) в 5 мл смеси хлороформа и метанола (1:1) осторожно при перемешивании приливают раствор диазометана, полученный из 2 г N-метил-N-нитрозомочевины, и оставляют при комнатной температуре до полного прекращения выделения пузырьков газа. Удаляют из реакционной смеси растворитель и

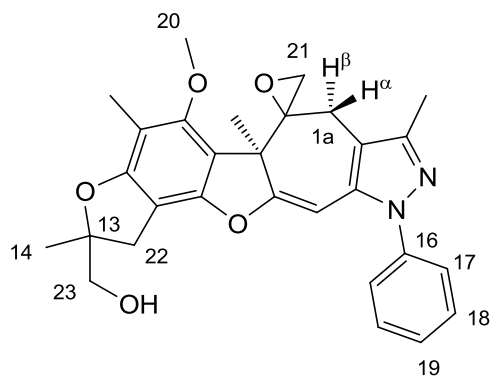
хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – хлороформ. Соединения **123** и **124** выделены с суммарным выходом ~50%.

(6bS)-6-метокси-2,5,6b,9-тетраметил-11-фенил-1,2,3,6b,8,11-гексагидроспиро[хромено[6'',5'':4',5']фууро[3',2':5,6]циклогепта[1,2-с]пиразол-7,2'-оксиран]-2-ол (+)-123. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.30 (3H, с, Н-14), 1.70 (3H, с, Н-15), 2.08 (3H, с, Н-10), 2.13 (1H, дд, $^2J = 4.8$, $J_{21,1\alpha\alpha} = 1.8$, Н-21), 2.21 (3H, с, Н-12), 2.36 (1H, д, $^2J = 17.1$, Н-1a β), 2.41 (1H, д, $^2J = 4.8$, Н'-21), 2.61 (1H, д, $^2J = 16.5$, Н-22a), 2.68 (1H, дд, $^2J = 16.5$, $J_{22e,23e} = 2.2$, Н-22e), 3.64 (1H, дд, $^2J = 17.1$, $J_{1\alpha\alpha,21} = 1.8$, Н-1a α), 3.77 (1H, д, $^2J = 10.8$, Н-23a), 3.84 (3H, с, Н-20), 3.92 (1H, дд, $^2J = 10.8$, $J_{23e,22e} = 2$, Н-23e), 6.00 (1H, с, Н-4), 7.29-7.35 (1H, м, Н-19), 7.39-7.46 (4H, м, Н-17, Н-18). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.80 (к, С-10), 11.54 (к, С-12), 18.21 (к, С-15), 24.67 (к, С-14), 30.21 (т, С-1a), 33.49 (т, С-22), 50.97 (т, С-21), 53.17 (с, С-9b), 58.09 (с, С-1), 61.43 (к, С-20), 64.94 (с, С-13), 73.81 (т, С-23), 90.72 (д, С-4), 99.05 (с, С-6), 110.93 (с, С-3), 112.41 (с, С-9a), 112.76 (с, С-8), 125.13 (д, 2С-17), 127.22 (д, С-19), 128.91 (д, 2С-18), 133.95 (с, С-2), 139.35 (с, С-16), 147.74 (с, С-11), 152.79 (с, С-7), 153.57 (с, С-5a), 155.48 (с, С-9), 164.72 (с, С-4a).

((5bS)-5-метокси-2,4,5b,8-тетраметил-10-фенил-2,5b,7,10-тетрагидро-1H-спиро[фууро[2'',3'':6',7']бензофууро[3',2':5,6]циклогепта[1,2-с]пиразол-6,2'-оксиран]-2-ил)метанол (+)-124



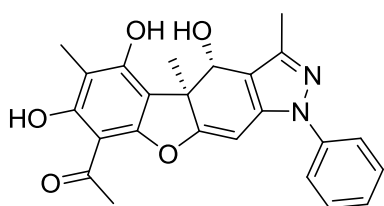
Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.39 (3H, с, Н-14), 1.70 (3H, с, Н-15), 2.06 (3H, с, Н-10), 2.14 (1H, дд, $^2J = 4.8$, $J_{21,1\alpha\alpha} = 2.2$, Н-21), 2.21 (3H, с, Н-12), 2.36 (1H, д, $^2J = 17.1$, Н-1a β), 2.41 (1H, д, $^2J = 4.8$, Н'-21), 2.77 (1H, д, $^2J = 15.2$, Н-22), 3.13 (1H, д, $^2J = 15.2$, Н'-22), 3.55 (2H, д, $^2J = 11.8$, Н-23), 3.62 (1H, д, $^2J = 11.8$, Н'-23), 3.64 (1H, шд, $^2J = 17.1$, Н-1a α), 3.85 (3H, с, Н-20), 5.99 (1H, с, Н-4), 7.29-7.35 (1H, м, Н-19), 7.39-7.46 (4H, м, Н-17, Н-18). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.97 (к, С-10), 11.54 (к, С-12), 18.16 (к, С-15), 23.30 (к, С-14), 30.23 (т, С-1a), 34.73 (т, С-22), 50.91 (т, С-21), 52.73 (с, С-9b), 58.08 (с, С-1), 61.27 (к, С-20), 67.93 (т, С-23), 89.80 (с, С-13), 90.72 (д, С-4), 102.40 (с, С-6), 107.15 (с, С-8), 111.04 (с, С-3), 112.28 (с, С-9a), 125.08 (д, 2С-17), 127.20 (д, С-19), 128.91 (д, 2С-18), 133.93 (с, С-2), 139.35 (с, С-16), 147.73 (с, С-11), 150.78 (с, С-5a), 156.98 (с, С-9), 160.20 (с, С-7), 165.05 (с, С-4a).

Синтез соединения 125.

К раствору соединения **35** (1 ммоль) в 20 мл ТГФ, охлаждённому до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ прибавляют взвеси 50 мг боргидрида натрия в 5 мл ТГФ и оставляют при перемешивании при указанной температуре на 2 часа. В реакционную смесь добавляют разбавленную соляную кислоту до pH ~ 5 , доводят до комнатной температуры, добавляют хлористый метилен (30 мл), промывают водой 2 раза, сушат над прокалённым MgSO_4 , удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – хлороформ.

1-[(1S,16R)-3,5,16-тригидрокси-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-6-ил]этан-1-он (+)-125. Светло-жёлтый аморфный порошок.

Выход 96%. т.пл. $155\text{ }^{\circ}\text{C}$. ИК-спектр (КВг, ν , cm^{-1}): 1068, 1288, 1369, 1441, 1627, 3188,



3392. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.35 (3H, с, H-15), 2.03 (3H, с, H-10), 2.32 (3H, с, H-12), 2.61 (3H, с, H-14), 5.26 (1H, ш.с, OH-1), 5.33 (1H, д, J 6, H-1), 5.87 (1H, с, H-4), 7.31-7.42 (5H, м, H-аром), 9.25 (1H, с, OH-9), 13.31 (1H, с, OH-7).

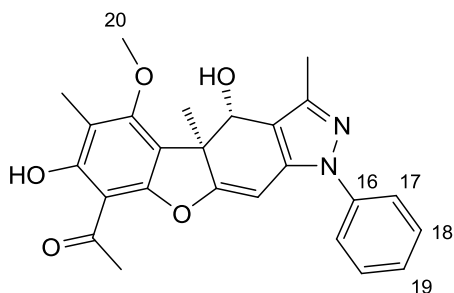
ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 6.97 (C-10), 12.25 (C-12), 15.93 (C-15),

30.79 (C-14), 50.90 (C-9b), 74.30 (C-1), 88.99 (C-4), 101.03 (C-6), 106.56 (C-9a), 107.66 (C-8), 111.35 (C-2), 123.23, 127.39, 129.01 и 137.75 (2C, C, 2C и C – все аром), 138.10 (C-3), 146.22 (C-11), 156.84 (C-9), 157.26 (C-5a), 162.58 (C-7), 167.26 (C-4a), 200.58 (C-13). Найдено: m/z 418.1521 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_2$. Вычислено: $M = 418.1523$

Синтез соединения 126.

К раствору соединения **125** (1 ммоль) в 5 мл хлороформа осторожно при перемешивании приливают раствор диазометана, полученный из 2 г N-метил-N-нитрозомочевины, и оставляют при комнатной температуре до полного прекращения выделения пузырьков газа. Удаляют из реакционной смеси растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – хлороформ.

1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4a,6-триметил-1-фенил-4,4a-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)этанон (+)-126. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 80%. Т.пл. $78\text{ }^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} +218$ (c 0.3; CHCl_3).

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.48 (3H, с, H-15), 2.13 (3H, с, H-10), 2.44 (3H, с, H-12), 2.67 (3H, с, H-14), 3.94 (3H, с, H-20), 3.97 (1H, с, OH-1), 5.40 (1H, с, H-1), 5.96 (1H, с, H-4), 7.30-7.51 (5H, м, H-аром), 13.26 (1H, с, OH-7).

ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.94 (C-10), 12.49 (C-12),

17.77 (C-15), 31.30 (C-14), 52.00 (C-9b), 61.49 (C-20), 74.21 (C-1), 89.93 (C-4), 103.92 (C-6), 111.96 (C-2), 112.05 (C-9a), 114.77 (C-8), 122.66 (C-17), 126.55 (C-19), 128.83 (C-18), 136.01

(C-16), 138.86 (C-3), 147.52 (C-11), 157.63 (C-5a), 159.36 (C-9), 162.86 (C-7), 166.71 (C-4a), 201.59 (C-13). Найдено: m/z 432.1678 $[M]^+$ C₂₅H₂₄O₅N₂. Вычислено: M = 432.16797.

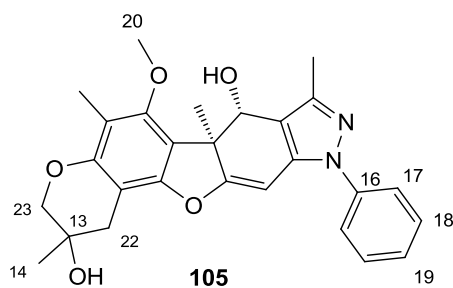
1-((4R,4aS)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)этанон ((-)-104A). Т.пл. 80 °С. $[\alpha]_D^{20}$ -203 (с 0.2; CHCl₃).

Синтез соединений 127 и 128.

К раствору соединения **125** (1 ммоль) в 5 мл смеси хлороформа и метанола (1:1) осторожно при перемешивании приливают раствор диазометана, полученный из 2 г N-метил-N-нитрозомочевины, и оставляют при комнатной температуре до полного прекращения выделения пузырьков газа. Удаляют из реакционной смеси растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент – хлороформ. Соединения **105** и **106** выделены с суммарным выходом ~8.2%.

(2S,3R)-20-метокси-2,5,15,19-тетраметил-7-фенил-11,17-диокса-6,7-диазапентацикло[10.8.0.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоза-1(20),4(8),5,9,12,18-гексаен-3,15-диол (+)-127.

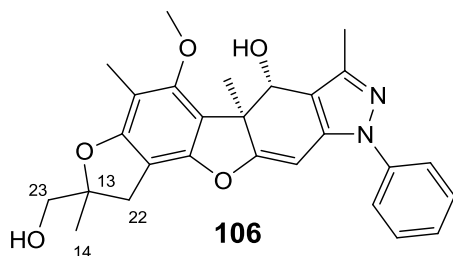
Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.33 (3H, с, H-14), 1.46 (3H, с, H-15), 2.10 (3H, с, H-10), 2.42 (3H, с, H-12), 2.70 (1H, д, ²J = 16.5, H-22a), 2.73 (1H, дд, ²J = 16.5, J_{22e,23e} = 2.2, H-22e), 3.78 (1H, д, ²J = 10.8, H-23a), 3.83 (3H, с, H-20), 3.98 (1H, дд, ²J = 10.8, J_{23e,22e} = 2, H-23e), 4.10 (1H, OH), 5.36 (1H, с, H-1), 5.83 (1H, с, H-4), 7.25-7.29 (1H, м, H-19), 7.39-7.47 (4H, м, H-17, H-18).

ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 9.34 (C-10), 12.68 (C-12), 18.14 (C-15), 24.83 (C-14), 33.40 (C-22), 53.29 (C-9b), 74.63 (C-1), 61.54 (C-20), 64.64 (C-13), 73.82 (C-23), 88.78 (C-4), 101.25 (C-6), 112.09 (C-2), 112.15 (C-8), 115.97 (C-9a), 122.92 (2C-17), 126.69 (C-19), 129.01 (2C-18), 137.07 (C-3), 139.15 (C-16), 147.62 (C-11), 152.51 (C-7), 152.63 (C-9), 154.94 (C-5a), 168.46 (C-4a).

(2S,3R)-15-(гидроксиметил)-19-метокси-2,5,15,18-тетраметил-7-фенил-11,16-диокса-6,7-диазапентацикло[10.7.0.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{13,17}]нонадека-1(19),4(8),5,9,12,17-гексаен-3-ол (+)-128.



Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.34 (3H, с, H-14), 1.46 (3H, с, H-15), 2.10 (3H, с, H-10), 2.42 (3H, с, H-12), 2.70 (1H, H-22), 3.20 (1H, H'-22), 3.37 (1H, H-23), 3.61 (1H, H'-23), 3.83 (3H, с, H-20), 5.83 (1H, с, H-4), 7.29-7.35 (1H, м, H-19), 7.39-7.46 (4H, м, H-17, H-18).

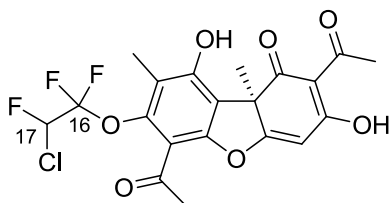
ЯМР ¹³C

(CDCl₃, δ, м.д.): 9.28 (C-10), 12.68 (C-12), 18.27 (C-15), 24.79 (C-14), 33.36 (C-23), 53.31 (C-9b), 61.52 (C-20), 64.99 (C-23), 74.51 (C-1), 90.24 (C-13), 88.80 (C-4), 101.18 (C-6), 112.09 (C-2), 112.12 (C-8), 115.93 (C-9a), 122.92 (2C-17), 126.69 (C-19), 129.01 (2C-18), 137.05 (C-3), 139.15 (C-16), 147.62 (C-11), 152.51 (C-7), 152.63 (C-9), 154.96 (C-5a), 168.43 (C-4a).

Синтез соединения 129.

Через смесь (0.3 г), K₂CO₃ (0.3 г) в 10 мл ДМФА (содержание воды 0.2%) при перемешивании и температуре 40-45 °С пропускали в течение 3-4 ч трифторхлорэтилен (примерно 500-600 мл). Реакционную смесь выливали в 300 мл воды, подкисляли 5%-ной соляной кислотой, оставляли на 0.5 ч для укрупнения мелкодисперсного выпавшего осадка, затем отфильтровывали, промывали 100 мл воды и сушили на воздухе (24 ч). Вещество очищали хроматографией на колонке с силикагелем (элюент – CH₂Cl₂).

(2R)-4,10-диацетил-11-(2-хлоро-1,1,2-трифторэтокси)-5,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-129. Светло-жёлтый аморфный порошок.



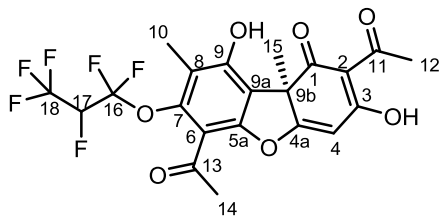
Выход 87%, т.пл. 137-138 °С (из CH₂Cl₂). УФ-спектр (EtOH), λ_{max} / нм (ε): 201 (49227), 265 (42529). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 18.82 (C³-OH), 11.00 (C⁹-OH), 6.34 (H¹⁷, ²J_{H-F} = 36.0; ³J_{H-F} = 5), 5.95 (H⁴), 2.64 (3H¹², 3H¹⁴), 2.18 (3H¹⁰), 1.78 (3H¹⁵). Спектр ЯМР ¹⁹F (CDCl₃, δ, м.д., J (Гц): 79.5 (м, 2F, F¹⁶), 9.5 (д.д, F¹⁷, J_{FH} = 48; J_{FF} = 10). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д., J (Гц): 201.7 (C¹¹), 197.5 (C¹³), 194.8 (C¹), 191.5 (C³), 179.0 (C^{4a}), 154.5 (C⁷), 152.2 (C⁹), 145.2 (C^{5a}), 119.3 (C⁸), 118.5 (C¹⁶, ¹J_{C-F} = 273.3; ²J_{C-F} = 26.1), 113.5 (C²), 111.1 (C^{9a}), 105.1 (C⁶), 98.4 (C⁴), 84.8 (C¹⁷, ¹J_{C-F} = 201.4; ²J_{C-F} = 35.6), 59.0 (C^{9b}), 31.7 (C¹⁰), 31.3 (C¹⁴), 27.6 (C¹²), 9.4 (C¹⁵). Найдено, *m/z*: 460.05328. C₂₀H₁₆F₃ClO₇. Вычислено: M = 460.05365.

Синтез соединений 130 и 131.

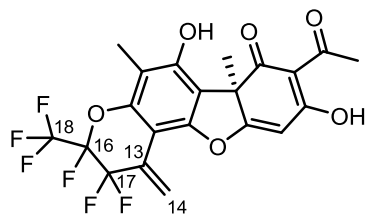
Через смесь УК (0.3 г), K₂CO₃ (0.3 г) в 10 мл ДМФА (содержание воды 0.2%) при перемешивании и температуре 40-45 °С пропускали в течение 3-4 ч гексафторпропен (примерно 500-600 мл). Реакционную смесь выливали в 300 мл воды, подкисляли 5%-ной соляной кислотой, оставляли на 0.5 ч для укрупнения мелкодисперсного выпавшего осадка, затем отфильтровывали, промывали 100 мл воды и сушили на воздухе (24 ч). Вещество очищали хроматографией на колонке с силикагелем (элюент – CH₂Cl₂).

(2R)-4,10-диацетил-11-(1,1,2,3,3,3-гексафторпропокси)-5,13-дигидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-130. Светло-жёлтый аморфный порошок.

Выход 52%. т.пл. 96-98 °С. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.78 (3H, с, Н-15), 2.12 (3H, с, Н-10), 2.54 (3H, с, Н-14), 2.64 (3H, с, Н-12), 5.10 (1H, д.м, Н-17), 5.95 (1H, с, Н-4), 11.1 (1H, с, ОН-9), 18.8 (1H, с, ОН-3). ЯМР ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.5 (C-10), 27.7 (C-12), 31.6 и 31.7 (C-14 и C-15), 58.9 (C-9b), 83.0-86.1 (C-17), 98.4 (C-4), 99.4 (C-18), 105.0 (C-2), 111.0 (C-9a), 113.2 (C-8), 116-118 (C-16), 117.9 и 121.8 (C-16), 119.2 (C-6), 144.9 (C-7), 152.3 (C-5a), 154.5 (C-9), 178.9 (C-4a), 191.5 (C-3), 194.7 (C-13), 197.4 (C-1), 201.7 (C-11). Найдено, %: F, 22.30; 22.23. Вычислено, %: F, 23.08. Найдено: m/z 494.06810. $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{F}_6\text{O}_7$. Вычислено: $M = 494.08001$.



(11R)-13-ацетил-4,4,5-трифтор-9,14-дигидрокси-8,11-диметил-3-метилен-5-(трифторметил)-6,17-диоксатетрацикло[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,16}]гептадека-1,7,9,13,15-пентаен-12-он (+)-131. Светло-жёлтый аморфный порошок.



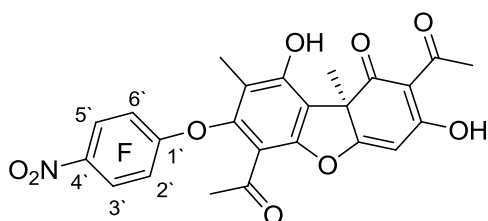
Выход 22%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.76 (3H, с, Н-15), 2.16 (3H, с, Н-10), 2.64 (3H, с, Н-12), 5.99 (1H, с, Н-4), 5.99, 6.45 и 6.50 (2H, м, Н-14), 10.7 (1H, с, ОН-9), 18.8 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.0 (C-10), 27.7 (C-12), 31.7 (C-15), 58.8 (C-9b), 85.0-87.0 (C-17), 98.5 (C-4), 105.1 (C-2), 109.1 (C-9a), 111.2 (C-8), 116-118 (C-16), 119.3 (C-14), 120.0 (C-18), 126.1 (C-6), 147.8 (C-7), 151.2 (C-13), 152.5 (C-5), 152.8 (C-9), 179.2 (C-4a), 191.5 (C-3), 197.6 (C-1), 201.7 (C-11). Найдено: m/z 476.0687. $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{F}_6\text{O}_6$. Вычислено: $M = 476.0689$.

Синтез соединений 132-135.

К раствору 1 mM УК в 10 мл сухого ДМФА добавляли 0.2 г K_2CO_3 и перемешивали смесь при температуре 40-45 °С. Через 10-15 мин добавляли 1 mM полифторароматического соединения, смесь перемешивали ещё 5-7 ч. Охлаждённую реакционную смесь выливали в воду (300 мл), подкисляли 5% HCl , и оставляли на 0.5 ч для укрупнения осадка. Осадок отфильтровывали, промывали 100 мл воды и сушили на воздухе (24 ч). Вещество очищали хроматографией на колонке с силикагелем (элюент – хлороформ).

(2R)-4,10-диацетил-5,13-дигидрокси-2,12-диметил-11-(2,3,5,6-тетрафтор-4-нитрофенокси)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),4,6,10,12-пентаен-3-он (+)-132.

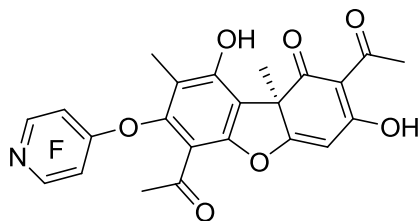
Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 84%, т.пл. 69-73 °С. ИК-спектр (KBr , ν , cm^{-1}): 3098, 1685, 1553, 1350, 1185. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 18.89 с (C3-ОН), 11.29 с (C9-ОН), 6.04 м (Н-4), 2.70 с (Н-12), 2.60 с (Н-14), 2.15 с (Н-10), 1.85 с

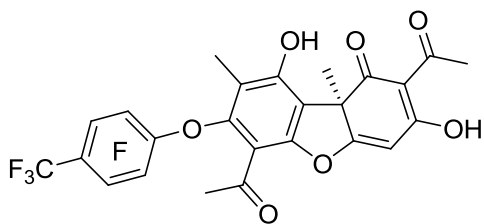
(H-15). Спектр ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , δ , м.д., J (Гц): 4.77 м ($\text{F}2'$, $\text{F}6'$), 15.11 м ($\text{F}3'$, $\text{F}5'$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д., J (Гц)): 201.8 (C-11), 197.4 (C-13), 193.5 (C-1), 191.5 (C-3), 178.4 (C-4a), 155.3 (C-9), 153.8 (C-5a), 153.2 (C-7), 141.23 (C-3', C-5', $J_{\text{C-F}}=211$), 138.7 м ($\text{C}2'$, $\text{C}6'$, $J_{\text{C-F}}=218$), 140.5 (C-4'), 116.4 (C-8), 110.4 (C-2), 109.7 (C-6), 105.2 (C-9a), 98.7 (C-4), 58.7 (C-9b), 32.1 (C-14), 31.7 (C-15), 27.6 (C12), 8.4 (C-10). Найдено: m/z 537.0686 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{24}\text{H}_{15}\text{F}_4\text{N}_1\text{O}_9$. Вычислено: M 537.0677.

(2R)-4,10-диацетил-5,13-дигидрокси-2,12-диметил-11-[(2,3,5,6-тетрафторпиридин-4-ил)окси]-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),4,6,10,12-пентаен-3-он (+)-133. Светло-жёлтый аморфный порошок.



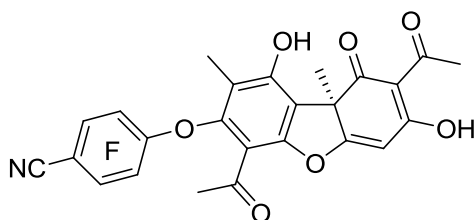
Выход 55 %. ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 3087, 1686, 1614, 1543, 1475, 1375, 1184. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ м.д.): 18.85 с ($\text{C}3\text{-OH}$), 11.20 с ($\text{C}9\text{-OH}$), 5.99 м ($\text{H}4$), 2.66 с ($\text{H}12$), 2.55 с ($\text{H}14$), 2.10 с ($\text{H}10$), 1.81 с ($\text{H}15$). Спектр ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , δ , м.д., J (Гц): 1.54 м ($\text{F}2'$, $\text{F}6'$), 71.48 м ($\text{F}3'$, $\text{F}5'$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д., J (Гц)): 201.8 (C-11), 197.5 (C-13), 193.7 (C-1), 191.6 (C-3), 178.6 (C-4a), 155 (C-9), 153.7 (C-5a), 153.5 (C-7), 144.9 (C-3', C-5', $J_{\text{C-F}}=224$), 133.6 м. ($\text{C}2'$, $\text{C}6'$, $J_{\text{C-F}}=220$), 116.5 (C-8), 110.5 (C-2), 109.7 (C-6), 105.1 (C-9a), 98.7 (C-4), 58.7 (C-9b), 32.2 (C-14), 31.9 (C-15), 27.8 (C-12), 8.5 (C-10). Found: m/z 493.0785 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{F}_4\text{N}_1\text{O}_7$. Calcd: M = 493.07797.

(2R)-4,10-диацетил-5,13-дигидрокси-2,12-диметил-11-[2,3,5,6-тетрафтор-4-(трифторметил)фенокси]-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(9),4,6,10,12-пентаен-3-он (+)-134. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 35%. Спектр ИК (ν , cm^{-1}) 3097, 1684, 1610, 1507, 1342, 1228, 1185. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 18.89 с ($\text{C}^3\text{-OH}$), 11.23 с ($\text{C}^9\text{-OH}$), 6.03 м (H^4), 2.70 с (H^{12}), 2.59 с (H^{14}), 2.14 с (H^{10}), 1.85 с (H^{15}). Спектр ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , δ , м.д.): 3.95 м ($\text{F}2'$, $\text{F}6'$), 20.20 м ($\text{F}3'$, $\text{F}5'$), 106,05 м (C^7). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д., J (Гц)): 201.9 (C^{11}), 197.5 (C^{13}), 193.6 (C^1), 191.6 (C^3), 178.6 (C^{4a}), 155.2 (C^9), 153.7 (C^{5a}), 153.5 (C^7), 144.7 м (C^3' , C^5' , $J_{\text{C-F}}=255$), 133.4 м (C^2 , C^6 , $J_{\text{C-F}}=259$), 123.1 (C^7 , $^1J_{\text{C-F}}=181$), 116.4 (C^8), 110.2 (C^2), 110.1 (C^6), 105.2 (C^{9a}), 98.7 (C^4), 58.7 (C^{9b}), 32.3 (C^{14}), 31.9 (C^{15}), 27.8 (C^{12}), 8.6 (C^{10}). Найдено: m/z 560.0709 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{25}\text{H}_{15}\text{F}_7\text{O}_7$. Вычислено: M = 560.0701

4-[[1(R)-6,12-диацетил-3,11-дигидрокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-2(7),3,5,9,11-пентаен-5-ил]окси]-2,3,5,6-тетрафторбензонитрил (+)-135. Светло-жёлтый аморфный порошок.

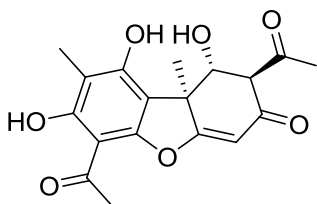


Выход 98%. т.пл. 148–152 °С ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 3101, 2241, 1683, 1186. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ м.д.): 18.85 с (C3-OH), 11.24 с (C9-OH), 5.99 м (H-4), 2.64 с (H-12), 2.55 с (H-14), 2.09 с (H-10), 1.80 с (H-15). Спектр ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , δ , м.д.): 5.14 м (F-2', F-6'), 28.18 м (F-3', F-5'). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д., J (Гц)): 201.9 (C-11), 197.4 (C-13), 193.7 (C-1), 191.6 (C-3), 178.4 (C-4a), 155.3 (C-9), 153.9 (C-5a), 153.2 (C-7), 147.8 (C-3', C-5', $J_{\text{C-F}}=260$), 138.49 (C-2', C-6', $J_{\text{C-F}}=247$), 142.02 м (C-7'), 116.4 (C-8), 110.2 (C-2), 109.6 (C-6), 105.2 (C-9a), 98.7 (C-4), 58.7 (C-9b), 32.3 (C-14), 31.8 (C-15), 27.8 (C-12), 8.5 (C-10). Найдено: m/z 517.219 [M]⁺. $\text{C}_{25}\text{H}_{15}\text{F}_4\text{N}_1\text{O}_7$. Вычислено: $M = 517.387$.

Синтез соединений 136 и 137a,b

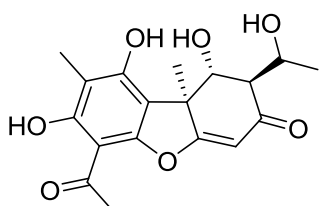
К раствору УК (1 ммоль) в 20 мл ТГФ, охлаждённому до -38 °С прибавляют взвеси 50 мг боргидрида натрия в 5 мл ТГФ и оставляют при перемешивании при указанной температуре на 2 часа. В реакционную смесь добавляют разбавленную соляную кислоту до рН ~5, доводят до комнатной температуры, добавляют хлористый метилен (30 мл), промывают водой 2 раза, сушат над прокалённым MgSO_4 , удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – хлороформ. При хроматографии отделяется исходная УК (30%) и смесь соединений 136 и 137a,b в соотношении 4:5 по данным ЯМР ^1H с общим выходом 57%. Соединения 136 и 137a,b в индивидуальном виде были выделены повторной хроматографией смеси на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – хлористый метилен.

(2S,3R,4S)-4,10-диацетил-3,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),6,9,11-тетраен-5-он (+)-136. Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 12%. т.пл. 97 °С. ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 1043, 1158, 1290, 1625, 1718, 3211, 3411. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.53 (3H, с, H-15), 2.04 (3H, с, H-10), 2.55 (3H, с, H-12), 2.65 (3H, с, H-14), 3.76 (1H, д, J 10.5, H-2), 4.70 (1H, д, J 10.5, H-1), 4.97 (1H, с, OH-1), 5.79 (1H, с, H-4), 9.23 (1H, с, OH-9), 13.29 (1H, с, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.68 (C-10), 22.30 (C-15), 33.48 и 34.85 (C-12 и C-14), 51.37 (C-9b), 65.51 (C-1), 74.37 (C-2), 103.65 (C-6), 105.96 (C-4), 110.12 (C-8), 110.76 (C-9a), 157.53 (C-5a), 158.92 (C-9), 165.73 (C-7), 184.15 (C-4a), 192.83 (C-3), 202.91 (C-13), 208.83 (C-11). Найдено: m/z 346.1050 [M]⁺ $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$. Вычислено: $M = 346.1047$

(2S,3R,4R)-10-ацетил-3,11,13-тригидрокси-4-(1-гидроксиэтил)-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-1(13),6,9,11-тетраен-5-он (+)-137a,b (соотношение **137a:137b** ~ 10:1 по ЯМР ¹H). Светло-жёлтый аморфный порошок.



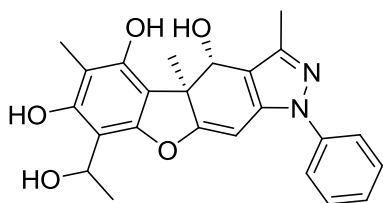
Выход 12%. т.пл. 92 °С. ИК-спектр (КВг, ν , см⁻¹): 1046, 1157, 1289, 1625, 3204, 3400. Спектр ЯМР ¹H соединения **137a** (CDCl₃, δ м.д.) 1.23 (3H, д, J 6, H-12), 1.54 (3H, с, H-15), 2.07 (3H, с, H-10), 2.67 (3H, с, H-14), 3.05 (1H, д.д, J 4.5 и 10.5, H-2), 4.56 (1H, д, J 10.5, H-1), 4.98 (1H, д.кв, J 4.5 и 6, H-11), 5.75 (1H, с, H-4), 5.92 (1H, с, OH-1), 9.48 (1H, с, OH-9), 13.31 (1H, с, OH-7). В спектре ЯМР ¹H для соединения **137b** удалось выделить следующие сигналы: 1.26 (3H, д, J 6, H-12), 1.53 (3H, с, H-15), 2.06 (3H, с, H-10), 2.68 (3H, с, H-14), 4.83 (1H, м), 5.85 (1H, с, H-4).

Спектр ЯМР ¹³C соединения **137a** (CDCl₃, δ , м.д.) 7.02 (C-10), 18.57 и 19.70 (C-12 и C-15), 30.79 (C-14), 48.75 (C-9b), 51.85 (C-2), 69.30 (C-11), 71.74 (C-1), 100.93 (C-6), 103.48 (C-4), 108.04 и 108.14 (C-8 и C-9a), 154.96 (C-5a), 156.51 (C-9), 162.85 (C-7), 181.99 (C-4a), 194.84 (C-3), 200.33 (C-13). Найдено: m/z 348.1210 [M]⁺ C₁₈H₂₀O₇. Вычислено: M = 348.1204

Синтез соединения **138a,b**

К раствору соединения **125** (1 ммоль) в 20 мл ТГФ прибавляют взвесь 50 мг боргидрида натрия в 5 мл ТГФ, нагревают до 50 °С и оставляют при перемешивании на 2 часа. Реакционную смесь доводят до комнатной температуры, добавляют разбавленную соляную кислоту до pH ~5, добавляют хлористый метилен (30 мл), промывают водой 2 раза, сушат над прокалённым MgSO₄, удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – хлороформ.

(1S,16R)-6-(1-гидроксиэтил)-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}, 7, 0^{11, 15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-3,5,16-триол (+)-138a,b (соотношение **138a:138b** ~ 3:2 по данным ЯМР ¹H). Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 71%. т.пл. 233 °С. ИК-спектр (КВг, ν , см⁻¹): 1041, 1067, 1174, 1440, 1504, 1627, 3271. Спектр ЯМР ¹H соединения **138a** (CDCl₃, δ , м.д.) 1.33 (3H, с, H-15), 1.47 (3H, д, J 6, H-14), 2.04 (3H, с, H-10), 2.27 (3H, с, H-12), 4.00 (1H, ш.с, OH-13), 4.50 (1H, д, J 7, OH-1), 5.20 (1H, кв, J 6, H-13), 5.28 (1H, д, J 7, H-1), 5.73 (1H, с, H-4), 7.28-7.38 (5H, м, H-аром), 8.24 и 8.67 (1H и 1H, с и с, OH-7 и OH-9). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.) 7.62 (C-10), 12.43 (C-12), 16.36 (C-15), 23.26 (C-14), 51.96 (C-9b), 65.78 (C-13), 74.85 (C-1), 88.07 (C-4), 104.39 (C-8), 107.00 (C-9a), 107.24 (C-6), 111.68 (C-2), 123.23, 127.35, 129.18 и 138.57 (2C,

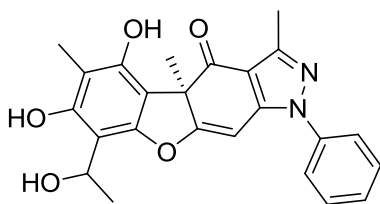
C, 2C и C – все аром), 138.45 (C-3), 146.59 и 146.74 (C-7 и C-11), 150.14 (C-7), 152.05 (C-5a), 155.10 (C-9), 168.68 (C-4a). Найдено: осколочный ион ($-\text{H}_2\text{O}$) m/z 402.1570 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_2$.

Спектр ЯМР ^1H соединения **138b** (CDCl_3 , δ м.д.) 1.34 (3H, с, H-15), и 1.50 (3H, д, J 6, H-14), 2.04 (3H, с, H-10), 2.32 (3H, с, H-12), 3.77 (1H, ш.с, OH-13), 4.54 (1H, д, J 7, OH-1), 5.24 (1H, кв, J 6, H-13), 5.30 (1H, д, J 7, H-1), 5.76 (1H, с, H-4), 7.28-7.38 (5H, м, H-аром), 8.30 и 8.64 (1H и 1H, с и с, OH-7 и OH-9). В спектре ЯМР ^{13}C для соединения **138b** удалось выделить следующие сигналы: 12.51 (C-12), 16.43 (C-15), 51.86 (C-9b), 66.06 (C-13), 88.00 (C-4), 107.36 (C-6), 111.62 (C-2), 150.24 (C-7), 152.12 (C-5a).

Синтез соединения **139a,b**.

К суспензии 60 мг боргидрида натрия в 3 мл ТГФ при 0 °С при перемешивании добавляют по каплям раствор 130 мг йода в 3 мл ТГФ. Полученный охлажденный раствор добавляют к смеси 11 мг L-пролина и 3 мл толуола. Перемешивают при комнатной температуре 10 минут, затем нагревают до 100 °С. Добавляют раствор 200 мг соединения **35** в 5 мл толуола, перемешивают при 110 °С 20 минут. Охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 мл диэтилового эфира, добавляют 20 мл 10%-ного раствора NaHCO_3 , органический слой отделяют, промывают водой 2 раза, сушат над прокаленным MgSO_4 , удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – хлороформ.

(1R)-3,5-дигидрокси-6-(1-гидроксиэтил)-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-139a,b
(соотношение **139a:139b** ~ 7:3 по данным ЯМР ^1H). Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 22%. Спектр ЯМР ^1H соединений **139a,b** (CDCl_3 , δ м.д., J/Гц) 1.50 и 1.56 (3H, 2 д, J=6.5, H-14), 1.77 и 1.76 (3H, 2 с, H-15), 2.12 и 2.11 (3H, 2 с, H-10), 2.57 (3H, с, H-12), 2.69 и 2.75 (1H, 2ш.с, OH-13), 5.16 и 5.30 (1H, 2 кв, J=6.5, H-13), 5.34 (1H, 2 кв, J=6.5, H-13), 6.12 и 6.09 (1H, 2 с, H-4), 7.40-7.60 (5H, м, H-аром), 8.40 (1H, с, OH-9), 10.17 и 10.10 (1H, 2 с, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ м.д.): 7.9 и 7.7 (C-10), 13.2 (C-12), 21.8 и 21.6 (C-14), 30.3 и 30.5 (C-15), 61.0 и 61.2 (C-9b), 66.1 (C-13), 88.0 (C-4), 101.3 (C-6), 103.6 и 103.9 (C-2), 108.8 и 108.5 (C-8), 110.6 (C-9a), 123.8, 128.4, 129.5 и 137.9 (2C, C, 2C и C – все аром), 148.7 и 148.5 (C-11), 151.2 (C-3), 152.4 и 151.6 (C-7), 153.0 (C-5a), 155.4 (C-9), 174.3 и 174.5 (C-4a), 196.4 (C-1). Найдено: осколочный ион ($-\text{H}_2\text{O}$) m/z 400.1407 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}_2$.

Синтез соединений **140 -145**

К раствору соединения **125** (1 ммоль) в 20 мл ТГФ прибавляют взвесь 50 мг боргидрида натрия в 5 мл ТГФ, нагревают до 50 °С и оставляют при перемешивании на 2 часа.

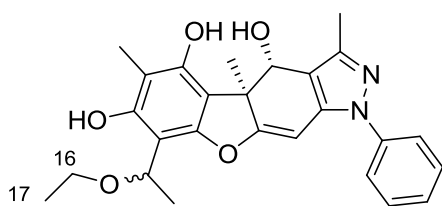
Реакционную смесь доводят до комнатной температуры, добавляют 1 мл соответствующего спирта, добавляют разбавленную соляную кислоту до pH ~5, добавляют хлористый метилен (30 мл), промывают водой 2 раза, сушат над прокаленным MgSO₄, удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент – хлороформ.

(1S,16R)-6-(1-метоксиэтил)-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексан-3,5,16-триол (+)-140a,b (соотношение **140a:140b** ~ 1:1 по данным ЯМР ¹H). Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 85%. Спектр ЯМР ¹H соединений **140a,b** (CDCl₃, δ м.д., J/Гц) 1.38 и 1.39 (3H, с, H-15), 1.46 и 1.48 (3H, д, J=6.5, H-14), 2.07 (3H, с, H-10), 2.37 (3H, с, H-12), 3.40 и 3.45 (3H, с, H-16), 4.57 (1H, ш.с, OH-1), 4.72 и 4.73 (1H, кв, J=6.5, H-13), 5.37 (1H, ш.с, H-1), 5.79 (1H, с, H-4), 7.27-7.43 (5H, м, H-аром), 8.23 и 8.24 (1H, с, OH-9), 8.27 и 8.31 (1H, с, OH-7). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.6 (C-10), 12.6 (C-12), 16.4 (C-15), 21.5 и 21.6 (C-14), 51.9 (C-9b), 57.3 (C-16), 73.0 и 73.1 (C-13), 74.9 (C-1), 88.1 (C-4), 102.3 (C-8), 106.8 (C-9a), 107.3 (C-6), 111.7 (C-2), 123.4, 127.3, 129.3 и 138.4 (2C, C, 2C и C – все аром), 138.75 (C-3), 146.74 (C-11), 150.14 (C-7), 153.0 и 153.1 (C-5a), 154.9 (C-9), 168.7 (C-4a). Найдено: осколочный ион (-MeOH) *m/z* 402.1570 [M]⁺ C₂₄H₂₂O₄N₂.

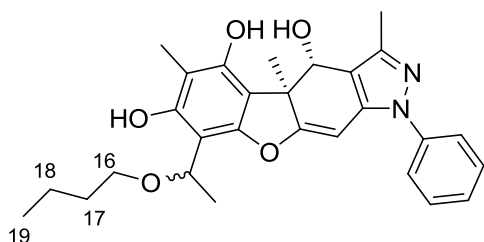
(1S,16R)-6-(1-этоксиэтил)-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексан-3,5,16-триол (+)-141a,b (соотношение **141a:141b** ~ 1:1 по данным ЯМР ¹H). Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 77%. Спектр ЯМР ¹H соединений **141a,b** (CDCl₃, δ м.д., J/Гц) 1.23 (3H, т, J=7, H-17), 1.34 (3H, с, H-15), 1.47 (3H, д, J=6.5, H-14), 2.07 (3H, с, H-10), 2.37 (3H, с, H-12), 3.56 (2H, кв, J=7, H-16), 4.64 (1H, ш.с, OH-1), 4.82 и 4.83 (1H, кв, J=6.5, H-13), 5.31 и 5.34 (1H, ш.с, H-1), 5.79 (1H, с, H-4), 7.26-7.47 (5H, м, H-аром), 8.14 и 8.18 (1H, с, OH-7), 8.48 (1H, с, OH-9). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.6 (C-10), 12.6 (C-12), 15.0 (C-17), 16.5 (C-15), 21.5 и 21.7 (C-14), 51.9 и 52.1 (C-9b), 65.0 (C-16), 73.0 и 73.2 (C-13), 74.8 и 74.9 (C-1), 88.0 и 88.1 (C-4), 102.3 (C-6), 106.8 (C-2), 107.4 (C-8), 111.8 (C-9a), 123.4, 127.3, 129.2 и 138.4 (2C, C, 2C и C – все аром), 138.5 (C-3), 146.6 (C-11), 150.5 (C-7), 153.0 и 153.1 (C-5a), 154.9 (C-9), 168.8 (C-4a). Найдено: осколочный ион (-EtOH) *m/z* 402.1571 [M]⁺ C₂₄H₂₂O₄N₂.

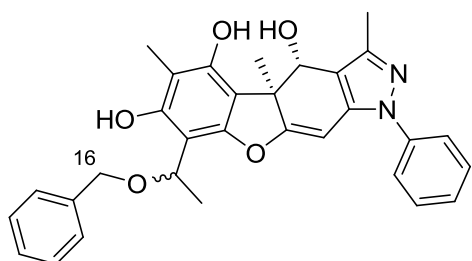
(1S,16R)-6-(1-бутоксиэтил)-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексан-3,5,16-триол (+)-142a,b

(соотношение **142a:142b** ~ 1:1 по данным ЯМР ^1H). Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



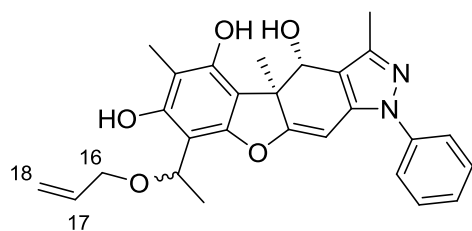
Выход 68%. Спектр ЯМР ^1H соединений **142a,b** (CDCl_3 , δ м.д., J/Гц) 0.92 (3H, 2кв, $J=6.5$, H-19), 1.38 (2H, м, H-18), 1.40 (3H, 2 с, H-15), 1.49 (3H, 2 д, $J=6.5$, H-14), 1.60 (2H, м, H-17), 2.09 (3H, с, H-10), 2.38 (3H, 2 с, H-12), 3.51 (2H, м, H-16), 4.22 и 4.29 (1H, ш.с, OH-1), 4.83 (1H, 2 кв, J 6.5, H-13), 5.40 (1H, ш.с, H-1), 5.81 (1H, 2 с, H-4), 7.28-7.50 (5H, м, H-аром), 8.19 и 8.23 (1H, с, OH-7), 8.50 (1H, 2 с, OH-9). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.6 (C-10), 12.7 (C-12), 13.7 (C-19), 16.4 (C-15), 19.1 (C-18), 21.4 и 21.5 (C-14), 31.6 (C-17), 52.0 (C-9b), 69.5 (C-16), 73.4 (C-13), 75.1 (C-1), 88.2 (C-4), 102.3 (C-6), 106.8 (C-2), 107.3 (C-8), 111.6 (C-9a), 123.3, 127.2, 129.1 и 138.4 (2C, C, 2C и C – все аром), 138.8 (C-3), 146.5 (C-11), 150.4 (C-7), 153.0 (C-5a), 154.9 (C-9), 168.6 (C-4a). Найдено: осколочный ион ($-\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$) m/z 402.1571 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_2$.

(1S,16R)-6-(1-бензилоксиэтил)-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексан-3,5,16-триол (+)-143a,b (соотношение **143a:143b** ~ 1:1 по данным ЯМР ^1H). Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 59%. Спектр ЯМР ^1H соединений **143a,b** (CDCl_3 , δ м.д., J/Гц) 1.39 и 1.42 (3H, с, H-15), 1.54 и 1.55 (3H, д, $J=6.5$, H-14), 2.13 (3H, с, H-10), 2.36 и 2.37 (3H, 2 с, H-12), 4.07 (1H, д, $J=7$, OH-1), 4.47 и 4.62 (1H и 1H, 2 д, $J=10.5$, H-16), 4.97 (1H, кв, $J=6.5$, H-13), 5.35 (1H, ш.с, H-1), 5.78 (1H, с, H-4), 7.28-7.38 и 7.39-7.50 (10H, 2 м, H-аром), 8.05 и 8.09 (1H, 2 с, OH-9), 8.32 и 8.54 (1H, 2 с, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.7 (C-10), 12.5 (C-12), 16.5 и 16.6 (C-15), 21.5 и 21.6 (C-14), 52.0 и 52.1 (C-9b), 65.0 (C-16), 72.6 и 72.8 (C-13), 74.7 (C-1), 88.1 и 88.2 (C-4), 101.8 и 101.9 (C-6), 107.0 (C-2), 107.7 (C-8), 111.9 (C-9a), 123.3, 126.9, 127.3, 128.3, 129.2, 129.9, 136.8 и 138.6 (12C – все аром), 138.5 (C-3), 146.9 (C-11), 150.6 (C-7), 153.3 (C-5a), 154.9 (C-9), 168.9 (C-4a). Найдено: осколочный ион ($-\text{C}_7\text{H}_9\text{OH}$) m/z 402.1570 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_2$.

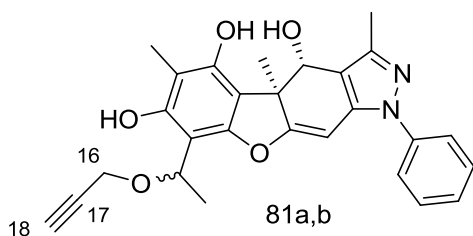
(1S,16R)-1,4,14-триметил-12-фенил-6-[1-(проп-2-ен-1-илокси)этил]-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексан-3,5,16-триол (+)-144a,b (соотношение **144a:144b** ~ 1:1 по данным ЯМР ^1H). Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 46%. Спектр ЯМР ^1H соединений **144a,b** (CDCl_3 , δ м.д., J/Гц) 1.36 (3H, с, H-15), 1.49 (3H, 2 д, $J=6.5$, H-14), 2.06 (3H, с, H-10), 2.34 (3H, с, H-12), 4.06

(1H, м, H-16^a), 4.43 (1H, м, H-16^b), 4.43 (1H, ш.с, OH-1), 4.89 (1H, кв, J=6.5, H-13), 5.23 (1H, м, H-18^a), 5.27 (1H, ш.с, H-1), 5.34(1H, м, H-18^b), 5.77 (1H, с, H-4), 5.89 (1H, м, H-17), 7.25-7.50 (5H, м, H-аром), 8.20 и 8.24 (1H, 2 с, OH-7), 8.28 (1H, с, OH-9). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.6 (C-10), 12.7 (C-12), 16.4 (C-15), 21.5 (C-14), 52.0 (C-9b), 70.1 (C-16), 72.6 (C-13), 75.0 (C-1), 88.1 (C-4), 101.9 (C-6), 106.9 (C-2), 107.4 (C-8), 111.6 (C-9a), 117.9 (C-18), 123.3, 127.3, 129.3 и 138.4 (2C, C, 2C и C – все аром), 133.4 (C-17), 138.8 (C-3), 146.5 (C-11), 150.6 (C-7), 153.2 (C-5a), 154.9 (C-9), 168.6 (C-4a). Найдено: осколочный ион (-C₃H₅OH) *m/z* 402.1570 [M]⁺ C₂₄H₂₂O₄N₂.

(1S,16R)-1,4,14-триметил-12-фенил-6-[1-(проп-2-ин-1-илокси)этил]-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексан-3,5,16-триол (+)-145a,b (соотношение **145a:145b** ~ 1:1 по данным ЯМР ¹H). Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.

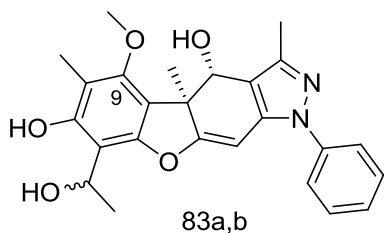


Выход 45%. Спектр ЯМР ¹H соединений **145a,b** (CDCl₃, δ м.д., J/Гц) 1.36 (3H, с, H-15), 1.50 и 1.53 (3H, д, J=6.5, H-14), 2.06 (3H, с, H-10), 2.34 (3H, с, H-12), 2.44 и 2.47 (H и H, 2 д, J=3, H-18), 4.18 (1H, ш.с, OH-1), 4.10 (1H, м, H-16^a), 4.24 (1H, м, H-16^b), 5.07 (1H, кв, J=6.5, H-13), 5.40 (1H, ш.с, H-1), 5.82 (1H, с, H-4), 7.29-7.50 (5H, м, H-аром), 7.78 (1H, с, OH-9), 8.21 (1H, с, OH-7). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.6 (C-10), 12.7 (C-12), 16.4 (C-15), 21.2 и 21.3 (C-14), 52.0 (C-9b), 56.3 (C-16), 72.2 и 72.4 (C-13), 75.1 (C-1), 75.1 (C-18), 78.5 (с-17), 88.3 (C-4), 101.1 (C-6), 107.1 (C-2), 107.6 (C-8), 111.5 (C-9a), 123.4, 127.3, 129.1 и 138.4 (2C, C, 2C и C – все аром), 138.7 (C-3), 146.5 (C-11), 150.9 (C-7), 153.5 (C-5a), 154.7 (C-9), 168.5 (C-4a). Найдено: осколочный ион (-C₃H₅OH) *m/z* 402.1570 [M]⁺ C₂₄H₂₂O₄N₂.

Синтез соединения 146

К раствору соединения **126** (1 ммоль) в 20 мл ТГФ прибавляют взвеси 50 мг боргидрида натрия в 5 мл ТГФ и оставляют при перемешивании при на 2 часа. В реакционную смесь добавляют разбавленную соляную кислоту до pH ~5, доводят до комнатной температуры, добавляют хлористый метилен (30 мл), промывают водой 2 раза, сушат над прокалённым MgSO₄, удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент – хлороформ.

(1S,16R)-6-(1-гидроксиэтил)-3-метокси-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексан-5,16-диол (+)-146a,b (соотношение **146a:146b** ~ 1:1 по данным ЯМР ¹H). Светло-жёлтый аморфный порошок.

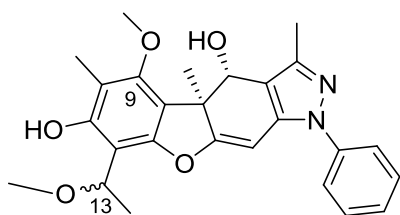


Выход 95%. Спектр ЯМР ^1H соединений **146a,b** (CDCl_3 , δ м.д., J/Гц) 1.42 и 1.45 (3H, 2 с, H-15), 1.47 и 1.48 (3H, 2 д, J=6.5, H-14), 2.12 и 2.13 (3H, 2 с, H-10), 2.36 и 2.44 (3H, 2 с, H-12), 3.86 (3H, с, 9-OMe), 4.14 (1H, ш.с, OH-1), 4.50 и 5.00 (1H, 2 ш.с, 13-OH), 5.16 и 5.30 (1H, 2 кв, J=6.5, H-13), 5.28 и 5.39 (1H, 2 ш.с, H-1), 5.79 и 5.82 (1H, 2 с, H-4), 7.28-7.50 (5H, м, H-аром), 9.10 и 9.18 (1H, 2 с, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.1 и 9.2 (C-10), 12.5 и 12.6 (C-12), 18.3 и 18.4 (C-15), 23.0 и 23.1 (C-14), 53.0 (C-9b), 61.5 (OMe), 65.4 и 66.1 (C-13), 74.5 (C-1), 88.6 (C-4), 108.8 и 109.0 (C-6), 112.1 и 112.2; 112.3 и 112.4 (C-8 и C-9a), 114.3 и 114.5 (C-2), 123.0, 126.9, 129.1 и 139.0 (2C, C, 2C и C – все аром), 138.0 (C-3), 147.7 и 147.9 (C-11), 152.3 и 152.5 (C-7), 153.2 и 153.3 (C-5a), 155.8 (C-9), 168.5 и 168.7 (C-4a). Найдено: осколочный ион ($-\text{H}_2\text{O}$) m/z 416.1725 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2$.

Синтез соединений 147 -149

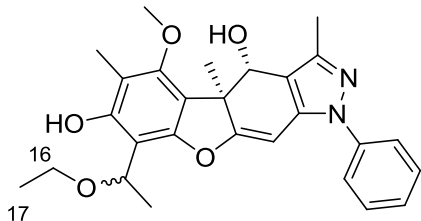
К раствору соединения **126** (1 ммоль) в 20 мл ТГФ прибавляют взвесь 50 мг боргидрида натрия в 5 мл ТГФ, нагревают до 50 °С и оставляют при перемешивании на 2 часа. Реакционную смесь доводят до комнатной температуры, добавляют 1 мл соответствующего спирта, после чего кипятят с обратным холодильником 15 часов. Охлаждают, добавляют разбавленную соляную кислоту до pH ~5, добавляют хлористый метилен (30 мл), промывают водой 2 раза, сушат над прокаленным MgSO_4 , удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – хлороформ.

(1S,16R)-3-метокси-6-(1-метоксиэтил)-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-5,16-диол (+)-147a,b (соотношение **147a:147b** ~ 1:1 по данным ЯМР ^1H). Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



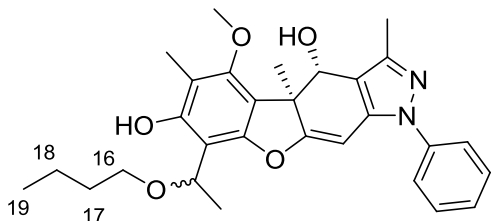
Выход 37%. Спектр ЯМР ^1H соединений **147a,b** (CDCl_3 , δ м.д., J/Гц) 1.49 (3H, 2 с, H-15), 1.49 и 1.51 (3H, 2 д, J=6.5, H-14), 2.14 (3H, 2 с, H-10), 2.52 (3H, 2 с, H-12), 3.40 и 3.45 (3H, 2 с, 13-OMe), 3.89 и 3.90 (3H, 2 с, 9-OMe), 4.03 (1H, д, J=4.5, OH-1), 4.78 и 4.87 (1H, 2 кв, J=6.5, H-13), 5.40 (1H, д, J=4.5, H-1), 5.83 (1H, с, H-4), 7.32-7.57 (5H, м, H-аром), 8.39 и 8.49 (1H, 2 с, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.1 и 9.2 (C-10), 12.1 и 12.9 (C-12), 18.5 и 18.7 (C-15), 20.8 и 21.0 (C-14), 53.1 и 53.2 (C-9b), 61.5 и 61.6 (9-OMe), 74.1 (C-1), 75.1 и 75.3 (C-13), 88.1 и 88.2 (C-4), 106.4 и 106.6 (C-6), 112.3, 112.4, 112.5 и 112.6 (C-8 и C-9a), 114.5 (C-2), 123.4, 127.7, 129.3 и 137.5 (2C, C, 2C и C – все аром), 138.2 (C-3), 147.1 (C-11), 153.4, 153.5, 153.6 и 153.7 (C-7 и C-5a), 155.3 (C-9), 170.0 (C-4a). Найдено: осколочный ион ($-\text{MeOH}$) m/z 416.1725 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2$.

(1S,16R)-3-метокси-6-(1-этоксипропил)-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-5,16-диол (+)-148a,b (соотношение **148a:148b** ~ 1:1 по данным ЯМР ¹H). Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 13%. Спектр ЯМР ¹H соединений **148a,b** (CDCl₃, δ м.д., J/Гц) 1.23 (3H, т, Н-17), 1.45, 1.47, 1.48 и 1.50 (3H и 3H, м, Н-14 и Н-15), 2.12 и 2.13 (3H, 2 с, Н-10), 2.45 (3H, с, Н-12), 3.57 (2H, кв, Н-16), 3.87 (3H, с, 9-ОМе), 4.11 (1H, д, J=5, ОН-1), 4.87 (1H, 2 кв, J=6.5, Н-13), 5.40 (1H, д, J=5, Н-1), 5.85 (1H, 2 с, Н-4), 7.26-7.57 (5H, м, Н-аром), 8.68 и 8.69 (1H, 2 с, ОН-7). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 8.7 и 8.8 (C-10), 12.4 (C-12), 14.7 (C-17), 18.0 и 18.1 (C-15), 20.0 и 21.0 (C-14), 52.7 и 52.8 (C-9b), 61.1 и 61.2 (ОМе), 65.0 (C-16), 72.8 и 73.1 (C-13), 74.3 (C-1), 88.5 и 88.6 (C-4), 106.5 и 106.7 (C-6), 111.8, 111.9 и 112.0 (C-8 и C-9a), 114.5 (C-2), 122.6, 126.4, 128.7 и 138.9 (2C, C, 2C и C – все аром), 136.7 (C-3), 147.4 (C-11), 153.1, 153.2 и 153.3 (C-7 и C-5a), 155.0 (C-9), 168.1 (C-4a). Найдено: осколочный ион (-EtOH) *m/z* 416.1725 [M]⁺ C₂₅H₂₄O₄N₂.

(1S,16R)-3-метокси-6-(1-бутоксипропил)-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-диазатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2,4,6,9,11(15),13-гексаен-5,16-диол (+)-149a,b (соотношение **149a:149b** ~ 1:1 по данным ЯМР ¹H). Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 20%. Спектр ЯМР ¹H соединений **149a,b** (CDCl₃, δ м.д., J/Гц) 0.92 (3H, 2кв, J=7, Н-19), 1.39 (2H, м, Н-18), 1.50 (3H, 2 с, Н-15), 1.47 и 1.51 (3H, 2 д, J=6.5, Н-14), 1.61 (2H, м, Н-17), 2.14 и 2.15 (3H, 2 с, Н-10), 2.47 (3H, 2 с, Н-12), 3.51 и 3.55 (2H, т и м, J=6.5, Н-16), 3.89 и 3.90 (3H, с, 9-ОМе), 4.13 и 4.15 (1H, ш.с, ОН-1), 4.87 (1H, 2 кв, J=6.5, Н-13), 5.4 (1H, д, J=5, Н-1), 5.88 (1H, с, Н-4), 7.28-7.59 (5H, м, Н-аром), 8.71 и 8.72 (1H, 2 с, ОН-7). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 9.1 и 9.2 (C-10), 12.7 (C-12), 13.7 (C-19), 18.3 и 18.5 (C-15), 19.1 (C-18), 21.0 и 21.2 (C-14), 31.5 и 31.6 (C-17), 53.0 и 53.1 (C-9b), 61.5 (ОМе), 69.7 (C-16), 73.4 и 73.6 (C-13), 74.6 (C-1), 88.8 и 88.9 (C-4), 106.9 и 107.1 (C-6), 112.1, 112.2, 112.2 и 112.3 (C-8 и C-9a), 114.7 и 114.8 (C-2), 122.9, 126.7, 129.0 и 139.2 (2C, C, 2C и C – все аром), 137.0 (C-3), 147.7 (C-11), 153.4, 153.5 и 153.6 (C-7 и C-5a), 155.2 и 155.3 (C-9), 168.4 (C-4a). Найдено: осколочный ион (-C₄H₉OH) *m/z* 416.1725 [M]⁺ C₂₅H₂₄O₄N₂.

Синтез соединений **151** и **152**.

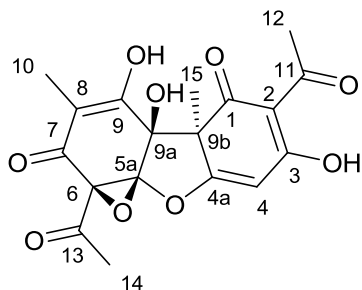
К раствору УК (1 ммоль) в 5 мл хлороформа прибавляют 3 мл раствора надуксусной кислоты (1 ммоль/мл) в хлороформе и оставляют при перемешивании и комнатной

температуре на сутки. По истечении суток реакционную смесь промывают водой, сушат над $MgSO_4$, удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем, элюент – хлороформ.

(1R,8R,9R,13S)-6,13-диацетил-5,9,10-тригидрокси-8,11-диметил-2,14-

диоксатетрацикло[7.5.0.0^{1,13}.0^{3,8}]тетрадека-3,5,10-триен-7,12-

дион (+)-151. Бесцветные кристаллы.



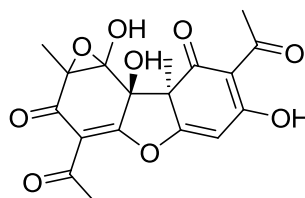
Выход 41%. т.пл. 145 °С (из $CHCl_3$). $[\alpha]_D +36,8^\circ$ (c 0.199; $CHCl_3$). ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 841, 1115, 1123, 1465, 1646, 1688, 1719, 2708, 3311. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ м.д.): 1.47 (3H, с, Н-15), 1.78 (3H, с, Н-10), 2.40 (3H, с, Н-14), 2.63 (3H, с, Н-12), 3.51 (1H, с, ОН-9a), 5.85 (1H, с, Н-4), 11.28 (1H, с, ОН-9), 18.81

(1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.70 (C-10), 24.22 (C-15), 27.95 (C-12), 28.49 (C-14), 59.88 (C-9b), 65.67 (C-6), 75.49 (C-9a), 95.26 (C-5a), 99.21 (C-4), 106.53 (C-2), 114.95 (C-8), 162.09 (C-9), 173.97 (C-4a), 185.81 (C-7), 191.53 (C-3), 194.46 (C-1), 198.00 (C-13), 202.15 (C-11). Масс-спектр, m/z ($I_{отн.}$, %): 376.1 (M^+ 36.27), 182.1 (43.78), 167.1 (100.00), 43.0 (48.46).

Рентгеноструктурный эксперимент провели при температура 296 К на дифрактометре Bruker P4 (Mo $K\alpha$ -излучение с графитовым монохроматором, $2\theta/\theta$ -сканирование в области $2\theta < 54^\circ$). Для эксперимента был отобран кристаллический образец соединения (+)-**87** размером 0.12 × 0.40 × 0.48 мм. Кристаллографические данные: $C_{18}H_{16}O_9$, моноклинная сингония, пространственная группа $P2_1$, $a = 8.1390(7)$, $b = 11.274(1)$, $c = 9.3268(7)$, $\beta = 93.712(6)^\circ$, $V = 853.99(12) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $d_{calc} = 1.459 \text{ г/см}^3$, $\mu = 0.119 \text{ мм}^{-1}$. Измерили интенсивности 1978 независимых отражений. Поправку на поглощение вводили эмпирическим методом (трансмиссия 0.95 – 0.99). Структуру расшифровали прямым методом по программе SHELXS-97. Уточнение параметров структуры провели методом наименьших квадратов в полноматричном анизотропном приближении по программе SHELXL-97. Параметры гидроксильных атомов Н уточняли в изотропном приближении, параметры остальных атомов Н рассчитывали в каждом цикле уточнения по координатам соответствующих атомов углерода. Метильная группа при C_3 разупорядочена по двум положениям в соотношении 0.6 : 0.4. Окончательное уточнение структуры провели по всем F^2 до $wR_2 = 0.1027$, $S = 1.056$, 261 параметр, $R_1 = 0.0368$ для 1487 отражений с $I > 2\sigma(I)$. Полученные данные депонированы в Кембриджскую базу структурных данных (номер CCDC 766124) и могут быть бесплатно получены по адресу <http://www.ccdc.cam.ac.uk/cgi-bin/catreq.cgi>.

(1S,8S,9S,13R)-6,13-диацетил-5,9,10-тригидрокси-8,11-диметил-2,14-диоксатетрацикло[7.5.0.0^{1,13}.0^{3,8}]тетрадека-3,5,10-триен-7,12-дион (-)-151. $[\alpha]_D -34^\circ$ (*c* 0.2; CHCl₃).

(1S,2R)-4,10-диацетил-1,5,14-тригидрокси-2,12-диметил-8,13-диоксатетрацикло[7.5.0.0^{2,7}.0^{12,14}]тетрадека-4,6,9-триен-3,11-дион (+)-152. Белый аморфный порошок.



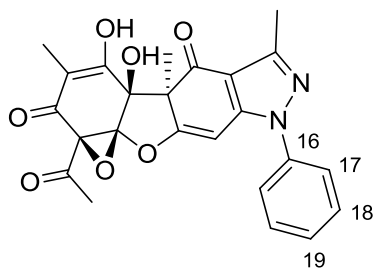
Выход 27%. т.пл. 90 °С (из CHCl₃). $[\alpha]_D +14.2^\circ$ (*c* 0.138; CHCl₃). ИК-спектр (KBr, ν , см⁻¹): 760, 957, 1073, 1099, 1225, 1461, 1544, 1631, 1685, 3401. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.52 (3H, с, H-10), 1.63 (3H, с, H-15), 2.45 (3H, с, H-14), 2.62 (3H, с, H-12), 5.63 (1H, с, OH-9a), 6.00 (1H, с, H-4), 7.58 (1H, с, OH-9), 18.69 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 14.85 (C-10), 25.24 (C-15), 27.56 (C-12), 31.51 (C-14), 61.77 (C-9b), 79.45 (C-9a), 79.68 (C-8), 93.04 (C-9), 100.67 (C-4), 107.38 (C-2), 115.82 (C-6), 170.20 (C-5a), 176.37 (C-4a), 191.51 (C-3), 192.15 (C-7), 194.58 (C-1), 196.33 (C-13), 201.62 (C-11). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 376.1 (M⁺ 7.64), 333.1 (43.38), 167.1 (56.48), 43.0 (100.00).

Синтез соединений 153 и 154.

К раствору соединения **35** (1 ммоль) в 5 мл хлороформа прибавляют 3 мл раствора надуксусной кислоты (1 ммоль/мл) в хлороформе и оставляют при перемешивании и комнатной температуре на сутки. По истечении суток реакционную смесь промывают водой, сушат над MgSO₄, удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем, элюент – хлороформ.

(1R,2R,6S,8R)-6-ацетил-2,3-дигидрокси-1,4,15-триметил-13-фенил-7,9-диокса-13,14-диазапентацикло[8.7.0.0^{2,8}.0^{6,8}.0^{12,16}]гептадека-3,10,12(16),14-тетраен-5,17-дион (+)-153.

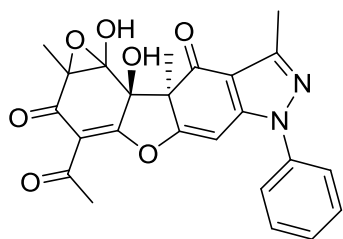
Светло-жёлтый аморфный порошок.



Выход 43%. т.пл. 205 °С (из CHCl₃). $[\alpha]_D +24^\circ$ (*c* 0.236; CHCl₃). ИК-спектр (KBr, ν , см⁻¹): 761, 1006, 1027, 1221, 1279, 1455, 1483, 1513, 1644, 1676, 1725, 2713, 3100. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.52 (3H, с, H-15), 1.82 (3H, с, H-10), 2.38 (3H, с, H-14), 2.55 (3H, с, H-12), 3.32 (1H, с, OH-9a), 6.12 (1H, с, H-4), 7.41-7.53 (5H, м, H-Ar), 11.36 (1H, с, OH-9). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.74 (C-10), 13.18 (C-12), 23.15 (C-15), 28.47 (C-14), 61.42 (C-9b), 66.08 (C-6), 75.68 (C-9a), 89.65 (C-4), 95.24 (C-5a), 111.95 (C-2), 114.88 (C-8), 123.99 (2C-17), 128.89 (C-19), 129.57 (2C-18), 137.54 (C-16), 148.39 (C-3), 151.52 (C-11), 162.44 (C-9), 167.57 (C-4a), 186.03 (C-7), 192.26 (C-1), 198.32 (C-13). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 448.1 (M⁺ 8.46), 268.1 (100.00), 254.1 (51.54), 77.0 (40.60).

(1R,2S)-7-ацетил-2,3-дигидрокси-1,5,15-триметил-13-фенил-4,9-диокса-13,14-диазапентацикло[8.7.0.0^{2,8}.0^{3,5}.0^{12,16}]гептадека-7,10,12(16),14-тетраен-6,17-дион (+)-154.

Светло-жёлтый аморфный порошок.

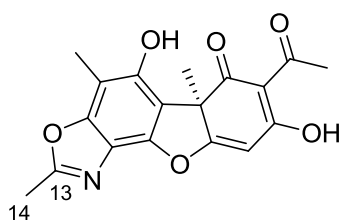


Выход 22%. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.45 (3H, с, Н-10), 1.65 (3H, с, Н-15), 2.41 (3H, с, Н-14), 2.49 (3H, с, Н-12), 3.64 (H, с, ОН-9а), 6.28 (1H, с, Н-4), 7.38-7.48 (5H и 1H, м, Н-аром и ОН-9). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 12.94 (C-12), 14.00 (C-10), 23.93 (C-15), 31.37 (C-14), 63.46 (C-9b), 79.57 (C-9a), 79.92 (C-8), 90.84 (C-4), 92.78 (C-9), 113.11 (C-2), 114.75 (C-6), 123.94 (2C-17), 128.76 (C-19), 129.48 (2C-18), 137.54 (C-16), 147.55 (C-3), 151.04 (C-11), 170.72 (C-4a), 172.27 (C-5a), 192.74 (C-7), 193.57 (C-1), 197.01 (C-13). Найдено: *m/z* 448.1262 [M]⁺ C₂₄H₂₀O₇N₂. Вычислено: M = 448.1265.

Синтез соединения 156.

1 ммоль УК растворили в 10 мл хлороформа, добавили 3 мл концентрированной серной кислоты и 4-х кратный избыток азидата натрия. Смесь нагревали до 50-60 °С в течение 2 часов при перемешивании. Охлаждённую реакционную смесь нейтрализовали 5%-ным водным КОН, экстрагировали дважды по 30 мл хлороформом, объединённый хлороформный экстракт сушили над прокалённым MgSO₄. Продукт выделяли хроматографией на силикагеле (100-160μ, Мерск), элюент - хлороформ.

(10R)-12-ацетил-8,13-дигидрокси-4,7,10-триметил-5,16-диокса-3-азатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,3,6,8,12,14-гексаен-11-он (+)-156. Светло-жёлтый аморфный порошок.

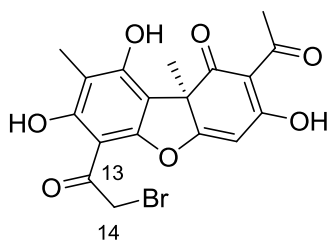


Выход 70%. ИК спектр (ν , см⁻¹): 958, 1065, 1094, 1113, 1200, 1303, 1357, 1461, 1536, 1594, 1644, 1689, 2923, 3050, 3662. Спектр ЯМР ¹H совпадает с литературным²⁹¹. Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 201.2 (с., C-11), 197.9 (с., C-1), 191.2 (с., C-3), 180.4 (с., C-4a), 163.1 (с., C-13), 153.2 (с., C-7), 148.3 (с., C-9), 141.6 (с., C-5a), 118.9 (с., C-6), 108.7 (с., C-8), 104.8 (с., C-2), 104.1 (с., C-9a), 97.5 (д., C-4), 59.7 (с., C-9b), 31.7 (к., C-15), 27.6 (к., C-12), 14.0 (к., C-14), 8.4 (к., C-10).

Синтез соединения 157.

К 1 ммоль УК добавляли комплекс бромдиоксана (2 ммоль брома (0.10 мл) растворяли в 14 мл диоксана), несколько капель НВг и оставили на 7 суток при комнатной температуре. После концентрирования реакционной смеси на ротационном испарителе хроматографировали полученный остаток на силикагеле (60-200μ), элюент – CH₂Cl₂.

(2R)-4-ацетил-10-(2-бромацетил)-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-157. Светло-жёлтый аморфный порошок.



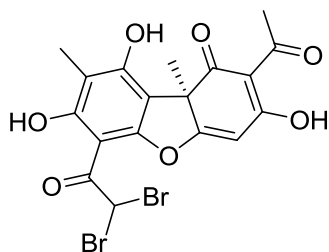
Выход 67%. Т.пл. 97-100 °С. $[\alpha]_D +349$ (*c* 0.5; CHCl₃). ИК спектр (ν , см⁻¹): 842, 1140, 1292, 1458, 1628, 3013, 3497. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.08 (3H, с, H-10), 2.64 (3H, с, H-12), 4.52 (2H, дд, J = 12.4, J = 14.0, H-14), 6.00 (1H, с, H-4), 11.17 (1H, с, OH-9), 12.68 (1H, с, OH-7), 18.81 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.5 (C-10), 27.7 (C-12), 31.9 (C-15), 34.5 (C-14), 61.6 (C-9b), 98.7 (C-4), 99.0 (C-6), 104.3 (C-9a), 105.1 (C-2), 109.6 (C-8), 154.3 (C-5a), 158.4 (C-9), 164.1 (C-7), 178.5 (C-4a), 191.5 (C-3), 192.7 (C-13), 197.7 (C-1), 201.7 (C-11). Найдено: *m/z* 421.9976 [M]⁺ C₁₈H₁₅O₇Br. Вычислено: M = 421.9996.

(2S)-4-ацетил-10-(2-бромацетил)-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (-)-157 Т.пл. 98-100 °С. $[\alpha]_D -346$ (*c* 0.5; CHCl₃).

Синтез соединения 158.

К 1 ммоль УК добавили заранее приготовленный комплекс бромдиоксана (3 ммоль брома (0.15 мл) растворили в 22 мл диоксана), несколько капель HBr и оставили на 7 суток при комнатной температуре. Концентрировали реакцию массу на ротационном испарителе и получили смесь соединений **157** и **158** в соотношении (7:3 по спектру ЯМР ¹H). Соединение **158** выделяли колоночной хроматографией на силикагеле (60-200μ), элюент – CH₂Cl₂. Светло-жёлтый аморфный порошок.

(2R)-4-ацетил-10-(2,2-дибромацетил)-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-158. Светло-жёлтый аморфный порошок.



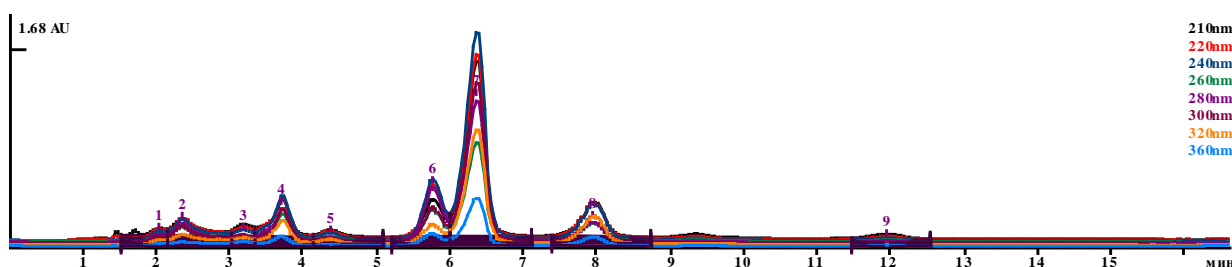
Выход 18 %. ИК спектр (ν , см⁻¹): 3499, 3012, 1628, 1458, 1292, 1189, 874. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.10 (3H, с, H-10), 2.64 (3H, с, H-12), 6.09 (1H, с, H-4), 7.07 (1H, с, H-14), 11.33 (1H, с, OH-9), 12.46 (1H, с, OH-7), 18.81 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.6 (C-10), 27.7 (C-12), 31.8 (C-15), 41.5 (C-14), 58.8 (C-9b), 95.8 (C-6), 99.1 (C-4), 104.3 (C-9a), 104.9 (C-2), 110.2 (C-8), 153.5 (C-5a), 159.1 (C-9), 164.8 (C-7), 177.9 (C-4a), 187.4 (C-13), 191.4 (C-3), 197.6 (C-1), 201.8 (C-11). Найдено: *m/z* 499.9096 [M]⁺ C₁₈H₁₄O₇Br₂. Вычислено: M = 499.9101.

Оптимизация процесса бромирования УК

Фиксированный фактор: количество УК (0.344 г). Для получения бромусниновой кислоты на 0.344 г УК необходимо взять: 0.1 мл брома, 0.066 мл HBr (60%, d=1.68 г/мл), 20 мл диоксана, перемешивать при комнатной температуре (20 °С) в течение 3 суток. После реакции проводится перколяция на силикагеле реакционной смеси с целью отделения от избытка комплекса бромдиоксана и не прореагировавшей УК.

Контроль реакции бромирования осуществляется методом ВЭЖХ.

Типичная хроматограмма продуктов реакции бромирования УК, полученного в выше обозначенных условиях, выглядит следующим образом:



Хроматограмма реакционной смеси бромирования УК (пик 6 – УК, пик 7 – монобромпроизводное, пик 8 – дибромпроизводное)

Содержание продуктов реакционной смеси оценивалось в условных процентах исходя из суммарного содержания трех веществ в реакционной смеси, принятого за 100%. Таким образом, содержание УК составляет 17.6%, ее монобромпроизводного – 72.0%, дибромпроизводного 10.4%.

Для поиска оптимальных условий получения смеси моно- и дибромпроизводных УК был составлен план оптимизации. В качестве оптимизируемого параметра выступало соотношение УК и ее моно- и дибромпроизводных (УК/МВr/ДВr), где вклад УК должен быть наименьшим.

Основные характеристики плана оптимизации

| № фактора, j | Факторы варьирования | Z_j^{\max} | Z_j^{\min} | Z_j^0 | ΔZ_j |
|--------------|--|--------------|--------------|---------|--------------|
| 1 | Время реакции, сут | 5 | 1 | 3 | 2 |
| 2 | Количество растворителя, мл | 30 | 10 | 20 | 10 |
| 3 | Количество брома, мг | 0.15 | 0.05 | 0.1 | 0.05 |
| 4 | Количество бромоводородной кислоты, мг | 1.000 | 0.033 | 0.066 | 0.033 |
| 5 | T, °С | 40 | 0 | 20 | 20 |

$$Z_j^0 = (Z_j^{\max} + Z_j^{\min})/2; \Delta Z_j = (Z_j^{\max} - Z_j^{\min})/2$$

Матрица для пяти переменных факторов оптимизации

| x_1 | x_2 | x_3 | x_4 | x_5 |
|-------|-------|-------|-------|-------|
|-------|-------|-------|-------|-------|

| | | | | |
|------|--------|--------|--------|-------|
| 0.5 | 0.289 | 0.204 | 0.158 | 0.13 |
| -0.5 | 0.289 | 0.204 | 0.158 | 0.13 |
| 0 | -0.578 | 0.204 | 0.158 | 0.13 |
| 0 | 0 | -0.612 | 0.158 | 0.13 |
| 0 | 0 | 0 | -0.632 | 0.13 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | -0.65 |

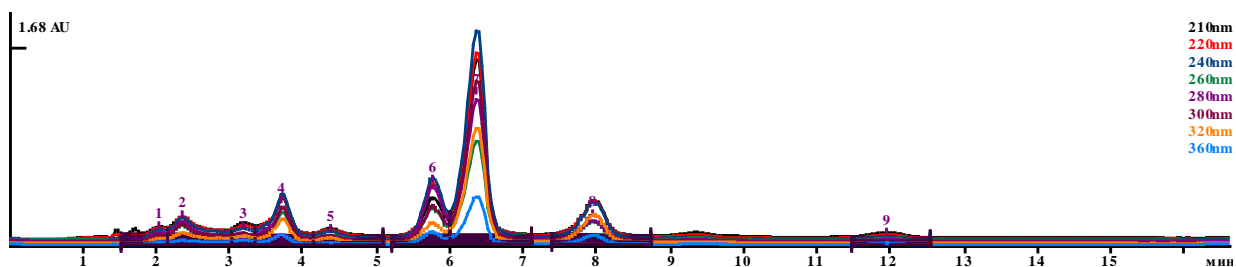
Рассчитываемый фактор в физической величине для исходной серии опытов:

$Z_j = x_j \cdot \Delta Z_j + Z_j^0$, где x_j – коэффициент по матрице.

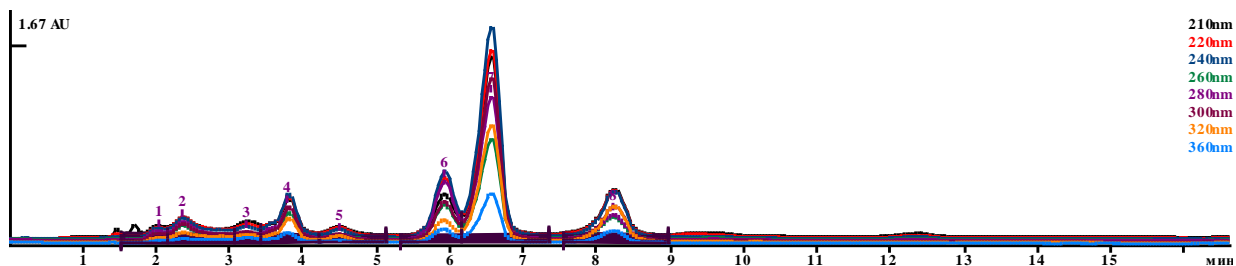
Исходная серия опытов оптимизации

| № опыта | Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МBr/DBr |
|---------|--------------------|-----------------------------|----------------------|--|-------|-----------------------------------|
| | Z_1 | Z_2 | Z_3 | Z_4 | Z_5 | |
| UBr-1 | 4 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 23.6/66.0/10.4 |
| UBr-2 | 2 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 22.2/66.7/11.1 |
| UBr-3 | 3 | 14.2 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 24.5/65.5/10.0 |
| UBr-4 | 3 | 20 | 0.07 | 0.071 | 22.6 | 52.5/43.2/4.3 |
| UBr-5 | 3 | 20 | 0.1 | 0.045 | 22.6 | 25.6/66.3/8.1 |
| UBr-6 | 3 | 20 | 0.1 | 0.066 | 7 | 91.8/8.2/0 |

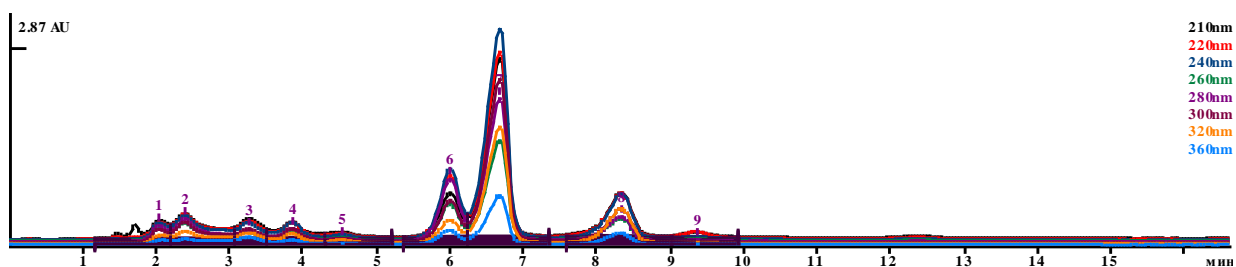
Хроматограммы реакционных смесей UBr-1, UBr-2, UBr-3, UBr-4, UBr-5, UBr-6 имели следующий вид:



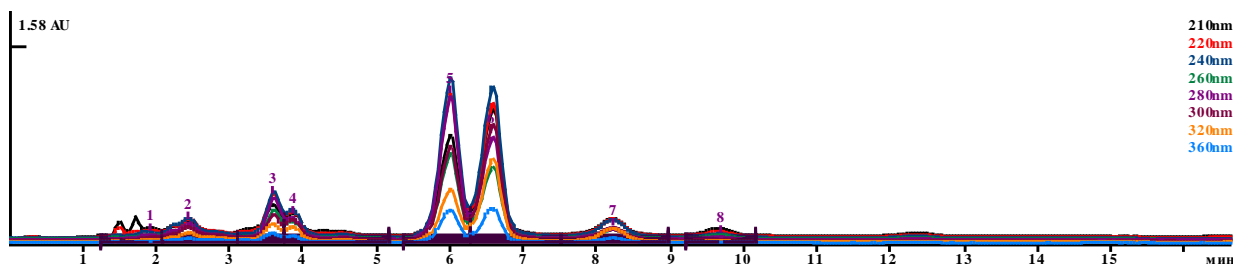
Хроматограмма реакционной смеси UBr-1 (пик 6 – УК, пик 7 – монобромпроизводное, пик 8 – дибромпроизводное)



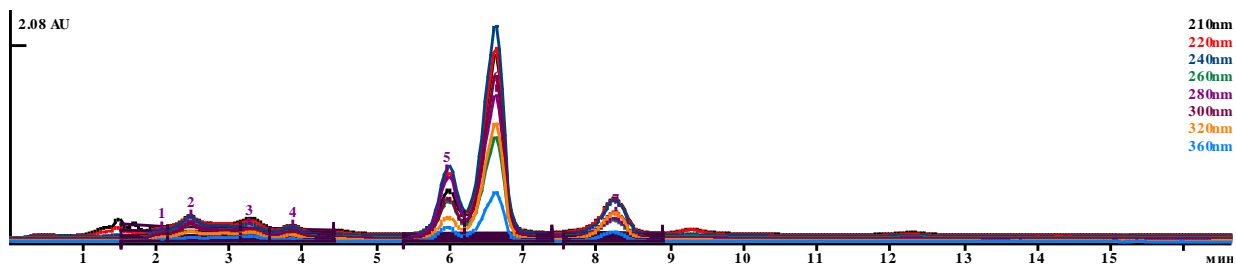
Хроматограмма реакционной смеси UBr-2 (пик 6 – УК, пик 7 – монобромпроизводное, пик 8 – дибромпроизводное)



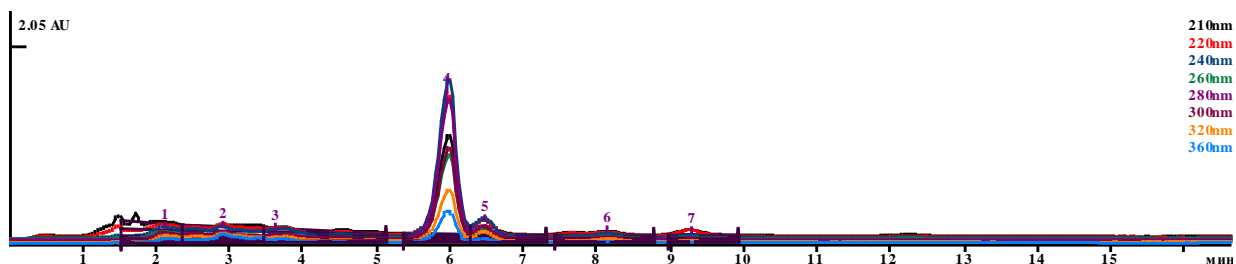
Хроматограмма реакционной смеси UBr-3 (пик 6 – УК, пик 7 – монобромпроизводное, пик 8 – дибромпроизводное)



Хроматограмма реакционной смеси UBr-4 (пик 5 – УК, пик 6 – монобромпроизводное, пик 7 – дибромпроизводное)



Хроматограмма реакционной смеси UBr-5 (пик 5 – УК, пик 6 – монобромпроизводное, пик 7 – дибромпроизводное)



Хроматограмма реакционной смеси UBr-6 (пик 4 – УК, пик 5 – монобромпроизводное, пик 6 – дибромпроизводное)

Второй этап оптимизации

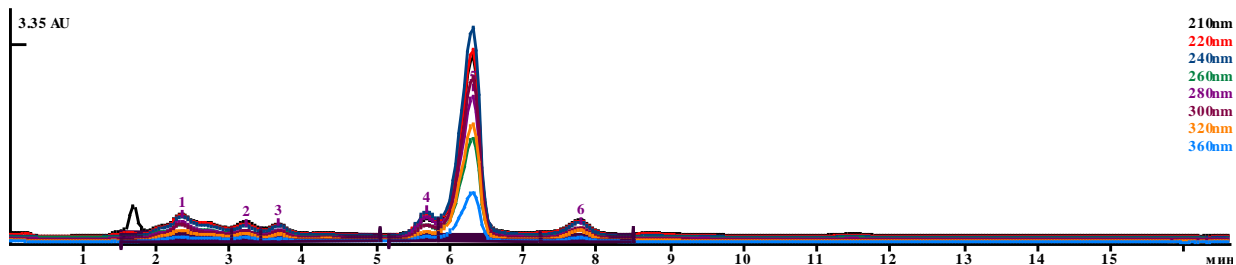
По итогам первого этапа оптимизации «наихудшим» опытом признан UBr-6, т.к. по данным ВЭЖХ содержание исходного соединения – УК в нем было наибольшим в серии экспериментов.

Рассчитываемый фактор в физической величине для второй серии опытов:

$Z_j = (2/n)\sum Z_{ji} - Z_i$, где n – число факторов в матрице планирования, i – номер опыта, j – номер фактора, $\sum Z_{ji}$ – сумма значений i -х факторов без наихудшего опыта, Z_i – значение i -го фактора в «наихудшем» опыте предыдущего симплекса.

На основании расчета был проведен новый эксперимент UBr-7

| № опыта | Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МВr/ДВr |
|---------|--------------------|-----------------------------|----------------------|--|-------|-----------------------------------|
| UBr-7 | 3 | 20.08 | 0.1 | 0.066 | 38.2 | 11.1/82.1/6.8 |



Хроматограмма реакционной смеси UBr-7 (пик 4 – УК, пик 5 – монобромпроизводное, пик 6 – дибромпроизводное)

Новая таблица

| № опыта | Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МВr/ДВr |
|---------|--------------------|-----------------------------|----------------------|--|----------------|-----------------------------------|
| | Z ₁ | Z ₂ | Z ₃ | Z ₄ | Z ₅ | |
| UBr-1 | 4 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 23.6/66.0/10.4 |
| UBr-2 | 2 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 22.2/66.7/11.1 |
| UBr-4 | 3 | 20 | 0.07 | 0.071 | 22.6 | 52.5/43.2/4.3 |
| UBr-3 | 3 | 14.2 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 24.5/65.5/10.0 |
| UBr-5 | 3 | 20 | 0.1 | 0.045 | 22.6 | 25.6/66.3/8.1 |
| UBr-7 | 3 | 20.08 | 0.1 | 0.066 | 38.2 | 11.1/82.1/6.8 |

Третий этап оптимизации

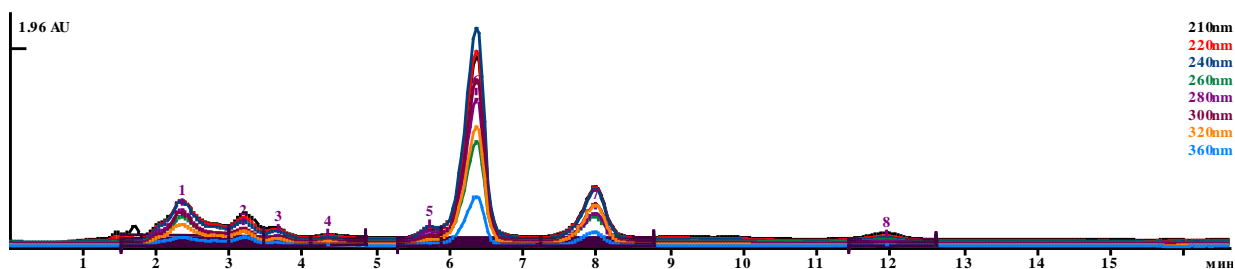
По итогам второго этапа оптимизации «наихудшим» опытом признан UBr-4, т.к. по данным ВЭЖХ содержание исходного соединения – УК в нем было наибольшим в серии экспериментов.

Рассчитываемый фактор в физической величине для третьей серии опытов:

$Z_j = (2/n)\sum Z_{ji} - Z_i$, где n – число факторов в матрице планирования, i – номер опыта, j – номер фактора, $\sum Z_{ji}$ – сумма значений i-х факторов без наихудшего опыта, Z_i – значение i-го фактора в «наихудшем» опыте предыдущего симплекса.

На основании расчета был проведен новый эксперимент UBr-8

| № опыта | Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МВr/ДВr |
|---------|--------------------|-----------------------------|----------------------|--|-------|-----------------------------------|
| UBr-8 | 3 | 20.1 | 0.142 | 0.058 | 28.8 | 5.3/76.5/18.3 |



Хроматограмма реакционной смеси UBr-8 (пик 5 – УК, пик 6 – монобромпроизводное, пик 7 – дибромпроизводное)

Новая таблица

| № опыта | Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МBr/DBr |
|---------|--------------------|-----------------------------|----------------------|--|----------------|-----------------------------------|
| | Z ₁ | Z ₂ | Z ₃ | Z ₄ | Z ₅ | |
| UBr-1 | 4 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 23.6/66.0/10.4 |
| UBr-2 | 2 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 22.2/66.7/11.1 |
| UBr-3 | 3 | 14.2 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 25.6/66.3/8.1 |
| UBr-5 | 3 | 20 | 0.1 | 0.045 | 22.6 | 24.5/65.5/10.0 |
| UBr-7 | 3 | 20.08 | 0.1 | 0.066 | 38.2 | 11.1/82.1/6.8 |
| UBr-8 | 3 | 20.1 | 0.142 | 0.058 | 28.8 | 5.3/76.5/18.3 |

Четвертый этап оптимизации

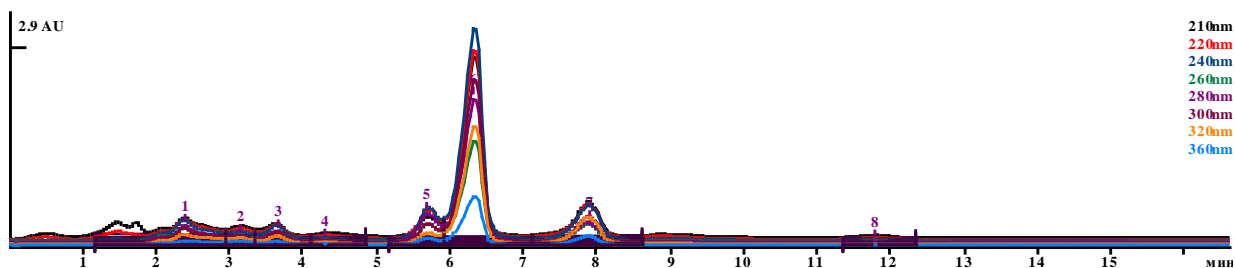
По итогам третьего этапа оптимизации «наихудшим» опытом признан UBr-5, т.к. по данным ВЭЖХ содержание исходного соединения – УК в нем было наибольшим в серии экспериментов.

Рассчитываемый фактор в физической величине для четвертой серии опытов:

$Z_j = (2/n)\sum Z_{ji} - Z_i$, где n – число факторов в матрице планирования, i – номер опыта, j – номер фактора, $\sum Z_{ji}$ – сумма значений i-х факторов без наихудшего опыта, Z_i – значение i-го фактора в «наихудшем» опыте предыдущего симплекса.

На основании расчета был проведен новый эксперимент UBr-9

| № опыта | Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МBr/DBr |
|---------|--------------------|-----------------------------|----------------------|--|-------|-----------------------------------|
| UBr-9 | 2.6 | 28.4 | 0.11 | 0.053 | 31.3 | 13.8/73.7/12.5 |



Хроматограмма реакционной смеси UBr-9 (пик 5 – УК, пик 6 – монобромпроизводное, пик 7 – дибромпроизводное)

Новая таблица

| № опыта | Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МBr/DBr |
|---------|--------------------|-----------------------------|----------------------|--|----------------|-----------------------------------|
| | Z ₁ | Z ₂ | Z ₃ | Z ₄ | Z ₅ | |
| UBr-1 | 4 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 23.6/66.0/10.4 |
| UBr-2 | 2 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 22.2/66.7/11.1 |
| UBr-5 | 3 | 20 | 0.1 | 0.045 | 22.6 | 25.6/66.3/8.1 |
| UBr-7 | 3 | 20.08 | 0.1 | 0.066 | 38.2 | 11.1/82.1/6.8 |
| UBr-8 | 3 | 20.1 | 0.142 | 0.058 | 28.8 | 5.3/76.5/18.3 |
| UBr-9 | 2.6 | 28.4 | 0.11 | 0.053 | 31.3 | 13.8/73.7/12.5 |

Пятый этап оптимизации

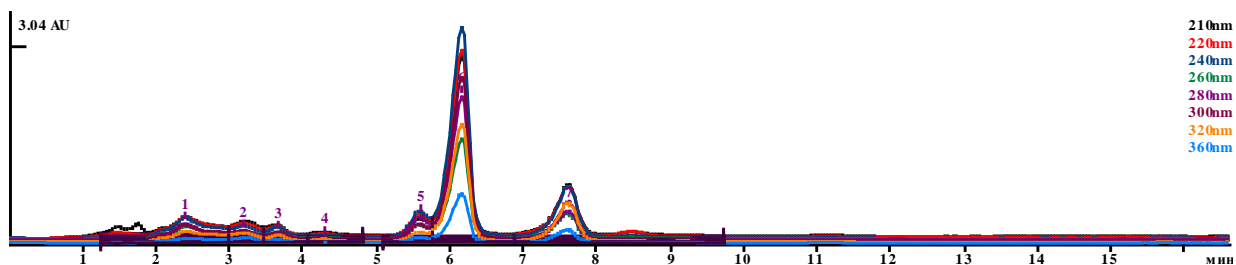
По итогам четвертого этапа оптимизации «наихудшим» опытом признан UBr-1, т.к. по данным ВЭЖХ содержание исходного соединения – УК в нем было наибольшим в серии экспериментов.

Рассчитываемый фактор в физической величине для пятой серии опытов:

$Z_j = (2/n)\sum Z_{ji} - Z_i$, где n – число факторов в матрице планирования, i – номер опыта, j – номер фактора, $\sum Z_{ji}$ – сумма значений i-х факторов без наихудшего опыта, Z_i – значение i-го фактора в «наихудшем» опыте предыдущего симплекса.

На основании расчета был проведен новый эксперимент UBr-10

| № опыта | Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МBr/DBr |
|---------|--------------------|-----------------------------|----------------------|--|-------|-----------------------------------|
| UBr-10 | 2.8 | 25.8 | 0.130 | 0.083 | 35 | 5.5/79.7/14.8 |



Хроматограмма реакционной смеси UBr-10 (пик 5 – УК, пик 6 – монобромпроизводное, пик 7 – дибромпроизводное)

Новая таблица

| № | Время | Количество | Количество | Количество | T, °C | Результат: |
|---|-------|------------|------------|------------|-------|------------|
|---|-------|------------|------------|------------|-------|------------|

| опыта | реакции, сут | растворителя , мл | во брома, мл | бромоводород ной кислоты, мл | | соотношение УК/МВr/DBr |
|--------|-----------------|----------------------|-----------------|------------------------------------|-------|---------------------------|
| | Z_1 | Z_2 | Z_3 | Z_4 | Z_5 | |
| UBr-1 | 4 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 23.6/66.0/10.4 |
| UBr-2 | 2 | 23 | 0.11 | 0.071 | 22.6 | 22.2/66.7/11.1 |
| UBr-7 | 3 | 20.08 | 0.1 | 0.066 | 38.2 | 11.1/82.1/6.8 |
| UBr-8 | 3 | 20.1 | 0.142 | 0.058 | 28.8 | 5.3/76.5/18.3 |
| UBr-9 | 2.6 | 28.4 | 0.11 | 0.053 | 31.3 | 13.8/73.7/12.5 |
| UBr-10 | 2.8 | 25.8 | 0.130 | 0.083 | 35 | 5.5/79.7/14.8 |

Шестой этап оптимизации

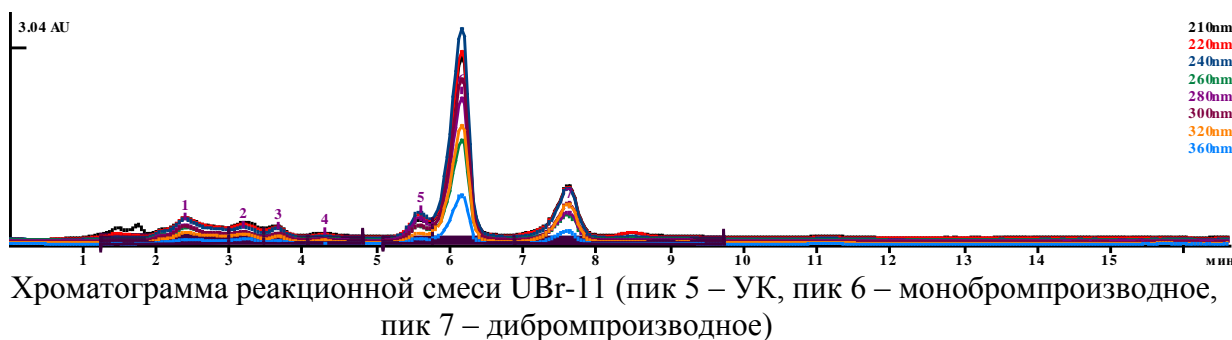
По итогам пятого этапа оптимизации «наихудшим» опытом признан UBr-1, т.к. по данным ВЭЖХ содержание исходного соединения – УК в нем было наибольшим в серии экспериментов.

Рассчитываемый фактор в физической величине для шестого этапа оптимизации:

$Z_j = (2/n)\Sigma Z_{ji} - Z_i$, где n – число факторов в матрице планирования, i – номер опыта, j – номер фактора, ΣZ_{ji} – сумма значений i -х факторов без наилучшего опыта, Z_i – значение i -го фактора в «наихудшем» опыте предыдущего симплекса.

На основании расчета был проведен новый эксперимент UBr-11

| № опыта | Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МВr/DBr |
|---------|-----------------------|--------------------------------|----------------------|---|-------|---|
| UBr-11 | 2.6 | 21.5 | 0.117 | 0.036 | 40 | 6.0/81.6/12.4 |



Как видно из результатов эксперимента в опытах UBr-9, UBr-10 и UBr-11 содержание УК было бóльшим относительно опыта UBr-8, где содержание исходного вещества было минимальным из всех проведенных экспериментов – 5.3% по данным ВЭЖХ.

Таким образом, лучшими условиями для проведения реакции бромирования УК стали условия эксперимента UBr-8, которые в дальнейшем использовали для синтеза.

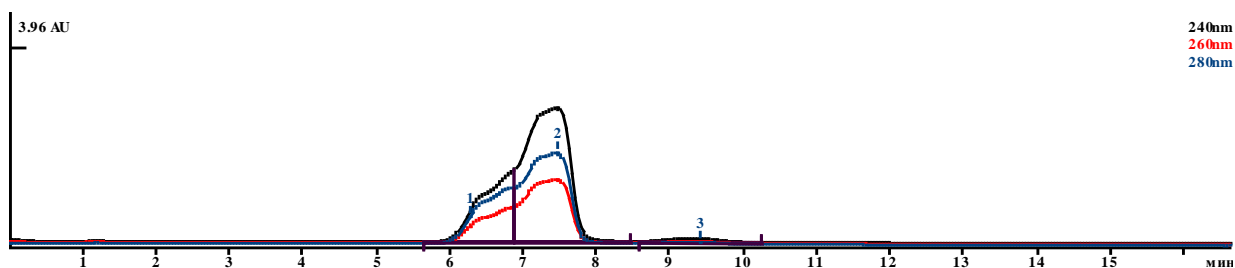
Оптимизированные параметры реакции бромирования УК:

| Время реакции, сут | Количество растворителя, мл | Количество брома, мл | Количество бромоводородной кислоты, мл | T, °C | Результат: соотношение УК/МВr/DBr |
|--------------------|-----------------------------|----------------------|--|-------|-----------------------------------|
| 3 | 20.1 | 0.142 | 0.058 | 28.8 | 5.3/76.5/18.3 |

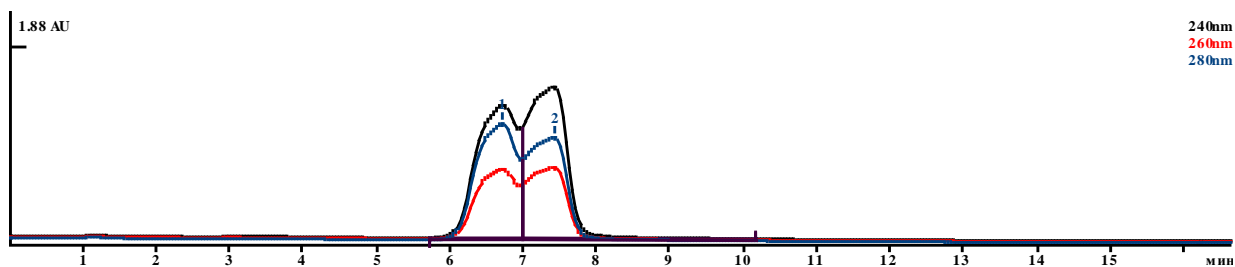
Методика синтеза с учетом оптимизированных параметров будет выглядеть следующим образом. К 1 ммоль УК, растворенному в 14 мл диоксана, добавляют заранее приготовленный комплекс бромдиоксана (2.84 ммоль брома (0.142 мл) растворяют в 6.1 мл диоксана), 0.058 мл бромоводородной кислоты и помещают на 3 суток в термостат при температуре 28.8 °C и перемешивании. Удаляют растворитель на ротационном испарителе. В результате получают смесь, содержащую по данным ВЭЖХ УК, ее монобромпроизводное и дибромпроизводное в соотношении 5.3/76.5/18.3 соответственно.

Оптимизация процесса очистки бромпроизводных УК

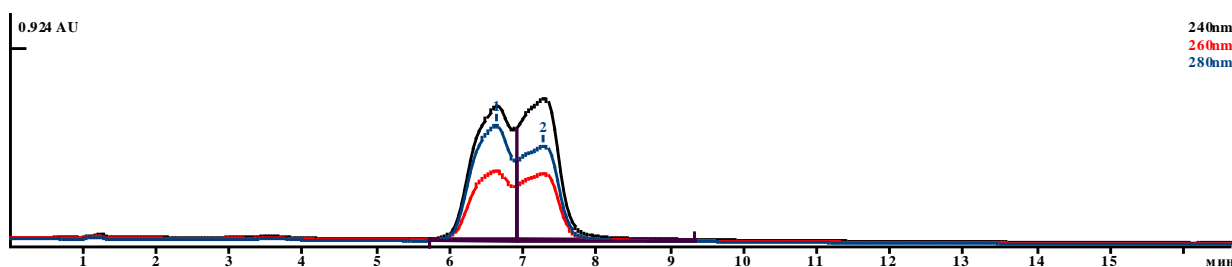
Для достижения поставленной цели был использован ряд хроматографических сорбентов. Окись алюминия (нейтральная, кислая, щелочная) оказалась непригодной для осуществления очистки реакционной смеси, поскольку данный сорбент приводил к химической деструкции бромпроизводных УК. Перколяция на силикагеле Macherey-Nagel 230-400μ (соотношение вещество – сорбент 1:20, элюент хлороформ) оказалась длительной во времени и, по-видимому, приводила к деструкции монобромпроизводного УК, что было видно из хроматограмм некоторых фракций.



Хроматограмма реакционной смеси после перколяции на силикагеле Macherey-Nagel 230-400μ. Фракция 2 (пик 1 – УК, пик 2 – монобромпроизводное)



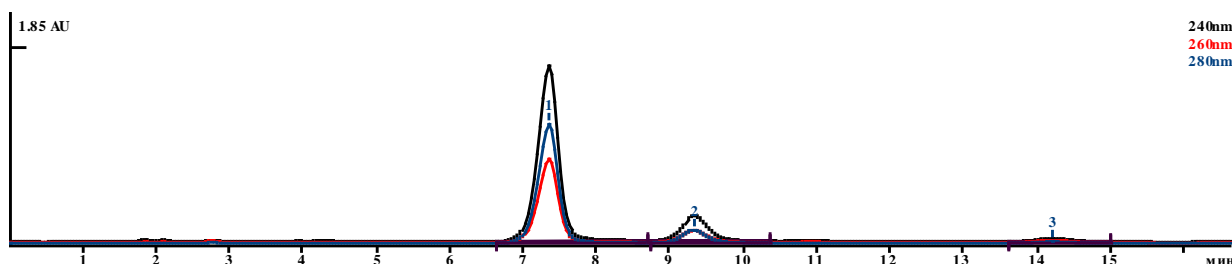
Хроматограмма реакционной смеси после перколяции на силикагеле Macherey-Nagel 230-400μ. Фракция 5 (пик 1 – УК, пик 2 – монобромпроизводное)



Хроматограмма реакционной смеси после перколяции на силикагеле Macherey-Nagel 230-400μ. Фракция 6 (пик 1 – УК, пик 2 – монобромпроизводное)

Как видно, фракции постепенно обогащаются УК. Таким образом, несмотря на то, что на данном хроматографическом сорбенте произошло отделение от мелких примесей, он оказался непригодным для очистки реакционной смеси.

Наиболее подходящей для очистки реакционной смеси бромирования УК оказалась перколяция на силикагеле с более крупной фракцией сорбирующих частиц Merck 60-200μ (соотношение вещество – сорбент 1:20-25, элюент хлороформ или хлористый метилен, перегнанные над оксидом фосфора (V)). В этом случае произошло отделение от мелких примесей и от исходного соединения – УК. Содержание основных компонентов – монобромпроизводного и дибромпроизводного после перколяции составило 97% по данным ВЭЖХ.



Хроматограмма реакционной смеси после перколяции на силикагеле Merck 60-200μ (пик 1 – монобромпроизводное, пик 2 – дибромпроизводное)

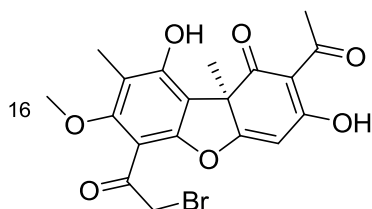
Таким образом, лучшими условиями для очистки реакционной смеси от примесей оказалась перколяция на силикагеле Merck 60-200μ в следующих условиях: соотношение вещество – сорбент 1:20-25, элюент хлороформ или хлористый метилен, перегнанные над оксидом фосфора (V).

Синтез соединения 159.

К 1 ммоль соединения **118** в 20 мл диоксана добавляли заранее приготовленный комплекс бромдиоксана (1 ммоль брома (0.05 мл) растворяли в 10 мл диоксана), несколько капель НВг и перемешивали 20 мин при комнатной температуре. После концентрирования

реакционной смеси на ротационном испарителе хроматографировали полученный остаток на силикагеле, элюент – хлористый метилен.

(2R)-4-ацетил-10-(2-бромацетил)-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-159. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.

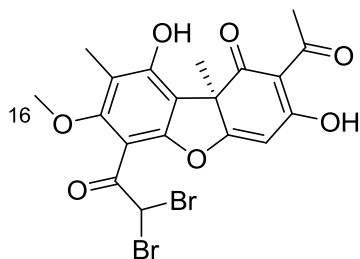


Выход 86%. $[\alpha]_D^{29} +202$ (с 0.2; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.73 (3H, с, H-15), 2.13 (3H, с, H-10), 2.60 (3H, с, H-12), 3.75 (3H, с, H-16), 4.43 (2H, дд, J = 13.1, J = 14, H-14), 5.91 (1H, с, H-4), 10.91 (1H, с, OH-9), 18.78 (1H, с, OH-3). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.64 (C-10), 27.75 (C-12), 31.74 (C-15), 36.07 (C-14), 58.9 (C-9b), 62.3 (C-16), 98.16 (C-4), 108.45 (C-9a), 108.53 (C-6), 104.99 (C-2), 116.49 (C-8), 153.07 (C-5a), 155.75 (C-9), 159.60 (C-7), 179.32 (C-4a), 189.25 (C-13), 191.48 (C-3), 197.56 (C-1), 201.57 (C-11). Найдено: m/z 436.0159 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_7^{79}\text{Br}_1$. Вычислено: $M = 436.0152$.

Синтез соединения 160.

К 1 ммоль соединения **118** в 20 мл диоксана добавляли заранее приготовленный комплекс бромдиоксана (2 ммоль брома (0.05 мл) растворяли в 20 мл диоксана), несколько капель HBr и перемешивали 20 мин при комнатной температуре. После концентрирования реакционной смеси на ротационном испарителе хроматографировали полученный остаток на силикагеле, элюент – хлористый метилен.

(2R)-4-ацетил-10-(2,2-дибромацетил)-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-160. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



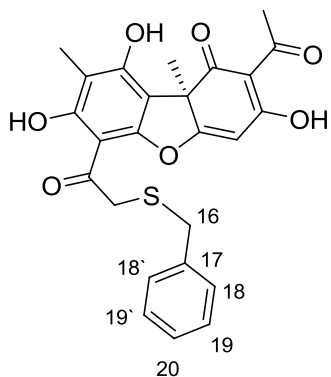
Выход 83%. $[\alpha]_D^{29} +143$ (с 0.25; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.76 (3H, с, H-15), 2.16 (3H, с, H-10), 2.63 (3H, с, H-12), 3.78 (3H, с, H-16), 5.98 (1H, с, H-4), 6.89 (1H, с, H-14), 11.03 (1H, с, OH-9), 18.82 (1H, с, OH-3). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.54 (C-10), 27.71 (C-12), 31.67 (C-15), 58.82 (C-9b), 62.24 (C-14), 62.59 (C-16), 98.42 (C-4), 104.90 (C-9a), 105.29 (C-6), 108.79 (C-2), 116.54 (C-8), 153.31 (C-5a), 156.28 (C-9), 159.28 (C-7), 178.97 (C-4a), 183.86 (C-13), 191.39 (C-3), 197.40 (C-1), 201.56 (C-11). Найдено: m/z 513.9256 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_7^{79}\text{Br}_2$. Вычислено: $M = 513.9257$.

Синтез соединений 161-168.

В колбу помещали навеску 1.1 ммоль гидроксида калия, 6 мл метанола, 1.1 ммоль соответствующего тиола и перемешивали при комнатной температуре 10-15 минут. Затем к полученному раствору прибавляли раствор 1 ммоль соединения **157** в 2 мл хлористого

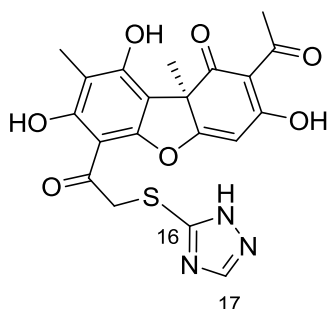
метилена и перемешивали при комнатной температуре 2-3 часа до завершения реакции (контроль по ТСХ). Реакционную смесь промывали 2 раза дистиллированной водой, сушили над $MgSO_4$, концентрировали и хроматографировали полученный остаток на силикагеле), элюент – хлористый метилен.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(бензилсульфанил)ацетил]-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-161. Жёлтый аморфный порошок.



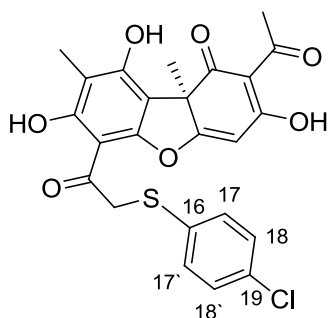
Выход 51%. Т.пл. 124-125 °С. $[\alpha]_D^{27} +353$ (с 0.45; $CHCl_3$). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.72 (3H, с, Н-15), 2.10 (3H, с, Н-10), 2.63 (3H, с, Н-12), 3.66 (2H, дд, J = 14.0, J = 18.0, Н-16), 3.73 (2H, с, Н-14), 5.88 (1H, с, Н-4), 7.23 (1H, м, Н-20), 7.31 (4H, м, Н-аром.), 11.06 (1H, с, ОН-9), 13.01 (1H, с, ОН-7), 18.79 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.45 (C-10), 27.72 (C-12), 31.88 (C-15), 35.68 (C-16), 39.60 (C-14), 58.82 (C-9b), 98.27 (C-4), 99.66 (C-9a), 104.05 (C-6), 105.10 (C-2), 109.47 (C-8), 127.12 (C-20), 128.39 (C-19, C-19'), 129.11 (C-18, C-18'), 137.18 (C-17), 154.39 (C-5a), 157.64 (C-9), 164.37 (C-7), 178.81 (C-4a), 191.48 (C-13), 196.64 (C-3), 197.83 (C-1), 201.62 (C-11). Найдено: m/z 466.1077 $[M]^+$ $C_{25}H_{22}O_7S$. Вычислено: $M = 466.1081$.

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-[2-(1H-1,2,4-триазол-5-илсульфанил)ацетил]-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-162. Жёлтый аморфный порошок.



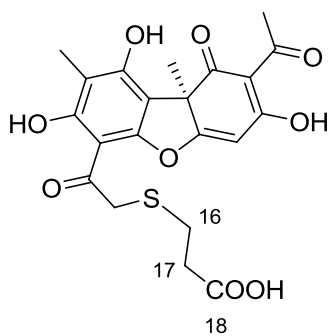
Выход 32%. Т.пл. 176-178 °С. $[\alpha]_D^{27} +324$ (с 0.21; $CHCl_3$). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.72 (3H, с, Н-15), 2.06 (3H, с, Н-10), 2.63 (3H, с, Н-12), 4.62 (2H, дд, J = 16.9, J = 18.4, Н-14), 6.00 (1H, с, Н-4), 7.56 (1H, ш.с., N-H), 8.37 (1H, с, Н-17), 11.15 (1H, с, ОН-9), 12.54 (1H, с, ОН-7), 18.80 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.41 (C-10), 27.71 (C-12), 31.86 (C-15), 42.56 (C-14), 58.68 (C-9b), 98.83 (C-4), 99.81 (C-9a), 104.37 (C-6), 105.05 (C-2), 109.45 (C-8), 128.16 (C-17), 154.59 (C-9), 155.60 (C-5a), 158.25 (C-16), 163.65 (C-7), 178.32 (C-4a), 191.47 (C-13), 194.82 (C-3), 197.67 (C-1), 201.69 (C-11). Найдено: m/z 443.0775 $[M]^+$ $C_{20}H_{17}N_3O_7S$. Вычислено: $M = 443.0782$.

(2R)-4-ацетил-10-{2-[(4-хлорфенил)сульфанил]ацетил}-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-163. Жёлтый аморфный порошок.



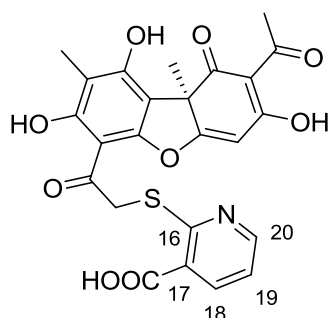
Выход 82%. Т.пл. 147-148 °С. $[\alpha]_D^{27} +365$ (*c* 0.34; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.72 (3H, с, Н-15), 2.06 (3H, с, Н-10), 2.63 (3H, с, Н-12), 4.17 (2H, дд, J = 14.5, J = 25.6, Н-14), 5.92 (1H, с, Н-4), 7.20 (2H, д, J = 8.4, Н-17, Н-17'), 7.28 (2H, д, J = 8.4, Н-18, Н-18'), 11.07 (1H, с, ОН-9), 12.74 (1H, с, ОН-7), 18.79 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.46 (C-10), 27.72 (C-12), 31.88 (C-15), 44.46 (C-14), 58.79 (C-9b), 98.47 (C-4), 99.75 (C-9a), 104.15 (C-6), 105.14 (C-2), 109.60 (C-8), 129.08 (C-18, C-18'), 132.19 (C-17, C-17'), 132.81 (C-19), 133.47 (C-16), 154.36 (C-5a), 157.97 (C-9), 164.19 (C-7), 178.63 (C-4a), 191.48 (C-13), 195.87 (C-3), 197.77 (C-1), 201.68 (C-11). Найдено: *m/z* 486.0529 [M]⁺ C₂₄H₁₉O₇SCl. Вычислено: M = 486.0535.

3-({2-[(1R)-12-ацетил-3,5,11-тригидрокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло [7.4.0.0^{2,7}]тридека-2,4,6,9,11-пентаен-6-ил]-2-оксоэтил}сульфанил)пропановая кислота



(+)-164. Жёлтый аморфный порошок. Выход 62%. Т.пл. 165-166 °С. $[\alpha]_D^{27} +413$ (*c* 0.34; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.72 (3H, с, Н-15), 2.06 (3H, с, Н-10), 2.62 (3H, с, Н-12), 2.67 (2H, т, J = 7, Н-17), 2.81 (2H, т, J = 7, Н-16), 3.80 (2H, дд, J = 14.1, J = 17.0, Н-14), 5.95 (1H, с, Н-4), 9.28 (1H, шс, COOH), 11.09 (1H, с, ОН-9), 12.92 (1H, с, ОН-7), 18.80 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.44 (C-10), 26.19 (C-16), 27.77 (C-12), 31.89 (C-15), 33.81 (C-17), 40.66 (C-14), 58.76 (C-9b), 98.36 (C-4), 99.37 (C-9a), 104.11 (C-6), 105.04 (C-2), 109.44 (C-8), 154.34 (C-5a), 157.71 (C-9), 164.28 (C-7), 177.50, 178.70 (C-4a, C-18), 191.46 (C-13), 196.50 (C-3), 197.76 (C-1), 201.67 (C-11). Найдено: *m/z* 448.0822 [M]⁺ C₂₁H₂₀O₉S. Вычислено: M = 448.0823.

2-({2-[(1R)-12-ацетил-3,5,11-тригидрокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло [7.4.0.0^{2,7}]тридека-2,4,6,9,11-пентаен-6-ил]-2-оксоэтил}сульфанил)пиридин-3-карбоновая кислота (+)-165. Жёлтый аморфный порошок.

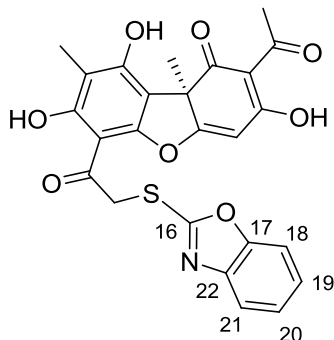


Выход 61%. Т.пл. 195-197 °С. $[\alpha]_D^{25} +307$ (*c* 0.23; ацетон). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.83 (3H, с, Н-15), 2.04 (3H, с, Н-10), 2.63 (3H, с, Н-12), 3.23 (1H, ш.с, COOH), 4.74 (2H, дд, J = 17.1, J = 45.7, Н-14), 6.17 (1H, с, Н-4), 7.18 (1H, дд, J = 7.7, J = 4.7, Н-19), 8.30 (1H, дд, J = 1.8, J = 7.7, Н-18), 8.43 (2H, дд, J = 1.8, J = 4.7, Н-20), 11.23 (1H, с, ОН-9), 13.05 (1H, с, ОН-7), 18.94 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 6.62 (C-10), 26.84 (C-12), 31.12 (C-15), 40.27 (C-14), 58.90 (C-

9b), 97.90 (C-4), 100.82 (C-9a), 104.49 (C-6), 105.09 (C-2), 108.00 (C-8), 118.58 (C-18), 122.67 (C-19), 138.87 (C-18), 151.49 (C-20), 155.04 (C-5a), 157.10 (C-9), 160.46 (C-7), 163.17 (C-16), 165.42 (C-17), 179.34 (C-4a), 191.83 (C-13), 197.12 (C-3), 198.35 (C-1), 201.74 (C-11). Найдено: m/z 497.0770 $[M]^+$ $C_{24}H_{19}NO_9S$. Вычислено: $M = 497.0775$.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(1,3-бензоксазол-2-илсульфанил)ацетил]-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-166.
Жёлтый аморфный порошок.

Выход 16%. Т.пл. 155-156 °С. $[\alpha]_D^{27} +217$ (c 0.32; $CHCl_3$).

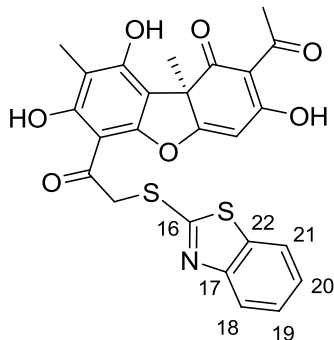


Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.80 (3H, с, H-15), 2.12 (3H, с, H-10), 2.68 (3H, с, H-12), 4.90 (2H, дд, $J = 17.3$, $J = 16.7$, H-14), 6.06 (1H, с, H-4), 7.27 (2H, м, H-аром.), 7.44 (1H, м, H-аром.), 7.57 (1H, м, H-аром.), 11.17 (1H, с, OH-9), 12.63 (1H, с, OH-7), 18.84 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.44 (C-10), 27.67 (C-12), 31.90 (C-15), 43.07 (C-14), 58.80 (C-9b), 98.84 (C-4), 100.09 (C-9a),

104.30 (C-6), 105.14 (C-2), 109.60 (C-8), 109.86, 118.42, 124.01, 124.27 (C-18, C-19, C-20, C-21), 141.55, 151.89 (C-17, C-22), 154.67 (C-5a), 158.23 (C-9), 163.41 (C-7), 163.68 (C-16), 178.50 (C-4a), 191.50 (C-13), 193.43 (C-3), 197.76 (C-1), 201.66 (C-11). Найдено: m/z 493.0830 $[M]^+$ $C_{25}H_{19}O_8NS$. Вычислено: $M = 493.0826$.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(1,3-бензотиазол-2-илсульфанил)ацетил]-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-167.
Жёлтый аморфный порошок.

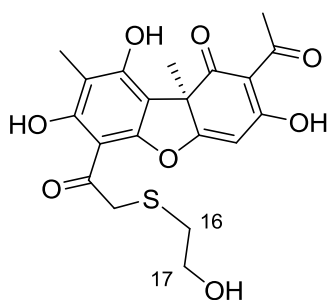
Выход 81%. Т.пл. 159-160 °С. $[\alpha]_D^{27} +207$ (c 0.32; $CHCl_3$).



Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.76 (3H, с, H-15), 2.08 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 4.91 (2H, дд, $J = 16.8$, $J = 19.0$, H-14), 5.98 (1H, с, H-4), 7.27 (1H, м, H-аром.), 7.37 (1H, м, H-аром.), 7.72 (1H, м, H-аром.), 7.80 (1H, м, H-аром.), 11.12 (1H, с, OH-9), 12.64 (1H, с, OH-7), 18.79 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.46 (C-10), 27.74 (C-12), 31.90 (C-15), 43.76 (C-14), 58.75 (C-9b), 98.66

(C-4), 100.07 (C-9a), 104.20 (C-6), 105.05 (C-2), 109.46 (C-8), 120.90, 121.38, 124.40, 126.00 (C-18, C-19, C-20, C-21), 135.17 (C-22), 152.48 (C-17), 154.57 (C-5a), 158.02 (C-9), 163.63 (C-7), 164.91 (C-16), 178.52 (C-4a), 191.46 (C-3), 193.87 (C-13), 197.69 (C-1), 201.64 (C-11). Найдено: m/z 509.0593 $[M]^+$ $C_{25}H_{19}O_7NS_2$. Вычислено: $M = 509.0598$.

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-10-{2-[(2-гидроксиэтил)сульфанил]ацетил}-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-168.
Жёлтый аморфный порошок.

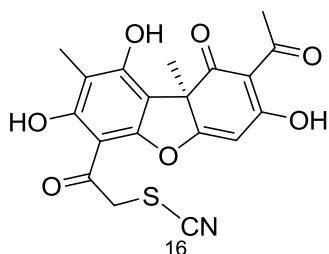


Выход 60%. Т.пл. 102-103 °С. $[\alpha]_D^{29} +339$ (*c* 0.26; CHCl₃).
 Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.72 (3H, с, Н-15), 2.05 (3H, с, Н-10), 2.36 (1H, OH), 2.62 (3H, с, Н-12), 2.75 (2H, т, J = 5.9, Н-16), 3.74 (2H, т, J = 5.9, Н-17), 3.82 (2H, д и д, J = 14.3, АВ-система, Н-14), 5.95 (1H, с, Н-4), 11.08 (1H, с, OH-9), 12.88 (1H, с, OH-7), 18.79 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.14 (C-10), 27.42 (C-12), 31.59 (C-15), 34.64 (C-16), 40.20 (C-14), 58.47 (C-9b), 60.18 (C-16), 98.12 (C-4), 99.19 (C-9a), 103.88 (C-6), 104.78 (C-2), 109.19 (C-8), 154.12 (C-5a), 157.54 (C-9), 163.96 (C-7), 178.38 (C-4a), 191.17 (C-13), 196.61 (C-3), 197.47 (C-1), 201.35 (C-11). Найдено: *m/z* 420.0880 [M]⁺ C₂₀H₂₀O₈S. Вычислено: M = 420.0873.

Синтез соединения 169.

К раствору 1 мМ соединения 157 в 5 мл ДМФА добавили 2 мМ роданида натрия. Перемешивали при комнатной температуре 3 часа. Добавили 10 мл дистиллированной воды. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой и сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(цианосульфанил)ацетил]-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-169. Жёлтый аморфный порошок.

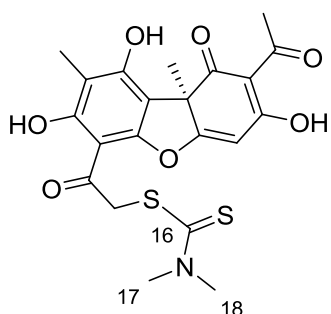


Выход 91.5%. Т.пл. 174-176 °С. $[\alpha]_D^{29} +298$ (*c* 0.23; CHCl₃).
 Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.73 (3H, с, Н-15), 2.06 (3H, с, Н-10), 2.64 (3H, с, Н-12), 4.61 (2H, д и д, J = 16.5, Н-14), 6.04 (1H, с, Н-4), 11.27 (1H, с, OH-9), 12.26 (1H, с, OH-7), 18.85 (1H, с, OH-3).
 ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.42 (C-10), 27.10 (C-12), 31.81 (C-15), 44.42 (C-14), 58.64 (C-9b), 99.22 (C-4), 99.32 (C-9a), 104.60 (C-6), 105.12 (C-2), 109.80 (C-8), 119.49 (C-16), 154.50 (C-5a), 158.98 (C-9), 163.57 (C-7), 177.90 (C-4a), 191.42 (C-13), 191.45 (C-3), 197.56 (C-1), 201.79 (C-11). Найдено: *m/z* 401.0572 [M]⁺ C₁₉H₁₅O₇NS. Вычислено: M = 401.0564.

Синтез соединения 170.

К раствору 1 мМ соединения 157 в 5 мл ДМФА добавили 1 мМ диметилдитиокарбамида натрия. Перемешивали при комнатной температуре 3 часа. Добавили 10 мл дистиллированной воды. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой и сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%.

(2R)-4-ацетил-10-{2-[(диметилкарбамотионил)сульфанил]ацетил}-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-170. Жёлтый аморфный порошок.

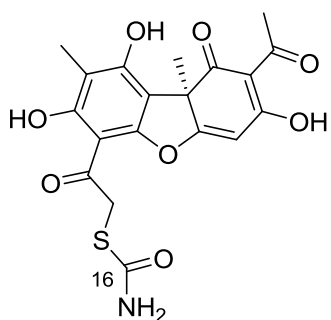


Выход 93%. Т.пл. 160-162 °С. $[\alpha]_D^{27} +207$ (с 0.32; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.77 (3H, с, Н-15), 2.09 (3H, с, Н-10), 2.65 (3H, с, Н-12), 3.54 и 3.46 (6H, с и с, Н-17 и Н-18), 4.92 (2H, с, Н-14), 6.02 (1H, с, Н-4), 11.11 (1H, с, ОН-9), 12.81 (1H, с, ОН-7), 18.84 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.37 (C-10), 27.67 (C-12), 31.88 (C-15), 41.52 и 45.62 (C-17 и C-18), 47.90 (C-14), 58.77 (C-9b), 98.45 (C-4), 100.85 (C-9a), 104.06 (C-6), 104.99 (C-2), 109.27 (C-8), 154.66 (C-5a), 157.69 (C-9), 163.45 (C-7), 178.79 (C-4a), 191.44 (C-3), 194.52 (C-13), 195.21 (C-16), 197.75 (C-1), 201.55 (C-11). Найдено: *m/z* 463.0752 [M]⁺ C₂₁H₂₁O₇NS₂. Вычислено: M = 463.0754.

Синтез соединения 171.

1 мМ соединения **169** растворили в 20 мл ледяной уксусной кислоты. Добавили 0.6 мл разбавленной H₂SO₄ (1:2 в воде). Перемешивали при комнатной температуре 4 часа. Добавили 50 мл дистиллированной воды. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой и сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент - градиент метилового спирта в хлористом метиле от 0 до 20%.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(карбамоилсульфанил)ацетил]-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-171. Жёлтые кристаллы.



Выход 37%. Т.пл. 162-164 °С. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.74 (3H, с, Н-15), 2.07 (3H, с, Н-10), 2.64 (3H, с, Н-12), 4.43 (2H, с, Н-14), 5.81 (2H, ш.с, NH₂), 6.00 (1H, с, Н-4), 11.12 (1H, с, ОН-9), 12.76 (1H, с, ОН-7), 18.82 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.47 (C-10), 27.76 (C-12), 31.92 (C-15), 40.80 (C-14), 58.82 (C-9b), 98.65 (C-4), 100.24 (C-9a), 104.21 (C-6), 105.12 (C-2), 109.49 (C-8), 154.70 (C-5a), 158.01 (C-9), 163.73 (C-7), 167.70 (C-16), 178.70 (C-4a), 194.92 (C-13), 191.55 (C-3), 197.82 (C-1), 201.71 (C-11).

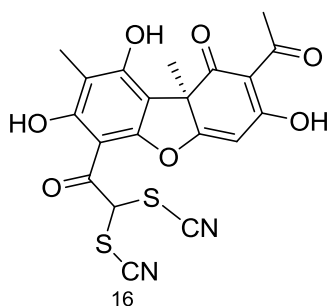
Рентгеноструктурный (РСА) эксперимент для соединения (+)-**171** выполнен на дифрактометре КАРРА АРЕХ II (Bruker) с двухкоординатным CCD детектором (MoK_α-излучение, графитовый монохроматор), где при 296 К методом ω-φ сканирования в пределах до 2θ < 50° было измерено 17294 отражений, из которых 3250 независимы (R_{int}=0.055). Для эксперимента был отобран кристаллический образец размером 0.60 × 0.50 × 0.05 мм.

Кристаллографические характеристики: ромбическая сингония, пространственная группа $P2_12_12$, $a = 17.095(15)$, $b = 9.342(11)$, $c = 12.072(12)$ Å, $V = 1928(3)$ Å³, $Z = 4$, $d_{\text{выч}} = 1.445$ г/см³. Поправки на поглощение введены с помощью программы SADABS (трансмиссия 0.83 – 0.97). Структуру расшифровали прямым методом по программе SHELXS-97. Уточнение параметров структуры провели методом наименьших квадратов в полноматричном анизотропном приближении по программе SHELXL-97. Параметры гидроксильных атомов H уточняли в изотропном приближении, параметры остальных атомов H рассчитывали в каждом цикле уточнения по координатам соответствующих атомов углерода. Окончательное уточнение структуры провели по всем F^2 до $wR_2 = 0.1122$, $S = 1.205$, 273 параметра, $R_1 = 0.0330$ для 2949 отражений с $I > 2\sigma(I)$.

Синтез соединения 172.

К раствору 1 мМ соединения **157** в 5 мл ДМФА добавили 4 мМ роданида натрия. Перемешивали при комнатной температуре 3 часа. Добавили 10 мл дистиллированной воды. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой и сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200µ), элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%.

(2R)-4-ацетил-10-[2,2-бис(цианосульфанил)ацетил]-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-172. Жёлтый аморфный порошок.



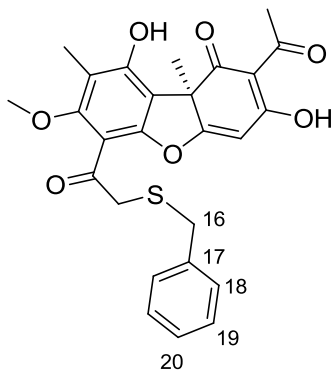
Выход 87.5%. Т.пл. 126 °С. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.78 (3H, с, H-15), 2.11 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 6.12 (1H, с, H-4), 6.28 (1H, с, H-14), 11.57 (1H, с, OH-9), 11.70 (1H, с, OH-7), 18.85 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.21 (C-10), 27.43 (C-12), 31.52 (C-15), 58.09 (C-9b), 61.33 (C-14), 96.52 (C-6), 99.71 (C-4), 104.88 (C-9a), 105.18 (C-2), 107.24 и 107.65 (2C-16), 110.40 (C-8), 153.39 (C-5a), 160.25 (C-9), 164.24 (C-7), 176.49 (C-4a), 186.28 (C-13), 190.97 (C-3), 197.01 (C-1), 201.68 (C-11). Найдено: осколочный ион (-S), m/z 426.0504 [M]⁺ C₂₀H₁₄O₇N₂S. Вычислено: M = 458.0237.

Синтез соединений 173-184.

В колбу помещали навеску 1.1 ммоль гидроксида калия, 6 мл метанола, 1.1 ммоль соответствующего тиола и перемешивали при комнатной температуре 10-15 минут. Затем к полученному раствору прибавляли раствор 1 ммоль соединения **118** в 2 мл хлористого метилена и перемешивали при комнатной температурте 2-3 часа до завершения реакции (контроль по ТСХ). Реакционную смесь промывали 2 раза дистиллированной водой, сушили

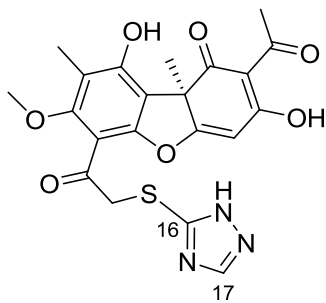
над $MgSO_4$, концентрировали и хроматографировали полученный остаток на силикагеле), элюент – хлористый метилен.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(бензилсульфанил)ацетил]-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-173. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 90%. $[\alpha]_D^{29} +292$ (с 0.29; $CHCl_3$). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.17 (3H, с, H-10), 2.64 (3H, с, H-12), 3.65 (2H, дд, J = 14.3, J = 16.5, H-17), 3.73 (3H, с, H-14), 3.76 (3H, с, OMe), 5.91 (1H, с, H-4), 7.21 (1H, м, H-21), 7.26-7.32 (4H, м, H-19, H-19', H-20, H-20'), 10.86 (1H, с, OH-9), 18.83 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 8.39 (C-10), 27.52 (C-12), 31.51 (C-15), 35.49 (C-16), 40.40 (C-14), 58.74 (C-9b), 62.04 (OMe), 97.66 (C-4), 104.73 (C-9a), 108.06 (C-6), 109.92 (C-2), 116.08 (C-8), 126.70 (C-20), 128.02 (C-18, C-18'), 128.77 (C-19, C-19'), 136.91 (C-17), 152.79 (C-5a), 154.77 (C-9), 159.02 (C-7), 179.39 (C-4a), 191.22 (C-13), 192.99 (C-3), 197.37 (C-1), 201.27 (C-11). Найдено: m/z 480.1242 $[M]^+$ $C_{26}H_{24}O_7S$. Вычислено: M = 480.1237.

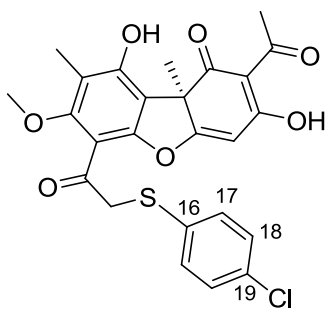
(2R)-4-ацетил-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-10-[2-(1H-1,2,4-триазол-5-сульфанил)ацетил]-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-174. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 67%. Т.пл. 151-153 °С. $[\alpha]_D^{29} +176$ (с 0.23; $CHCl_3$). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.66 (3H, с, H-15), 2.15 (3H, с, H-10), 2.62 (3H, с, H-12), 3.75 (3H, с, OMe), 4.52 (2H, дд, J = 16.8, J = 29.4, H-14), 5.97 (1H, с, H-4), 8.12 (1H, с, H-17), 9.74 (1H, ш.с., NH) 10.84 (1H, с, OH-9), 18.65 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 8.72 (C-10), 27.69 (C-12), 31.81 (C-15), 43.18 (C-14), 58.68 (C-9b), 62.16 (OMe), 98.21 (C-4), 104.73 (C-9a), 108.44 (C-6), 109.73 (C-2), 116.48 (C-8), 145.49 (C-5a), 153.25 (C-5a), 155.71 (C-9), 156.22 (C-16), 159.75 (C-7), 178.97 (C-4a), 191.31 (C-13), 192.87 (C-1), 197.39 (C-3), 201.58 (C-11). Найдено: m/z 457.0944 $[M]^+$ $C_{21}H_{19}N_3O_7S$. Вычислено: M = 457.0938.

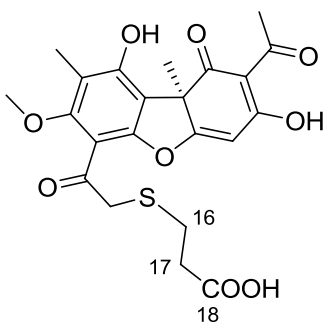
(2R)-4-ацетил-10-{2-[(4-хлорфенил)сульфанил]ацетил}-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-175. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.

Выход 66%. $[\alpha]_D^{27} +272$ (с 0.5; $CHCl_3$). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д.): 1.68 (3H, с, H-15), 2.12 (3H, с, H-10), 2.60 (3H, с, H-12), 3.68 (3H, с, OMe), 4.13 (2H, с, H-14), 5.82 (1H, с, H-



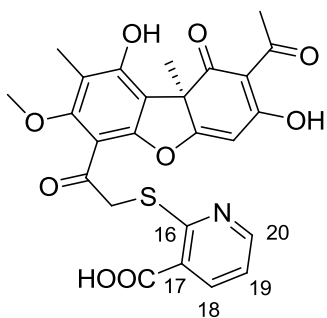
4), 7.14 (4H, м, H-17, H-17', H-18, H-18'), 10.80 (1H, с, OH-9), 18.76 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.56 (C-10), 27.69 (C-12), 31.63 (C-15), 45.20 (C-14), 58.85 (C-9b), 62.20 (OMe), 97.86 (C-4), 104.94 (C-9a), 108.22 (C-6), 109.90 (C-2), 116.31 (C-8), 128.71 (C-18, C-18'), 131.55 (C-17, C-17'), 132.76 (C-19), 133.20 (C-16), 152.80 (C-5a), 155.20 (C-9), 159.29 (C-7), 179.39 (C-4a), 191.41 (C-13), 192.64 (C-3), 197.52 (C-1), 201.49 (C-11). Найдено: m/z 500.0682 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{ClO}_7\text{S}$. Вычислено: $M = 500.0691$.

3-({2-[(1R)-12-ацетил-3,11-дигидрокси-5-метокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-2,4,6,9,11-пентаен-6-ил]-2-оксоэтил}сульфанил)пропановая кислота (+)-176. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 58%. $[\alpha]_D^{27} +296$ (c 0.32; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.15 (3H, с, H-10), 2.62 (3H, с, H-12), 2.65 (2H, т, J = 6.9, H-16), 2.79 (2H, т, J = 6.9, H-17), 3.75 (3H, с, OMe), 3.79 (2H, дд, J = 14.0, J = 23.0, H-14), 5.92 (1H, с, H-4), 7.95 (1H, ш.с., COOH), 7.32 (1H, м, H-аром.), 10.84 (1H, с, OH-9), 18.76 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.68 (C-10), 26.56 (C-16), 27.80 (C-12), 31.78 (C-15), 33.87 (C-17), 41.94 (C-14), 59.04 (C-9b), 62.36 (OMe), 98.05 (C-4), 105.06 (C-9a), 108.46 (C-6), 109.92 (C-2), 116.45 (C-8), 153.19 (C-5a), 155.23 (C-9), 159.37 (C-7), 177.06 (C-18), 179.67 (C-4a), 191.56 (C-13), 193.33 (C-3), 197.72 (C-1), 201.60 (C-11). Найдено: m/z 462.0978 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9\text{S}$. Вычислено: $M = 462.0979$.

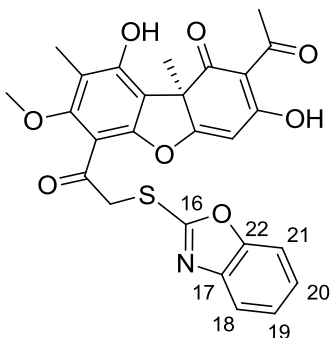
2-({2-[(1R)-12-ацетил-3,11-дигидрокси-5-метокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-2,4,6,9,11-пентаен-6-ил]-2-оксоэтил}сульфанил)пиридин-3-карбоновая кислота (+)-177. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 90%. Т.пл. 79-81 °С. $[\alpha]_D +222$ (c 0.26; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.71 (3H, с, H-15), 2.15 (3H, с, H-10), 2.60 (3H, с, H-12), 3.75 (3H, с, OMe), 4.41 (2H, с, H-14), 5.85 (1H, с, H-4), 7.03 (1H, дд, J = 4.7, J = 7.8, H-19), 8.23 (1H, дд, J = 1.7, J = 7.8, H-18), 8.34 (1H, дд, J = 1.7, J = 4.7, H-20), 10.76 (1H, с, OH-9), 10.91 (1H, ш.с, COOH), 18.74 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.61 (C-10), 27.72 (C-12), 31.73 (C-15), 41.89 (C-14), 59.02 (C-9b), 62.20 (OMe), 97.62 (C-4), 104.90 (C-9a), 108.24 (C-6), 111.26 (C-2), 116.09 (C-8), 118.51 (C-19), 121.74 (C-17), 139.64 (C-18), 151.83 (C-20), 152.50 (C-5a), 154.63 (C-9), 159.12 (C-7), 161.15 (C-16), 169.71 (C-21), 179.85

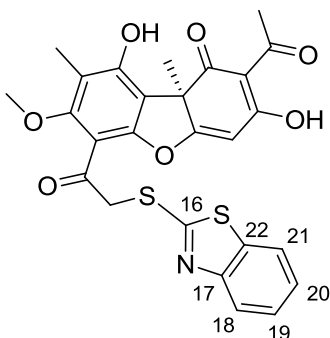
(C-4a), 191.45 (C-3), 197.61 (C-1), 201.45 (C-11). Найдено: m/z 511.0929 $[M]^+$ $C_{25}H_{21}NO_9S$.
Вычислено: $M = 511.0932$.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(1,3-бензоксазол-2-илсульфанил)ацетил]-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-178. Жёлтый аморфный порошок.



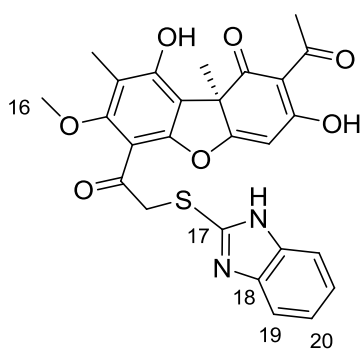
Выход 63%. Т.пл. 64-66 °С. $[\alpha]_D^{27} +190$ (c 0.36; $CHCl_3$).
Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.71 (3H, с, H-15), 2.18 (3H, с, H-10), 2.63 (3H, с, H-12), 3.80 (3H, с, OMe), 4.74 (2H, дд, $J = 17.0$, $J = 17.8$, H-14), 5.88 (1H, с, H-4), 7.22 (2H, м, H-аром.), 7.39 (1H, м, H-аром.), 7.49 (1H, м, H-аром.), 10.95 (1H, с, OH-9), 18.81 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 8.69 (C-10), 27.84 (C-12), 31.71 (C-15), 43.83 (C-14), 58.89 (C-9b), 62.35 (OMe), 98.14 (C-4), 104.96 (C-9a), 108.60 (C-6), 109.65 (C-2), 109.77 (C-21), 116.47 (C-8), 118.27 (C-18), 123.85 (C-20), 124.17 (C-19), 141.59 (C-17), 151.81 (C-22), 153.19 (C-5a), 155.77 (C-9), 159.66 (C-7), 163.60 (C-16), 179.50 (C-4a), 190.83 (C-13), 191.51 (C-3), 197.61 (C-1), 201.62 (C-11). Найдено: m/z 507.0979 $[M]^+$ $C_{26}H_{21}NO_8S$. Вычислено: $M = 507.0982$.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(1,3-бензотиазол-2-илсульфанил)ацетил]-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-179. Жёлтый аморфный порошок.



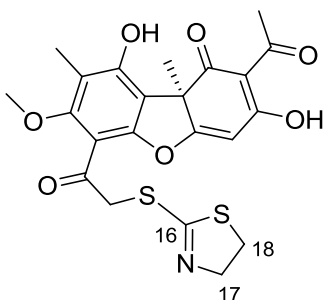
Выход 53%. Т.пл. 63-65 °С. $[\alpha]_D^{27} +279$ (c 0.39; $CHCl_3$).
Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д.): 1.68 (3H, с, H-15), 2.17 (3H, с, H-10), 2.62 (3H, с, H-12), 3.78 (3H, с, OMe), 4.73 (2H, с, H-14), 5.80 (1H, с, H-4), 7.23 (1H, м, H-аром.), 7.32 (1H, м, H-аром.), 7.69 (2H, м, H-аром.), 10.87 (1H, с, OH-9), 18.76 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 8.68 (C-10), 27.80 (C-12), 31.69 (C-15), 44.48 (C-14), 58.94 (C-9b), 62.34 (OMe), 98.02 (C-4), 104.98 (C-9a), 108.49 (C-6), 110.03 (C-2), 116.37 (C-8), 120.87, 121.33 (C-21, C-22), 124.25 (C-20), 125.85 (C-19), 135.40 (C-22), 152.67 (C-17), 153.06 (C-5a), 155.53 (C-9), 159.60 (C-7), 165.04 (C-16), 179.590 (C-4a), 191.38 (C-13), 191.50 (C-3), 197.64 (C-1), 201.56 (C-11). Найдено: m/z 523.0752 $[M]^+$ $C_{26}H_{21}NO_7S_2$. Вычислено: $M = 523.0754$.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(1H-1,3-бензодиазол-2-илсульфанил)ацетил]-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-180. Жёлтый аморфный порошок.



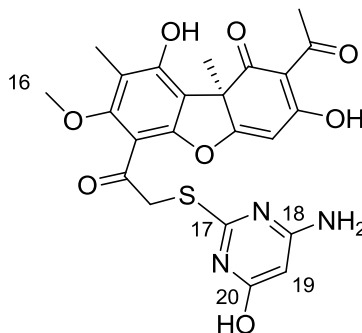
Выход 42%. Т.пл. 86-90 °С. $[\alpha]_D^{29} +120$ (с 0.27; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J (Hz)): 1.67 (3H, с, Н-15), 2.14 (3H, с, Н-10), 2.61 (3H, с, Н-12), 3.73 (3H, с, OMe), 4.55 (2H, 2д, J = 16.0, Н-14), 5.80 (1H, с, Н-4), 7.11 (2H, м, Н-20), 7.43 (2H, м, Н-19), 10.96 (1H, с, OH-9), 18.06 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.67 (C-10), 27.77 (C-12), 31.68 (C-15), 43.16 (C-14), 58.72 (C-9b), 62.36 (C-16), 98.19 (C-4), 104.93 (C-9a), 108.56 (C-6), 109.65 (C-2), 113.39 (2C-19), 116.58 (C-8), 122.21 (2C-20), 134.27 (2C-18), 149.57 (C-17), 153.81 (C-5a), 156.57 (C-9), 160.13 (C-7), 178.94 (C-4a), 190.27 (C-13), 191.35 (C-3), 197.47 (C-1), 201.57 (C-11). Найдено: m/z 506.1141 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$. Вычислено: $M = 506.1142$.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(4,5-дигидро-1,3-тиазол-2-илсульфанил)ацетил]-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-181. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 53%. $[\alpha]_D^{29} +129$ (с 0.21; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J (Hz)): 1.77 (3H, с, Н-15), 2.18 (3H, с, Н-10), 2.65 (3H, с, Н-12), 3.39 (2H, т, J = 8, Н-18), 3.77 (3H, с, OMe), 4.12 (2H, т, J = 8, Н-17), 4.52 (2H, дд, J = 16.7, J = 18.0, Н-14), 5.95 (1H, с, Н-4), 10.90 (1H, с, OH-9), 18.83 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.36 (C-10), 27.52 (C-12), 31.48 (C-15), 35.62 (C-18), 43.66 (C-14), 58.71 (C-9b), 61.99 (C-16), 63.45 (C-17), 97.70 (C-4), 104.72 (C-9a), 108.12 (C-6), 109.83 (C-2), 116.07 (C-8), 152.72 (C-5a), 155.10 (C-9), 159.26 (C-7), 179.42 (C-4a), 191.16 (C-13), 192.26 (C-3), 197.38 (C-1), 201.29 (C-11). Найдено: m/z 475.0758 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_7\text{S}_2$. Вычислено: $M = 475.0754$.

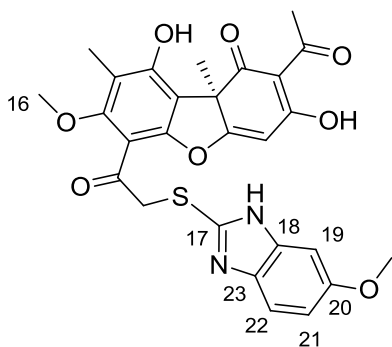
(2R)-4-ацетил-10-{2-[(4-амино-6-гидрокси-пиридин-2-ил)сульфанил]ацетил}-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-182. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 21%. Т.пл. 123-127 °С. $[\alpha]_D^{29} +198$ (с 0.21; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J (Hz)): 1.70 (3H, с, Н-15), 2.13 (3H, с, Н-10), 2.60 (3H, с, Н-12), 3.74 (3H, с, OMe), 4.31 (2H, Н-14), 4.87 (2H, NH_2), 5.10 (1H, Н-19), 5.88 (1H, с, Н-4), 10.83 (1H, с, OH-9), 12.92 (1H, OH), 18.71 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.63 (C-10), 27.73 (C-12), 31.75 (C-15), 41.58 (C-14), 58.95 (C-9b), 62.32 (C-16), 83.66 (C-19), 97.95 (C-4), 104.97 (C-9a),

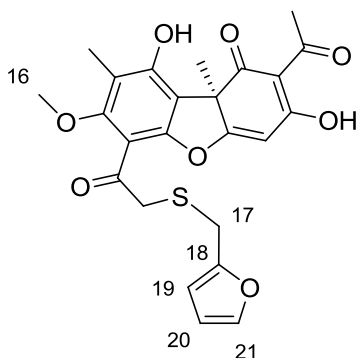
108.39 (C-6), 110.04 (C-2), 116.28 (C-8), 152.74 (C-5a), 155.17 (C-9), 159.09 (C-7), 160.32 (C-18), 162.37 (C-17), 165.75 (C-20), 179.49 (C-4a), 191.48 (C-13), 192.00 (C-3), 197.58 (C-1), 200.50 (C-11). Найдено: m/z 499.1047 $[M]^+$ C₂₃H₂₁N₃O₈S. Вычислено: M = 499.1044.

(2R)-4-ацетил-5,13-дигидрокси-11-метокси-10-{2-[(6-метокси-1H-1,3-бензодиазол-2-ил)сульфанил]ацетил}-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-183. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 56%. $[\alpha]_D^{29} +229$ (с 0.27; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J (Hz)): 1.64 (3H, с, H-15), 2.11 (3H, с, H-10), 2.59 (3H, с, H-12), 3.70 (3H, с, OMe), 3.73 (3H, с, OMe), 4.55 (2H, дд, J = 16.0, J = 18.0, H-14), 5.77 (1H, с, H-4), 6.70 (1H, м, H-аром.), 6.90 (1H, м, H-аром.), 7.29 (1H, м, H-аром.), 10.92 (1H, с, OH-9), 18.67 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 8.63 (C-10), 27.74 (C-12), 31.67 (C-15), 43.57 (C-14), 55.50 (C-24) 58.66 (C-9b), 62.29 (C-16), 95.80 (C-19), 98.11 (C-4), 104.90 (C-9a), 108.48 (C-6), 109.66 (C-2), 111.48 (C-21), 115.50 (C-22), 116.51 (C-8), 127.10 (C-23), 133.10 (C-18), 147.46 (C-17), 153.24 (C-5a), 155.89 (C-9), 156.04 (C-20), 159.73 (C-7), 179.07 (C-4a), 191.34 (C-13), 193.10 (C-3), 197.45 (C-1), 201.53 (C-11). Найдено: m/z 536.1245 $[M]^+$ C₂₇H₂₄N₂O₈S. Вычислено: M = 536.1248.

(2R)-4-ацетил-10-(2-[(фуран-2-ил)метил]сульфанил)ацетил-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-184. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



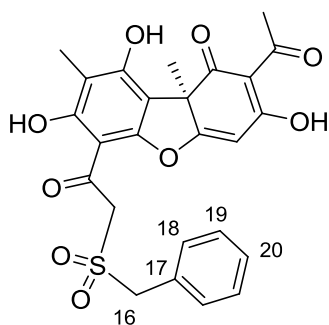
Выход 33%. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J (Hz)): 1.75 (3H, с, H-15), 2.15 (3H, с, H-10), 2.63 (3H, с, H-12), 3.75 (3H, с, OMe), 4.72 (2H, д и д, J = 15.0, H-14), 3.74 (2H, с, H-17), 5.91 (1H, с, H-4), 6.22 (1H, дд, J = 3.2 и 0.8, H-19), 6.27 (1H, дд, J = 3.2 и 1.9, H-20), 7.29 (1H, дд, J = 0.8 и 1.9, H-21), 10.84 (1H, с, OH-9), 18.81 (1H, с, OH-3). ¹³C ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 8.73 (C-10), 27.89 (C-12), 27.97 (C-17), 31.84 (C-15), 40.86 (C-14), 59.06 (C-9b), 62.37 (C-16), 98.02 (C-4), 105.05 (C-9a), 108.41 (C-6), 108.45 (C-19), 110.16 (C-2), 110.26 (C-20), 116.42 (C-8), 142.29 (C-21), 150.18 (C-18), 153.15 (C-5a), 155.14 (C-9), 159.37 (C-7), 179.75 (C-4a), 191.57 (C-13), 193.15 (C-3), 197.71 (C-1), 201.64 (C-11). Найдено: осколочный ион (-C₅H₄OS) m/z 358.1 $[M]^+$ C₁₉H₁₈O₇.

Общая методика синтеза соединений 185 и 186.

Навески 1 ммоль соединения **161** или **163** и 3 ммоль мета-хлорнадбензойной кислоты перемешивали в 15 мл хлористого метилена в течение 30 минут на ледяной бане. Затем

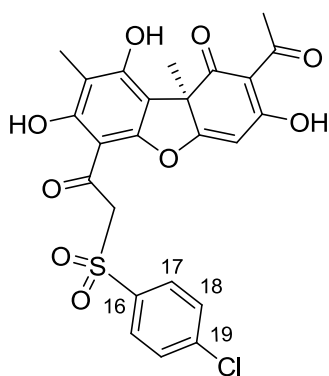
добавляли 7 мл насыщенного раствора Na_2SO_3 и перемешивали 2 часа при комнатной температуре до завершения реакции. Разбавляли водой в три раза и экстрагировали реакцию смесь хлористым метиленом ($\times 3$). Экстракт сушили над MgSO_4 , концентрировали и хроматографировали на SiO_2 (элюент $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 1\% \text{CH}_3\text{OH}$).

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-бензилсульфонилацетил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-185. Желтый аморфный порошок.



Выход 52%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.72 (3H, с, Н-15), 2.09 (3H, с, Н-10), 2.63 (3H, с, Н-12), 4.48 (2H, дд, J = 14, J = 16, Н-16), 4.54 (2H, дд, J = 15, J = 22, Н-14), 5.93 (1H, с, Н-4), 7.40 (3H, м, Н-аром.), 7.50 (2H, м, Н-аром.), 11.35 (1H, с, ОН-9), 12.73 (1H, с, ОН-7), 18.75 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.41 (C-10), 27.78 (C-12), 31.80 (C-15), 58.61 (C-9b), 59.92 (C-16), 60.35 (C-14), 98.95 (C-4), 101.74 (C-9a), 104.88 (C-6), 105.10 (C-2), 109.62 (C-8), 127.62 (C-17), 128.98 (C-19, C-19'), 129.16 (C-20), 130.98 (C-18, C-18'), 154.79 (C-5a), 159.30 (C-9), 164.33 (C-7), 177.92 (C-4a), 189.59 (C-13), 191.44 (C-3), 197.68 (C-1), 201.80 (C-11). Найдено: m/z 498.4998 [M]⁺ $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_9\text{S}$. Вычислено: M = 498.5001.

(2R)-4-ацетил-10-[2-(4-хлорфенилсульфонил)ацетил]-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-186. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 50%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.74 (3H, с, Н-15), 2.08 (3H, с, Н-10), 2.65 (3H, с, Н-12), 4.8 (2H, дд, J = 13.7, J = 25, Н-14), 6.02 (1H, с, Н-4), 7.50 (2H, м, Н-аром.), 7.78 (2H, м, Н-аром.), 11.35 (1H, с, ОН-9), 12.48 (1H, с, ОН-7), 18.85 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.44 (C-10), 27.73 (C-12), 31.89 (C-15), 46.13 (C-14), 58.79 (C-9b), 98.47 (C-4), 99.75 (C-9a), 104.15 (C-6), 105.14 (C-2), 109.60 (C-8), 129.08 (C-18, C-18'), 132.19 (C-17, C-17'), 132.81 (C-19), 135.75 (C-16), 154.37 (C-5a), 157.87 (C-9), 164.09 (C-7), 178.69 (C-4a), 191.48 (C-13), 195.87 (C-3), 197.77 (C-1), 201.68 (C-11). Найдено: m/z 518.9189 [M]⁺ $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{ClO}_9\text{S}$. Вычислено: M = 518.9195.

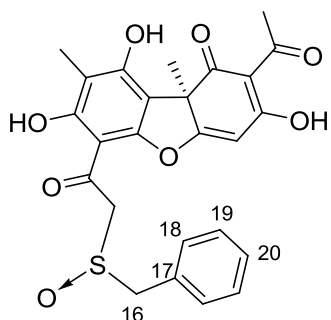
Общая методика синтеза соединений 187 и 188.

Навески 0.5 мг $\text{VO}(\text{AcAc})_2$ и 1 мг соответствующего лиганда растворяли в 5 мл хлористого метилена и перемешивали при комнатной температуре 10-15 минут. Затем добавляли 0.215 ммоль соответствующего сульфида (**161** или **163**) в 3 мл хлористого

метилена и 0.027 мл 30%-ной перекиси водорода, перемешивали 3-4 часа при комнатной температуре до завершения реакции. Разбавляли водой в три раза и экстрагировали реакцию смесь хлористым метиленом (×3). Экстракт сушили над MgSO₄, концентрировали и хроматографировали на SiO₂ (элюент CH₂Cl₂ + 1% CH₃OH).

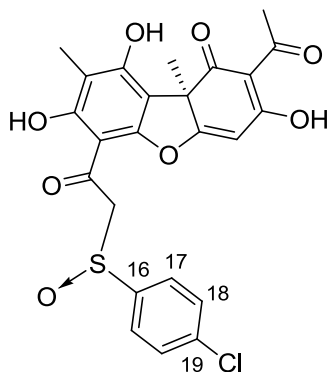
Приведены спектры преобладающего в смеси диастереомера. Соотношение диастереомеров в смеси высчитывалось по интегралам сигналов протона при C-4.

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-бензилсульфинилацетил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-187. Желтый аморфный порошок.



Выход 51%. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ d, м.д., J Гц): 1.73 (3H, с, H-15), 2.09 (3H, с, H-10), 2.62 (3H, с, H-12), 4.09 (2H, м, H-16), 4.25 (2H, м, H-14), 5.85 (1H, с, H-4), 7.35 (3H, м, H-аром.), 7.50 (2H, м, H-аром.), 11.36 (1H, с, OH-9), 12.73 (1H, с, OH-7), 18.75 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.40 (C-10), 27.78 (C-12), 31.80 (C-15), 57.95 (C-9b), 58.57 (C-16), 61.06 (C-14), 98.95 (C-4), 101.74 (C-9a), 104.88 (C-6), 105.10 (C-2), 109.62 (C-8), 127.62 (C-17), 128.98 (C-19, C-19'), 129.16 (C-20), 130.98 (C-18, C-18'), 154.78 (C-5a), 159.30 (C-9), 164.33 (C-7), 177.93 (C-4a), 189.59 (C-13), 191.44 (C-3), 197.68 (C-1), 201.80 (C-11).

(2R)-4-ацетил-10-[2-(4-хлорфенилсульфинил)ацетил]-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-188. Желтый аморфный порошок.

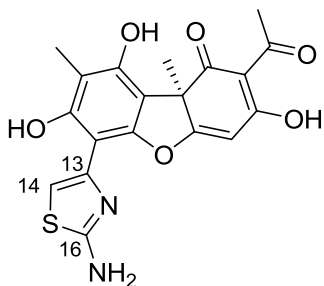


Выход 50%. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.74 (3H, с, H-15), 2.08 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 4.48 (2H, м, H-14), 5.96 (1H, с, H-4), 7.50 (2H, м, H-аром.), 7.78 (2H, м, H-аром.), 11.36 (1H, с, OH-9), 12.48 (1H, с, OH-7), 18.85 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.46 (C-10), 27.75 (C-12), 31.89 (C-15), 60.13 (C-14), 58.79 (C-9b), 98.47 (C-4), 99.75 (C-9a), 104.15 (C-6), 105.14 (C-2), 109.60 (C-8), 130.01 (C-18, C-18'), 133.17 (C-17, C-17'), 132.81 (C-19), 137.55 (C-16), 154.37 (C-5a), 157.87 (C-9), 164.09 (C-7), 178.68 (C-4a), 191.49 (C-13), 195.85 (C-3), 197.76 (C-1), 201.68 (C-11).

Синтез соединения 193.

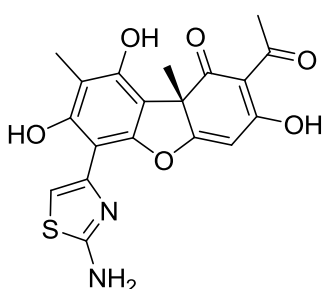
Навески 1 ммоль соединения **157** (423 мг) и 1.2 ммоль (91 мг) тиомочевины кипятили в 25 мл дистиллированной воды в течение 2.5 часов. Затем экстрагировали охлажденную реакцию смесь хлористым метиленом (×3). Экстракт сушили над MgSO₄, концентрировали и хроматографировали на SiO₂ (элюент CH₂Cl₂ + 5% CH₃OH).

(2R)-4-ацетил-10-(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-193. Оранжевые кристаллы из CH₂Cl₂.



Выход 52%, Т.пл. 220°C с разложением, $[\alpha]_D^{25} +131$ (*c* 0.17; CHCl₃). ИК спектр (KBr, ν , см⁻¹): 540, 831, 950, 1026, 1083, 1178, 1548, 1624, 1679, 3076, 3141, 3224, 3334, 3417. Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆, δ , ppm): 1.69 (3H, с, Н-15), 2.02 (3H, с, Н-10), 2.58 (3H, с, Н-12), 6.17 (1H, с, Н-4), 6.97 (1H, Н-14), 7.62 (2H, NH₂), 10.24 (1H, с, OH-9), 13.29 (1H, с, OH-7), 18.79 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (DMSO-d₆, δ , м.д.): 8.44 (C-10), 27.58 (C-12), 31.69 (C-15), 59.16 (C-9b), 97.14 (C-6), 97.32 (C-4), 102.01 (C-14), 103.29 (C-9a), 105.15 (C-2), 107.28 (C-8), 141.27 (C-13), 150.39 (C-9), 151.24 (C-7), 156.48 (C-5a), 167.88 (C-16), 180.61 (C-4a), 191.40 (C-3), 198.23 (C-1), 201.05 (C-11). Найдено: *m/z* 400.0723 [M]⁺ C₁₉H₁₆N₂O₆S, Вычислено: 400.0724. Элементный анализ: Найдено, %: С 56.53, Н 3.98, N 6.66, S 7.87. Вычислено, %: С 56.99, Н 4.03, N 7.00, S 8.01. C₁₉H₁₆N₂O₆S (400.07).

Рентгеноструктурный (РСА) эксперимент для соединения (+)-193 выполнен на дифрактометре KAPPA APEX II (Bruker) с двухкоординатным CCD детектором (MoK α -излучение, графитовый монохроматор), при 200 К ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Кристаллографические данные: C₁₉H₁₆N₂O₆S, *a* = 8.6448(6), *b* = 9.7116(8), *c* = 10.5934(9) Å, β = 101.032(3)°, *V* = 872.93(12) Å³, моноклинная сингония, пространственная группа *P*2₁, *Z* = 2, *d*_{calc} = 1.523 g·cm⁻³, μ = 0.228 mm⁻¹, $2\theta_{\max}$ = 60°, было измерено 37250 отражений, из которых 4885 независимы (*R*_{int} = 0.0372), *R* = 0.0319 (4543 *I* > 2σ(*I*)). Окончательное уточнение структуры провели по всем *F*² до *wR*₂ = 0.0975, *S* = 1.106. Параметр Флэка = -0.03(5). Структуру расшифровали прямым методом по программе SHELXS-97. Уточнение параметров структуры провели методом наименьших квадратов в полноматричном анизотропном приближении по программе SHELXL-97. Параметры атомов водорода OH и NH₂ групп уточняли в изотропном приближении, параметры остальных атомов Н рассчитывали в каждом цикле уточнения по координатам соответствующих атомов углерода. Полученные данные депонированы в Кембриджскую базу структурных данных (номер CCDC 976645) и могут быть бесплатно получены по адресу <http://www.ccdc.cam.ac.uk/cgi-bin/catreq.cgi>.



(2S)-4-ацетил-10-(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (-)-193.

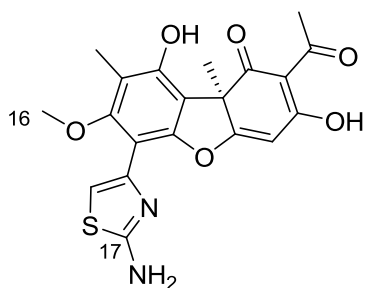
Выход 52%, Оранжевые кристаллы из CH₂Cl₂. Т.пл. 220°C с разложением. $[\alpha]_D^{25} -131$ (*c* 0.17; CHCl₃). $[\alpha]_D^{25} -128$ (*c* 0.15; CHCl₃).

Кристаллографические данные: $C_{19}H_{16}N_2O_6S$, $a = 8.6384(3)$, $b = 9.6989(4)$, $c = 10.5848(4)$ Å, $\beta = 101.096(2)^\circ$, $V = 870.25(6)$ Å³, моноклинная сингония, пространственная группа $P2_1$, $Z = 2$, $d_{\text{calc}} = 1.528$ g·cm⁻³, $\mu = 0.229$ mm⁻¹, $2\theta_{\text{max}} = 55^\circ$, было измерено 11844 отражений, из которых 3591 независимы ($R_{\text{int}} = 0.0186$), $R = 0.0282$ ($3379 I > 2\sigma(I)$), окончательное уточнение структуры провели по всем F^2 до $wR_2 = 0.0968$ и $S = 1.030$, параметр Флэка = -0.01(7), температура образца 200 К. CCDC 976646.

Синтез соединения 194

Смесь соединения **159** (1 мМ) и тиомочевины (1.1 мМ) кипятили с обратным холодильником в 25 мл EtOH течение 0.5-2 часа. Охлаждённую реакционную смесь выливали в воду (75 мл), экстрагировали трижды CH_2Cl_2 . Объединённый экстракт сушили над прокалённым $MgSO_4$, растворитель удаляли, остаток хроматографировали на SiO_2 (элюент $CH_2Cl_2 + 5\% CH_3OH$).

(2R)-4-ацетил-10-(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-194.

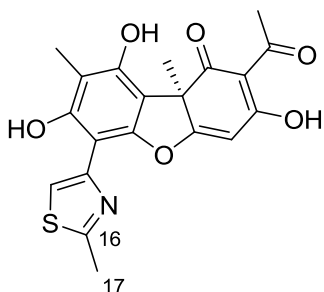


Выход 63%. Желтое смолообразное вещество. $[\alpha]_D^{26} +159$ (c 0.3; $CHCl_3$). Спектр ЯМР ¹H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.73 (3H, с, Н-15), 2.15 (3H, с, Н-10), 2.60 (3H, с, Н-12), 3.52 (3H, с, Н-16), 5.60 (2H, ш.с, NH₂), 5.85 (1H, с, Н-4), 6.70 (1H, Н-14), 10.42 (1H, с, ОН-9), 18.68 (1H, с, ОН-3). Спектр ЯМР ¹³C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 8.77 (C-10), 27.84 (C-12), 31.93 (C-15), 59.72 (C-9b), 60.46 (C-16), 97.27 (C-4), 104.96 (C-6), 106.20 (C-9a), 107.82 (C-2), 107.85 (C-14), 115.91 (C-8), 141.38 (C-13), 151.73 (C-9), 152.18 (C-7), 158.39 (C-5a), 166.70 (C-17), 180.72 (C-4a), 191.52 (C-3), 198.01 (C-1), 201.37 (C-11). Найдено: m/z 414.0882 $[M]^+$ $C_{20}H_{18}O_6N_2^{32}S_1$. Вычислено: $M = 414.0880$.

Общая методика для синтеза соединений 195-200.

Смесь соединения **157** (1 мМ) и соответствующего тиоацетамида или замещённой тиомочевины (1.1 мМ) кипятили с обратным холодильником в 25 мл EtOH течение 0.5-2 часа. Охлаждённую реакционную смесь выливали в воду (75 мл), экстрагировали трижды CH_2Cl_2 . Объединённый экстракт сушили над прокалённым $MgSO_4$, растворитель удаляли, остаток хроматографировали на SiO_2 (элюент $CH_2Cl_2 + 5\% CH_3OH$).

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-метил-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-195. Оранжевые кристаллы из CH_2Cl_2 .

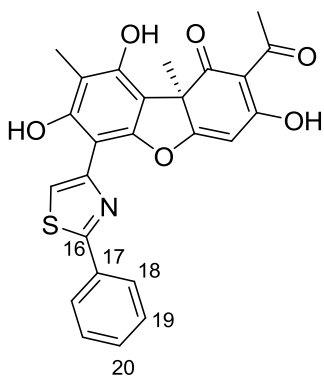


Выход 61%, Т.пл. 176-177°C. $[\alpha]_D^{26} +337$ (c 0.32; $CHCl_3$). Спектр ЯМР ¹H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.70 (3H, с, Н-15), 2.16 (3H, с, Н-10), 2.63 (3H, с, Н-12), 2.75 (3H, с, Н-17), 5.84 (1H, с, Н-4), 7.58

(1H, с, Н-14), 10.24 (1H, с, ОН-9), 12.71 (1H, ш.с, ОН-7), 18.78 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.21 (C-10), 18.64 (C-17), 27.73 (C-12), 32.08 (C-15), 59.37 (C-9b), 97.00 (C-6), 97.28 (C-4), 103.07 (C-9a), 105.10 (C-2), 109.00 (C-8), 113.31 (C-14), 147.78 (C-13), 151.39, 151.52 (C-9, C-7), 156.91 (C-5a), 164.34 (C-16), 180.42 (C-4a), 191.52 (C-3), 197.97 (C-1), 201.29 (C-11).
Найдено: m/z 399.0769 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{NS}$. Вычислено: $M = 399.0771$.

(2S)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-метил-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (-)-195. Оранжевые кристаллы из CH_2Cl_2 . Выход 60%. Т.пл. 176-177°C. $[\alpha]_D^{26}$ -299 (c 0.33; CHCl_3).

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-фенил-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-196. Оранжевые кристаллы из CH_2Cl_2 .

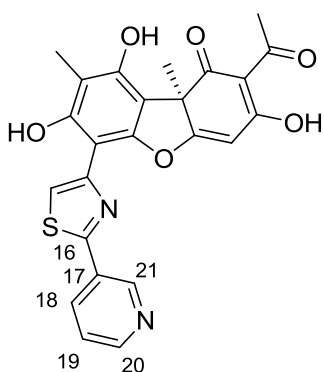


Выход 69%. Т.пл. 199-201°C. $[\alpha]_D^{26}$ +303 (c 0.34; CHCl_3)
Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.72 (3H, с, Н-15), 2.19 (3H, с, Н-10), 2.64 (3H, с, Н-12), 5.90 (1H, с, Н-4), 7.43 (3H, м, Н-Ph), 7.74 (1H, с, Н-14), 7.89 (2H, м, Н-Ph), 10.29 (1H, с, ОН-9), 12.71 (1H, ш.с, ОН-7), 18.79 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.22 (C-10), 27.71 (C-12), 32.07 (C-15), 59.36 (C-9b), 96.93 (C-6), 97.41 (C-4), 103.22 (C-9a), 105.12 (C-2), 109.03 (C-8), 113.86 (C-14), 126.24 (C-20), 128.99 (C-19, C-19'), 130.61 (C-18, C-18'), 131.72 (C-17), 148.99 (C-13), 151.54, 151.74 (C-9, C-7), 156.94 (C-5a), 166.23 (C-16), 180.32 (C-4a), 191.52 (C-3), 197.97 (C-1), 201.28 (C-11). Найдено: m/z 461.0926 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{NS}$. Вычислено: $M = 461.0928$.

Кристаллографические данные: $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{S}$, $a = 17.4433(6)$, $b = 18.6483(8)$, $c = 19.751(1)$ Å, $V = 6424.8(5)$ Å³, орторомбическая сингония, пространственная группа $P2_12_12_1$, $Z = 12$, $d_{\text{calc}} = 1.431$ g·cm⁻³, $\mu = 0.195$ mm⁻¹, $2\theta_{\text{max}} = 51^\circ$, было измерено 82926 отражений, из которых 12140 независимы ($R_{\text{int}} = 0.0866$), $R = 0.0446$ (9954 $I > 2\sigma(I)$), окончательное уточнение структуры провели по всем F^2 до $wR_2 = 0.1410$ и $S = 1.049$, параметр Флэка = -0.01(6), температура образца 296 К. CCDC 976647.

(2S)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-фенил-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (-)-196. Оранжевые кристаллы из CH_2Cl_2 . Выход 69%. Т.пл. 199-201°C. $[\alpha]_D^{26}$ -252 (c 0.37; CHCl_3).

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-(пиридин-3-ил)-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-197. Оранжевые кристаллы из CH_2Cl_2 .

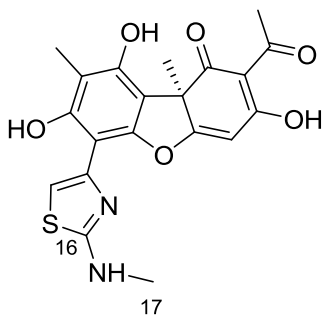


Выход 67%. Т.пл. 125°C. $[\alpha]_D^{26} +319$ (*c* 0.42 CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.70 (3H, с, Н-15), 2.14 (3H, с, Н-10), 2.62 (3H, с, Н-12), 5.87 (1H, с, Н-4), 7.37 (1H, м, Н-Рy), 7.79 (1H, с, Н-14), 8.13 (1H, м, Н-Рy), 8.64 (1H, м, Н-Рy), 9.07 (1H, м, Н-Рy), 10.28 (1H, с, ОН-9), 12.35 (1H, ш.с, ОН-7), 18.77 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 8.18 (C-10), 27.65 (C-12), 32.03 (C-15), 59.27 (C-9b), 96.55 (C-6), 97.49 (C-4), 103.34 (C-9a), 105.10 (C-2), 109.04 (C-8), 114.61 (C-14), 123.72 (C-19), 127.85 (C-17), 133.19 (C-18), 147.18 (C-20), 149.56 (C-13), 151.17 (C-21), 151.51, 151.95 (C-9, C-7), 156.75 (C-5a), 162.68 (C-16), 180.00 (C-4a), 191.46 (C-3), 197.86 (C-1), 201.25 (C-11). Найдено: *m/z* 462.0877 [M]⁺ C₂₄H₁₈O₆N₂S. Вычислено: M = 462.0880.

(2S)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-(пиридин-3-ил)-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (-)-197. Оранжевые кристаллы из CH₂Cl₂. Выход 60%., Т.пл. 125°C. $[\alpha]_D^{29} -255$ (*c* 0.27; CHCl₃).

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-метиламино-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-198. Оранжевые кристаллы из CH₂Cl₂.

Выход 59%. Т.пл. 120-122°C. $[\alpha]_D^{26} +323$ (*c* 0.26; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.69 (3H, с, Н-15), 2.13 (3H, с, Н-10), 2.62 (3H, с, Н-12),

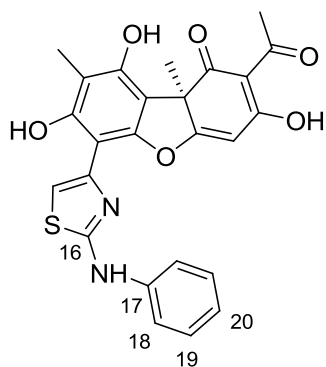


3.01 (3H, д, J = 5 Гц, Н-17), 5.28 (1H, кв, J = 5 Гц, N-H), 5.84 (1H, с, Н-4), 6.92 (1H, с, Н-14), 10.22 (1H, с, ОН-9), 13.82 (1H, ш.с, ОН-7), 18.76 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 8.21 (C-10), 27.75 (C-12), 31.88 (C-15), 32.09 (C-17), 59.38 (C-9b), 97.13 (C-4), 97.45 (C-6), 101.70 (C-14), 103.01 (C-9a), 105.08 (C-2), 108.74 (C-8), 143.56 (C-13), 151.14, 151.46 (C-7, C-9), 156.85 (C-5a), 168.48 (C-16), 180.66 (C-4a), 191.53 (C-3), 198.04 (C-1), 201.27 (C-11). Найдено: *m/z* 414.0878 [M]⁺ C₂₀H₁₈O₆N₂S. Вычислено: M = 414.0880.

(2S)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-метиламино-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (-)-198. Оранжевые кристаллы из CH₂Cl₂. Выход 69%. Т.пл. 120-122°C. $[\alpha]_D^{27} -277$ (*c* 0.48; CHCl₃).

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-фениламино-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-199. Оранжевые кристаллы из CH₂Cl₂.

Выход 43%. Т.пл. 124-125°C. $[\alpha]_D^{26} +137$ (*c* 0.31; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.71 (3H, с, Н-15), 2.15 (3H, с, Н-10), 2.63 (3H, с, Н-12), 5.87 (1H, с, Н-4), 7.05 (1H,

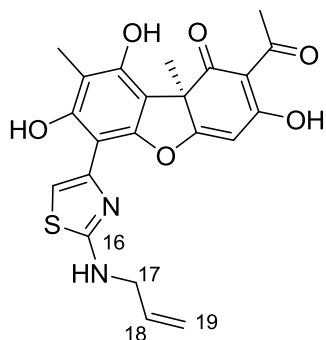


с, Н-14), 7.11 (1H, м, Н-Ph), 7.27 (2H, м, Н-Ph), 7.36 (2H, м, Н-Ph), 7.40 (1H, ш.с, N-H), 10.26 (1H, с, ОН-9), 12.37 (1H, ш.с, ОН-7), 18.78 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.27 (C-10), 27.74 (C-12), 32.08 (C-15), 59.37 (C-9b), 97.19 (C-6), 97.27 (C-4), 102.73 (C-14), 103.18 (C-9a), 105.11 (C-2), 108.94 (C-8), 118.68 (C-18, C-18'), 123.87 (C-20), 129.55 (C-19, C-19'), 139.19 (C-17), 143.30 (C-13), 151.37, 151.51 (C-7, C-9), 156.70 (C-5a), 163.42 (C-16), 180.56 (C-4a), 191.55 (C-3), 198.02 (C-1), 201.30 (C-11). Найдено: m/z 414.0878 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$. Вычислено: $M = 414.0880$.

(2S)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-(2-фениламино-1,3-тиазол-4-ил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (-)-199. Оранжевые кристаллы из CH_2Cl_2 . Выход 65%. Т.пл. 120-122°C. $[\alpha]_D^{29} -230$ (с 0.47; CHCl_3).

(2R)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-{2-[(проп-2-ен-1-ил)амино]-1,3-тиазол-4-ил}-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-200.

Оранжевые кристаллы из CH_2Cl_2 .



Выход 48%. Т.пл. 124-125°C. $[\alpha]_D^{26} +331$ (с 0.28; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.69 (3H, с, Н-15), 2.13 (3H, с, Н-10), 2.62 (3H, с, Н-12), 3.95 (2H, т, Н-17), 5.22 (1H, м, Н-19), 5.32 (1H, м, Н-19), 5.39 (1H, т, N-H) 5.84 (1H, с, Н-4), 5.91 (1H, м, Н-18), 6.93 (1H, с, Н-14), 10.22 (1H, с, ОН-9), 12.65 (1H, ш.с, ОН-7), 18.76 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.22 (C-10), 27.75 (C-12), 32.09 (C-15), 47.92 (C-17), 59.38 (C-9b), 97.15 (C-4), 97.42 (C-6), 101.92 (C-14), 103.02 (C-9a), 105.08 (C-2), 108.78 (C-8), 117.64 (C-19), 132.78 (C-18), 143.37 (C-13), 151.16, 151.44 (C-7, C-9), 156.81 (C-5a), 167.30 (C-16), 180.64 (C-4a), 191.53 (C-3), 198.04 (C-1), 201.27 (C-11). Найдено: m/z 440.1035 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$. Вычислено: $M = 440.1037$.

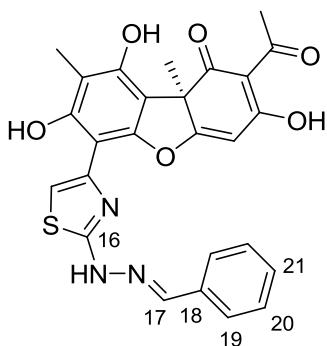
(2S)-4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-10-{2-[(проп-2-ен-1-ил)амино]-1,3-тиазол-4-ил}-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (-)-200. Оранжевые кристаллы из CH_2Cl_2 . Выход 56%. Т.пл. 120-122°C. $[\alpha]_D^{29} -308$ (с 0.54; CHCl_3).

Синтез соединений 201-209.

1 мМ соответствующего альдегида растворили в 2 мл этилового спирта. Полученный раствор медленно прикапывали при перемешивании к раствору 1 мМ тиосемикарбазида в 2 мл дистиллированной воды. Выпадает осадок. Осадок отфильтровали и промыли водой. Сушили на воздухе. Использовали без дальнейшей очистки. К 1 ммоль полученного тиосемикарбазида бензальдегида добавляли 1 ммоль соединения **157** и кипятили в 10 мл этилового спирта в течение 1 часа. Растворитель отогнали и реакционную смесь

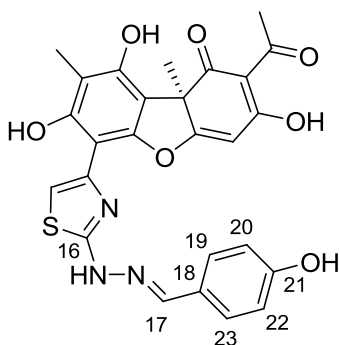
хроматографировали на SiO₂, элюент – хлороформ с градиентом метилового спирта от 0 до 20%.

(*R,E*)-2-ацетил-6-(2-(2-бензилиденгидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-201. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 82%. Т.пл. 169-171 °С. $[\alpha]_D^{25}$ -112 (*c* 0.6; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CHCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.66 (3H, с, Н-15), 2.17 (3H, с, Н-10), 2.63 (3H, с, Н-12), 5.84 (1H, с, Н-4), 7.09 (1H, Н-14), 7.28-7.50 (5H, м, Н-аром.), 9.03 (1H, ш с, NH), 10.26 (1H, с, OH-9), 12.55 (1H, с, OH-7), 18.75 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CHCl₃, δ, м.д.): 8.36 (C-10), 27.75 (C-12), 32.03 (C-15), 59.28 (C-9b), 97.20 (C-4), 97.57 (C-6), 103.36 (C-9a), 104.70 (C-14), 105.15 (C-2), 108.81 (C-8), 126.62 (2C, C-20, C-22), 128.52 (2C, C-19, C-23), 129.62 (C-21), 133.37 (C-18), 142.38 (C-17), 143.49 (C-13), 151.19 (C-9), 151.49 (C-7), 156.34 (C-5a), 166.30 (C-16), 180.51 (C-4a), 191.49 (C-3), 197.97 (C-1), 201.24 (C-11). Найдено: *m/z* 503.1141 [M]⁺ C₂₆H₂₁N₃O₆S₁. Вычислено: M = 503.1146.

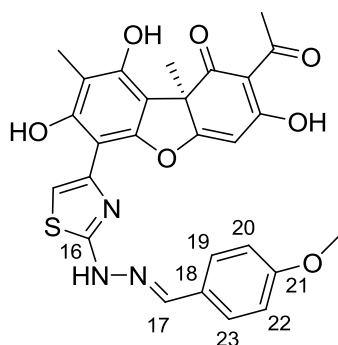
(*R,E*)-2-ацетил-6-(2-(2-(4-гидроксибензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-202. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 93%. Т.пл. 180-185 °С. $[\alpha]_D^{25}$ -115 (*c* 0.3; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CHCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.70 (3H, с, Н-15), 2.18 (3H, с, Н-10), 2.65 (3H, с, Н-12), 5.48 (1H, ш с, OH-21) 5.89 (1H, с, Н-4), 6.79 (2H, д, J 8.6, Н-20, Н-22) 7.12 (1H, с, Н-14), 7.45 (2H, д, J 8.6, Н-19, Н-23), 7.52 (1H, с, Н-17), 8.68 (1H, ш с, NH), 10.29 (1H, с, OH-9), 12.54 (1H, ш с, OH-7), 18.78 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CHCl₃, δ, м.д.): 8.34 (C-10), 27.80 (C-12), 32.10 (C-15), 59.38 (C-9b), 97.28 (C-4), 97.64 (C-6), 103.38 (C-9a), 104.60 (C-14), 105.21 (C-2), 108.91 (C-8), 115.67 (2C, C-19, C-23), 126.23 (C-18), 128.50 (2C, C-20, C-22), 142.36 (C-17), 143.53 (C-13), 151.20 (C-9), 151.53 (C-7), 156.45 (C-5a), 157.22 (C-21), 166.39 (C-16), 180.69 (C-4a), 191.61 (C-3), 198.08 (C-1), 201.34 (C-11). Найдено: *m/z* 519.1098 [M]⁺ C₂₆H₂₁N₃O₇S₁. Вычислено: M = 519.1095.

(*R,E*)-2-ацетил-6-(2-(2-(4-метоксибензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-203. Жёлтый аморфный порошок.

Выход 79%. Т.пл. 137-140 °С. $[\alpha]_D^{25}$ -113 (*c* 0.3; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.65 (3H, с, Н-15), 2.19 (3H, с, Н-10), 2.64 (3H, с, Н-12), 3.92 (3H, с, OMe), 5.82 (1H, с, Н-4), 6.79 (2H, д, J 8.7, Н-20, Н-22) 7.07 (1H, с, Н-14), 7.36 (1H, с, Н-17), 7.41 (2H, д, J 8.6, Н-19, Н-23), 8.72 (1H, ш с, NH), 10.25 (1H, ш с, OH-9), 12.54 (1H, с, OH-7), 18.77 (1H, с, OH-3).

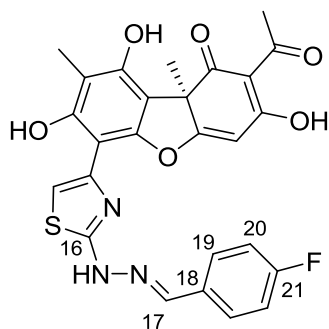


ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.42 (C-10), 27.76 (C-12), 32.13 (C-15), 55.16 (OMe-21), 59.27 (C-9b), 97.17 (C-4), 97.73 (C-6), 103.44 (C-9a), 104.42 (C-14), 105.16 (C-2), 108.84 (C-8), 114.00 (2C, C-20, C-22), 126.17 (C-18), 128.19 (2C, C-19, C-23), 142.32 (C-17), 143.49 (C-13), 151.17 (C-9), 151.53 (C-7), 156.45 (C-5a), 160.81 (C-21), 166.46 (C-16), 180.59 (C-4a), 191.58 (C-3), 197.97 (C-1), 201.35 (C-11). Найдено: m/z 533.1250 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_1$. Вычислено: $M =$

533.1251.

(*R,E*)-2-ацетил-6-(2-(2-(4-фторбензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-204. Жёлтый аморфный порошок.

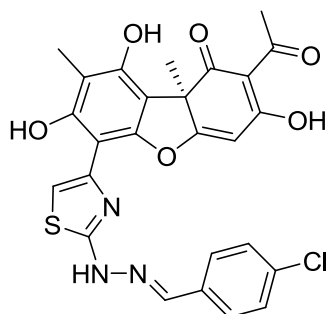
Выход 89%. Т.пл. 130-135 °С. $[\alpha]_D^{25}$ -132 (c 0.3; CHCl_3).



Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.65 (3H, с, H-15), 2.16 (3H, с, H-10), 2.64 (3H, с, H-12), 5.86 (1H, с, H-4), 6.96 (2H, м, H-20, H-22), 7.08 (1H, с, H-14), 7.47 (2H, м, H-19, H-23), 9.14 (1H, ш с, NH), 10.24 (1H, с, OH-9), 12.24 (1H, ш с, OH-7), 18.81 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.36 (C-10), 27.69 (C-12), 32.04 (C-15), 59.22 (C-9b), 97.27 (C-4), 97.57 (C-6), 103.45 (C-9a), 104.65 (C-14), 105.12 (C-2), 108.73 (C-8), 115.64 (2C, д, $J_{\text{C-F}}$ 22.1, C-20, C-22), 128.38 (2C, д, $J_{\text{C-F}}$ 8.4, C-19, C-23), 129.64 (д, $J_{\text{C-F}}$ 3.2, C-18), 141.25 (C-17), 143.33 (C-13), 151.21 (C-9), 151.50 (C-7), 156.26 (C-5a), 163.42 (д, $J_{\text{C-F}}$ 251.1, C-21), 166.28 (C-16), 180.43 (C-4a), 191.52 (C-3), 197.91 (C-1), 201.34 (C-11). Найдено: m/z 521.1044 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6\text{F}_1\text{S}_1$. Вычислено: $M = 521.1051$.

(*R,E*)-2-ацетил-6-(2-(2-(4-хлорбензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-205. Жёлтый аморфный порошок.

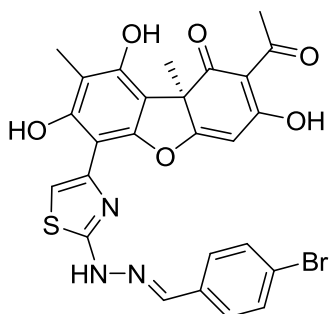
Выход 87%. Т.пл. 148-150 °С. $[\alpha]_D^{25}$ -141 (c 0.3; CHCl_3).



Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.62 (3H, с, H-15), 2.17 (3H, с, H-10), 2.64 (3H, с, H-12), 5.82 (1H, с, H-4), 7.06 (1H, с, H-14), 7.20 (2H, д, J 8.5, H-19, H-23), 7.29 (1H, с, H-17), 7.34 (2H, д, J 8.5, H-20, H-22) 9.02 (1H, ш с, NH), 10.28 (1H, с, OH-9), 12.53 (1H, ш с, OH-7), 18.80 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.45 (C-10), 27.77 (C-12), 32.11 (C-15), 59.20 (C-9b), 97.21 (C-4), 97.65 (C-6), 103.59 (C-9a), 104.79 (C-14), 105.23 (C-2), 108.75 (C-8), 127.69 (2C, C-20, C-22), 128.75 (2C, C-19, C-23), 131.89 (C-18), 135.41 (C-21), 140.97 (C-17), 143.38 (C-13), 151.20 (C-9), 151.54 (C-7), 156.23 (C-5a), 166.13 (C-16), 180.23

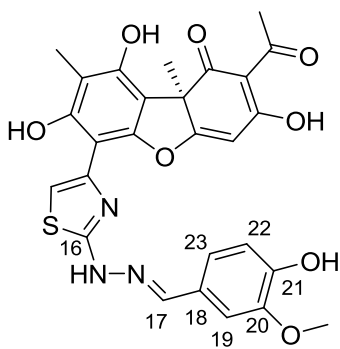
(C-4a), 191.58 (C-3), 197.95 (C-1), 201.38 (C-11). Найдено: m/z 537.0754 $[M]^+$ C₂₆H₂₀N₃O₆Cl₁S₁.
Вычислено: M = 537.0756.

(R,E)-2-ацетил-6-(2-(2-(4-бромбензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-206. Жёлтый аморфный порошок.



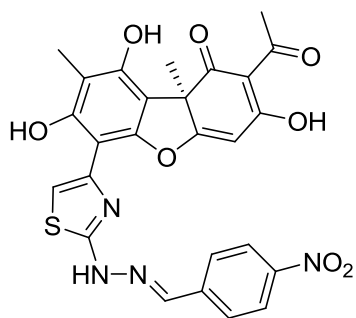
Выход 66%. Т.пл. 157 °С. $[\alpha]_D^{25}$ -104 (с 0.5; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.63 (3H, с, Н-15), 2.18 (3H, с, Н-10), 2.65 (3H, с, Н-12), 5.82 (1H, с, Н-4), 7.08 (1H, с, Н-14), 7.29 (2H, д, J 8.3, Н-19, Н-23), 7.30 (1H, с, Н-17), 7.37 (1H, д, J 8.3, 2H), 9.02 (1H, ш с, NH), 10.28 (1H, с, OH-9), 12.56 (1H, с, OH-7), 18.80 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 8.40 (C-10), 27.80 (C-12), 32.09 (C-15), 59.19 (C-9b), 97.19 (C-4), 97.63 (C-6), 103.57 (C-9a), 104.82 (C-14), 105.26 (C-2), 108.78 (C-8), 123.78 (C-21), 127.85 (2C, C-19, C-23), 131.70 (2C, C-20, C-22), 132.29 (C-18), 140.98 (C-17), 143.47 (C-13), 151.21 (C-9), 151.50 (C-7), 156.20 (C-5a), 166.06 (C-16), 180.18 (C-4a), 191.52 (C-3), 198.01 (C-1), 201.34 (C-11). Найдено: m/z 583.0219 $[M]^+$ C₂₆H₂₀N₃O₆⁸¹Br₁S₁. Вычислено: M = 581.0251.

(R,E)-2-ацетил-6-(2-(2-(4-гидрокси-3-метоксибензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-207. Жёлтый аморфный порошок.



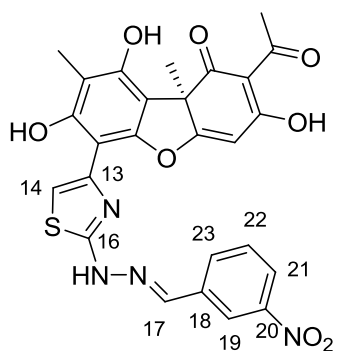
Выход 74%. Т.пл. 173-175 °С. $[\alpha]_D^{25}$ -106 (с 0.2; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.65 (3H, с, Н-15), 2.19 (3H, с, Н-10), 2.64 (3H, с, Н-12), 3.92 (3H, с, OMe-20), 5.76 (1H, ш с, OH-21), 5.83 (1H, с, Н-4), 6.79 (1H, д, J 8.1, Н-22), 6.89 (1H, дд, J 8.1, 1.8, Н-23), 7.05 (1H, д, J 1.8, Н-19), 7.06 (1H, с, Н-14), 7.29 (1H, с, Н-17), 8.74 (1H, ш с, NH), 10.28 (1H, с, OH-9), 12.56 (1H, ш с, OH-7), 18.78 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 8.06 (C-10), 27.44 (C-12), 31.78 (C-15), 55.47 (OMe-20), 58.88 (C-9b), 96.82 (C-4), 97.38 (C-6), 103.11 (C-9a), 103.97 (C-14), 104.78 (C-2), 107.04 (C-8), 113.98 (C-22), 121.26 (C-23), 125.62 (C-18), 142.21 (C-17), 143.15 (C-13), 146.29 (C-21), 147.03 (C-22), 150.80 (C-9), 151.17 (C-7), 156.01 (C-5a), 166.00 (C-16), 180.16 (C-4a), 191.16 (C-3), 197.53 (C-1), 201.10 (C-11). Найдено: m/z 549.1198 $[M]^+$ C₂₇H₂₃N₃O₈S₁. Вычислено: M = 549.1200.

(R,E)-2-ацетил-6-(2-(2-(4-нитробензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-208. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 65%. Т.пл. 178°C. Спектр ЯМР ^1H (DMSO- d_6 , δ , м.д., J Гц): 1.69 (3H, с, H-15), 2.05 (3H, с, H-10), 2.59 (3H, с, H-12), 6.21 (1H, с, H-4), 7.30 (1H, H-14), 7.84 (2H, д, 8.6 Hz, H-20), 8.08 (1H, с, H-17), 8.22 (2H, д, 8.6 Hz, H-19), 10.29 (1H, с, OH-9), 12.60 (1H, ш.с, OH-7), 12.73 (1H, NH), 18.847 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 8.79 (C-10), 27.97 (C-12), 32.05 (C-15), 59.42 (C-9b), 97.36 (C-6), 97.78 (C-4), 103.89 (C-9a), 105.36 (C-14), 105.51 (C-2), 107.71 (C-8), 124.36 (C-20 и C-22), 127.48 (C-19 и C-23), 140.54 (C-17), 140.64 (C-18), 143.33 (C-13), 147.57 (C-21), 150.91 (C-9), 151.63 (C-7), 156.42 (C-5a), 167.20 (C-16), 180.75 (C-4a), 191.73 (C-3), 198.46 (C-1), 201.45 (C-11). Найдено: m/z 548.0991 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_1$. Вычислено: $M = 548.0996$.

(*R,E*)-2-ацетил-6-(2-(2-(3-нитробензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-209. Жёлтый аморфный порошок.

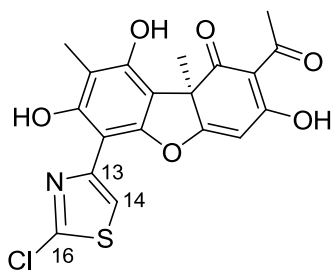


Выход 95%. Т.пл. 165°C. Спектр ЯМР ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ , м.д., J Гц): 1.66 (3H, с, H-15), 2.07 (3H, с, H-10), 2.57 (3H, с, H-12), 5.87 (1H, с, H-4), 7.08 (1H, с, H-14), 7.48 (1H, т, 7.7 Hz, H-22), 7.79 (1H, с, H-17), 7.88 (1H, д, 7.7 Hz, H-21), 8.04 (1H, д, 7.7 Hz, H-23), 8.32 (1H, с, H-19). ЯМР ^{13}C ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ , м.д.): 7.95 (C-10), 27.63 (C-12), 31.85 (C-15), 59.30 (C-9b), 97.18 (C-4), 97.45 (C-6), 103.21 (C-9a), 105.03 (C-14), 105.03 (C-2), 108.50 (C-8), 120.96 (C-19), 123.36 (C-21), 129.40 (C-22), 131.70 (C-23), 135.93 (C-18), 138.99 (C-17), 143.28 (C-13), 148.29 (C-20), 150.81 (C-9), 151.41 (C-7), 156.06 (C-5a), 166.57 (C-16), 180.45 (C-4a), 190.94 (C-3), 198.14 (C-1), 200.77 (C-11). Найдено: m/z 548.0995 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_1$. Вычислено: $M = 548.0996$.

Синтез соединения 210.

0,5 г соединения (+)-169 растворили в 60 мл ТГФ. Через раствор пропускали газообразный HCl в течение часа, в ходе реакции цвет реакционной смеси меняется с желтого на красный. После чего реакционную смесь разбавили водой, нейтрализовали водным раствором NaHCO_3 , водный раствор экстрагировали хлороформом. Экстракт упарили и хроматографировали на силикагеле. В качестве элюента использовался раствор метанола в сухом хлористом метиле (от 0% до 0.5%).

(*R*)-2-ацетил-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметил-6-(2-хлортиазол-4-ил)дибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (+)-210. Светло-жёлтый аморфный порошок.

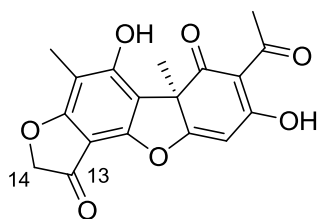


Выход 33%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.73 (3H, с, Н-15), 2.16 (3H, с, Н-10), 2.64 (3H, с, Н-12), 5.91 (1H, с, Н-4), 7.68 (1H, с, Н-14), 10.33 (1H, с, ОН-9), 11.44 (1H, с, ОН-7), 18.80 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.2 (C-10), 27.7 (C-12), 32.1 (C-15), 59.2 (C-9b), 96.3 (C-6), 97.6 (C-4), 103.4 (C-9a), 105.1 (C-2), 109.3 (C-8), 115.6 (C-14), 147.0 (C-5a), 150.1 (C-13), 150.8 (C-16), 152.0 (C-9), 156.4 (C-7), 180.0 (C-4a), 191.5 (C-3), 197.9 (C-1), 201.3 (C-11). Найдено: m/z 419.0225 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{NSCl}$. Вычислено: $M = 419.0235$.

Синтез соединения 142.

К раствору 1 ммоль соединения **157** в 25 мл ацетона добавили 1.5 ммоль ацетата калия и кипятили реакционную смесь в течение 2 часов. Затем разбавили водой (до ~50-60 мл), подкислили HCl (1:4) до $\text{pH} = 3-4$. Экстрагировали CH_2Cl_2 (3×10 мл), сушили над прокаленным MgSO_4 , удаляли растворитель и хроматографировали остаток на колонке с силикагелем, элюент – CH_2Cl_2 .

(10R)-12-ацетил-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-211. Светло-жёлтый аморфный порошок.



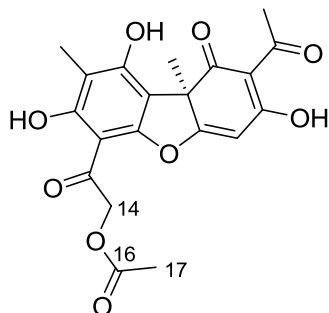
Выход 90%. Т.пл. 202-203 °С. $[\alpha]_{\text{D}} +397$ (c 0.5; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.73 (3H, с, Н-15), 2.13 (3H, с, Н-10), 2.64 (3H, с, Н-12), 4.66 (2H, с, Н-14), 6.02 (1H, с, Н-4), 11.27 (1H, с, ОН-9), 18.82 (1H, с, ОН-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 6.91 (C-10), 27.80 (C-12), 31.91 (C-15), 58.71 (C-9b), 75.70 (C-14), 99.01 (C-4), 100.61 (C-9a), 105.10 (C-6), 105.7 (C-2), 107.10 (C-8), 149.13 (C-5a), 159.80 (C-9), 173.81 (C-7), 179.61 (C-4a), 191.61 (C-3), 194.10 (C-13), 197.90 (C-1), 201.71 (C-11). Найдено: m/z 342.0736 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_7$. Вычислено: $M = 342.0734$.

(10S)-12-ацетил-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (-)-211. $[\alpha]_{\text{D}} -390$ (c 0.3; CHCl_3).

Синтез соединения 212.

К раствору 1 ммоль соединения **157** в 5 мл ацетона добавили 5 мл уксусной кислоты, 1.5 ммоль ацетата натрия и перемешивали реакционную смесь в течение 1 суток. Затем разбавили водой (до ~50-60 мл), подкислили HCl (1:4) до $\text{pH} = 3-4$. Экстрагировали CH_2Cl_2 (3×10 мл), сушили над прокаленным MgSO_4 , удаляли растворитель и хроматографировали остаток на колонке с силикагелем, элюент – CH_2Cl_2 .

2-[(1R)-12-ацетил-3,5,11-тригидрокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-2,4,6,9,11-пентаен-6-ил]-2-оксоэтил ацетат (+)-212.
Жёлтый аморфный порошок.



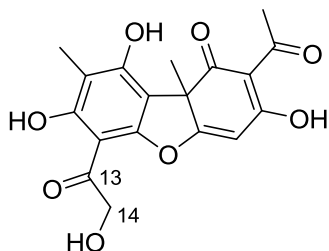
Выход 62%. Т.пл. 107-110 °С. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.76 (3H, с, H-15), 2.09 (3H, с, H-17), 2.24 (3H, с, H-10), 2.66 (3H, с, H-12), 5.26 (2H, дд, J = 17.3, J = 32.0, H-14), 5.99 (1H, с, H-4), 11.08 (1H, с, OH-9), 12.61 (1H, с, H-7), 18.84 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.39 (C-10), 20.37 (C-17), 27.69 (C-12), 31.89 (C-15), 58.79 (C-9b), 67.37 (C-14), 98.66 (C-9a), 98.75 (C-4), 104.00 (C-6), 105.13 (C-2), 109.58 (C-8), 154.55 (C-5a), 158.04 (C-9), 163.53 (C-7), 170.33 (C-16), 178.56 (C-4a), 191.52 (C-3), 194.09 (C-1), 197.73 (C-13), 201.67 (C-11). Найдено: *m/z* 402.0943 [M]⁺ C₂₀H₁₈O₉. Вычислено: M = 402.0945.

Синтез соединения 213.

1 мМ соединения (+)-212 растворили в 10 мл метилового спирта, поместили в ледяную баню (-4 °С). Добавляли по каплям 50%-ный раствор KOH (0.5 мл) при перемешивании. Через 1 час холодный раствор разбавили водой в 2 раза, добавляли разбавленную HCl до pH ~ 4. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой и сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200μ), элюент - градиент метилового спирта в хлористом метиле от 0 до 20%.

4-ацетил-5,11,13-тригидрокси-10-(2-гидроксиацетил)-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-213. Светло-жёлтый аморфный порошок.

Выход 82%. Т.пл. 158-160 °С. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.73 (3H, с, H-15), 2.10 (3H, с, H-10), 2.64 (3H, с, H-12), 3.51 (1H, т, J 4.8, OH), 4.78 (2H, д, J = 4.8, H-14), 5.98 (1H, с, H-4), 11.10 (1H, с, OH-9), 12.46 (1H, с, H-7), 18.82 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.36 (C-10), 27.69 (C-12), 31.87 (C-15), 58.67 (C-9b), 67.47 (C-14), 98.20 (C-9a), 98.78 (C-4), 104.24 (C-6), 105.06 (C-2), 109.43 (C-8), 154.87 (C-5a), 158.20 (C-9), 163.02 (C-7), 178.54 (C-4a), 191.49 (C-3), 197.67 (C-1), 199.38 (C-13), 201.68 (C-11). Найдено: *m/z* 360.0844 [M]⁺ C₁₈H₁₆O₈. Вычислено: M = 360.0840.



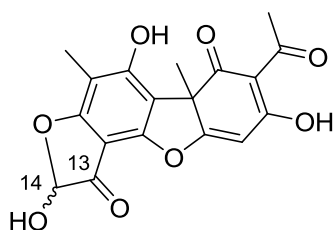
Синтез соединения 214.

а) К раствору 1 мМ соединения (+)-212 в 10 мл метилового спирта добавляли по каплям 50%-ный раствор KOH (1 мл) при перемешивании. Через 0.5 часа реакционную смесь разбавили водой в 2 раза, добавили разбавленную HCl до pH ~ 4. Выпавший осадок

отфильтровали, промыли водой и сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 20%.

б) К раствору 1 мМ соединения (+)-**158** в 10 мл метилового спирта добавляли 50%-ный раствор КОН (1 мл), реакцию кипятили 1 час. После чего реакцию смесь охладили, разбавили водой в 2 раза, добавили разбавленную HCl до pH ~ 4. Экстрагировали хлороформом (3 \times 30 мл), сушили над прокаленным MgSO₄, удаляли растворитель и хроматографировали остаток на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 20%.

12-ацетил-4,8,13-тригидрокси-7,10-диметил-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-214a,b. (соотношение **219a:219b** ~ 1:1 по данным ЯМР ¹H). Светло-жёлтый аморфный порошок.

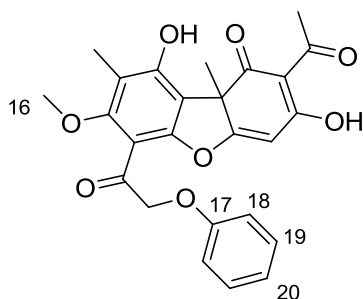


Выход 80%. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.69 и 1.72 (3H, с, H-15), 2.10 (3H, с, H-10), 2.64 (3H, с, H-12), 3.47 (1H, с, OH), 5.63 и 5.66 (1H, с, H-14), 5.97 и 6.01 (1H, с, H-4), 11.36 и 11.40 (1H, с, OH-9), 18.82 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 7.01 (C-10), 27.62 и 27.70 (C-12), 31.79 и 31.89 (C-15), 58.45 и 58.54 (C-9b), 97.95 и 98.10 (C-14), 98.42 и 98.48 (C-6), 99.08 и 99.12 (C-4), 104.94 и 104.97 (C-14), 105.50 (C-8), 107.06 и 107.29 (C-9a), 149.88 (C-5a), 161.10 и 161.16 (C-9), 170.52 и 170.71 (C-7), 179.03 и 179.30 (C-4a), 191.49 (C-3), 192.55 и 192.31 (C-13), 197.65 и 197.71 (C-1), 201.70 (C-11). Найдено: *m/z* 358.0684 [M]⁺ C₁₈H₁₄O₈. Вычислено: M = 358.0683.

Синтез соединения **215**.

К раствору 1 мМ соединения **159** и 1 мМ фенола в ацетонитриле добавили 5 мМ K₂CO₃. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 10 часов. Охлаждённую реакцию смесь разбавили дистиллированной водой, добавили разбавленную HCl до pH ~ 4. Экстрагировали хлороформом (3 \times 30 мл), сушили над прокаленным MgSO₄, удаляли растворитель и хроматографировали остаток на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 5%.

4-ацетил-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-10-(2-феноксиацетил)-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-215. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



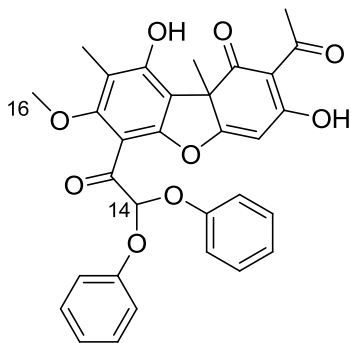
Выход 24%. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.72 (3H, с, H-15), 2.18 (3H, с, H-10), 2.63 (3H, с, H-12), 3.79 (3H, с, H-16), 5.06 (2H, д и д, АВ-система, J = 17, H-14), 5.86 (1H, с, H-4), 6.86 (2H, д, J = 8.3, 2H-18), 6.93 (1H, т, J = 7.5, H-20), 7.24 (2H, м, 2H-

19), 10.90 (1H, с, OH-9), 18.81 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.76 (C-10), 27.84 (C-12), 31.73 (C-15), 58.95 (C-9b), 62.42 (C-16), 73.35 (C-14), 98.06 (C-4), 105.00 (C-2), 108.50 (C-9a), 109.03 (C-8), 114.56 (2C-18), 116.32 (C-6), 121.32 (C-20), 129.35 (2C-19), 153.06 (C-5a), 155.57 (C-17), 157.90 (C-9), 159.65 (C-7), 179.57 (C-4a), 191.55 (C-3), 194.0 (C-13), 197.67 (C-1), 201.62 (C-11). Найдено: m/z 450.1306 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_8$. Вычислено: $M = 450.1309$.

Синтез соединения 216.

К раствору 1 мМ соединения **160** и 2 мМ фенола в ацетонитриле добавили 5 мМ K_2CO_3 . Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 10 часов. Охлаждённую реакцию смесь разбавили дистиллированной водой, добавили разбавленную HCl до $\text{pH} \sim 4$. Экстрагировали хлороформом (3×30 мл), сушили над прокаленным MgSO_4 , удаляли растворитель и хроматографировали остаток на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 5%. Выделяли соединения **215** и **216**.

4-ацетил-10-(2,2-дифеноксиацетил)-5,13-дигидрокси-11-метокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-216. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



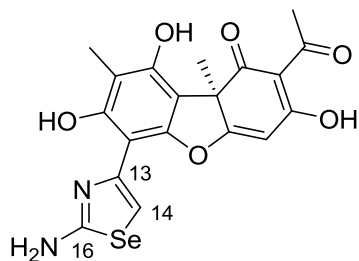
Выход 21%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.64 (3H, с, H-15), 2.18 (3H, с, H-10), 2.62 (3H, с, H-12), 3.75 (3H, с, H-16), 5.56 (1H, с, H-4), 6.55 (1H, с, H-14), 6.82 (1H, д, J = 8) и 6.97-7.02 (5H, м) и 7.20-7.25 (4H, м) – все аром., 10.92 (1H, с, OH-9), 18.79 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.68 (C-10), 27.70 (C-12), 31.55 (C-15), 58.83 (C-9b), 62.36 (C-16), 97.83 (C-4), 99.12 (C-14), 104.93 (C-2), 108.27 (C-8), 108.68 (C-9a), 116.34 (C-8), 115.14 (2C) и 116.97 (2C) и 117.18 (2C) и 129.35 (4C) – все аром CH, 153.29 (C-5a), 155.83 (C-9), 155.97 (1C) и 156.02 (1C) – аром C, 159.90 (C-7), 179.21 (C-4a), 190.21 (C-13), 191.45 (C-3), 197.58 (C-1), 201.53 (C-11). Найдено: m/z 542.1572 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{O}_9$. Вычислено: $M = 542.1571$.

Синтез соединения 217.

Смесь соединения **157** (1 мМ) и селеномочевины (1.1 мМ) кипятили с обратным холодильником в 25 мл EtOH в течение 0.5 часа. Охлаждённую реакцию смесь выливали в воду (75 мл), экстрагировали трижды CH_2Cl_2 . Объединённый экстракт сушили над прокалённым MgSO_4 , растворитель удаляли, остаток хроматографировали на SiO_2 (элюент $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 5\% \text{CH}_3\text{OH}$).

(2R)-4-ацетил-10-(2-амино-1,3-селеназол-4-ил)-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (+)-217. Жёлтые кристаллы.

Выход 57%, Т.пл. 165-167 $^\circ\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H (ацетон- d_6 , δ , м.д.): 1.77 (3H, с, H-15), 2.06 (3H, с, H-10), 2.62 (3H, с, H-12), 6.07 (1H, с, H-4), 7.33 (2H, ш.с, NH_2), 7.61 (1H, с, H-14),



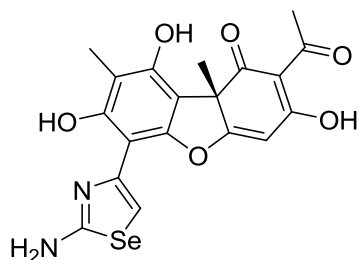
10.26 (1H, с, OH-9), 13.39 (1H, ш.с, OH-7), 18.92 (1H, ш.с, OH-3). ЯМР ^{13}C (ацетон- d_6 , δ , м.д.): 8.67 (C-10), 27.95 (C-12), 32.37 (C-15), 60.42 (C-9b), 97.85 (C-4), 99.59 (C-6), 103.99 (C-9a), 106.10 (C-2), 107.94 (C-14), 108.72 (C-8), 144.08 (C-13), 151.86 (C-9), 152.69 (C-7), 158.28 (C-5a), 171.12 (C-16), 182.06 (C-4a), 192.89 (C-3), 199.66 (C-1), 202.48 (C-11). Найдено: 448.0160 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{Se}$, Вычислено: $M = 448.0168$.

Рентгеноструктурное исследование монокристаллов (+)-217 и (-)-217 проведено на дифрактометре Bruker Карра APEX II (MoK α -излучение, графитовый монохроматор, CCD-детектор) при 296(2) К, максимальный угол 2θ 54°. Введена поправка на поглощение по программе SADABS. Структуру соединений расшифровали прямым методом по программе SHELXS-97 и уточнили в анизотропно-изотропном (для Н) приближении по программе SHELXL-97. Положения водородов были рассчитаны геометрически, параметры атомов Н уточняли в изотропном приближении в модели наездника, кроме водорода гидроксильной группы O2-Н цикла резонансно усиленной водородной связи в (+)-217.

Кристаллы (+)-217 и его энантиомера (-)-217 моноклинные, пространственная группа $P2_1$, Z 2, $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{SeF}_5$, $d_{\text{выч}}$ 1.662 г/см 3 , μ 2.14 мм $^{-1}$:

Соединение (+)-217 имеет следующие параметры ячейки a 8.7343(3), b 9.6634(3), c 10.8490(3) Å, β 102.567(1)°, V 893.75(5) Å 3 , размер образца 0.13×0.20×0.35 мм, трансмиссия 0.6235 – 0.7455. Измерены интенсивности 3861 независимых отражений. Окончательные параметры уточнения: wR_2 0.0677, S 1.165, число уточняемых параметров 263, ограничений 4, ($R = 0.0200$ для 3659 $F > 4\sigma$), параметр Флэка 0.009(6).

(2S)-4-ацетил-10-(2-амино-1,3-селеназол-4-ил)-5,11,13-тригидрокси-2,12-диметил-8-оксатрицикло[7.4.0.0 2 ,7]тридека-1(13),4,6,9,11-пентаен-3-он (-)-217. Жёлтые кристаллы.



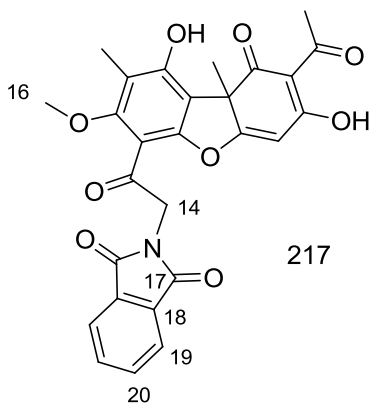
Параметры ячейки a 8.7426(6), b 9.6619(7), c 10.8492(8) Å, β 102.690(3)°, V 894.1(1) Å 3 , размер образца 0.03×0.21×0.30 мм, трансмиссия 0.4607 - 0.5627. Измерили интенсивности 3884 независимых отражений. Окончательные параметры уточнения: wR_2 0.2298, S 1.040, число уточняемых параметров 253 ($R = 0.0799$ для 2970 $F > 4\sigma$) параметр Флэка 0.06(2).

Синтез соединения 218.

1 мМ соединения 159 растворили в 15 мл ДМФА. Добавили 2 мМ фталимида калия. Перемешивали при комнатной температуре 2 часа. Реакционную смесь разбавили водой в 3 раза, добавили разбавленную HCl до pH ~ 4. Выпавший осадок отфильтровали, промыли

водой и сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 20%.

2-(2-{12-ацетил-3,5,11-тригидрокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-2,4,6,9,11-пентаен-6-ил}-2-оксоэтил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-дион (+)-218. Жёлтый аморфный порошок



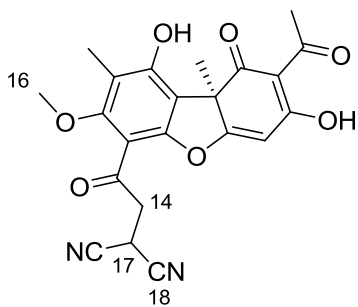
217

Выход 85%. ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, Н-15), 2.18 (3H, с, Н-10), 2.63 (3H, с, Н-12), 3.83 (3H, с, Н-16), 5.02 (2H, с, Н-14), 5.95 (1H, с, Н-4), 7.73 (2H, м) и 7.87 (2H, м) – H-аром., 11.03 (1H, с, ОН-9), 18.81 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 8.71 (C-10), 27.79 (C-12), 31.82 (C-15), 47.72 (C-14), 58.89 (C-9b), 62.34 (C-16), 98.28 (C-4), 105.01 (C-2), 108.64 (C-9a), 108.89 (C-8), 116.66 (C-6), 123.39 и 123.46 (2C-19), 132.12 и 132.50 (2C-18), 133.97 и 134.19 (2C-20), 153.97 (C-5a), 156.23 (C-9), 160.36 (C-7), 167.84 и 167.91 (2C-17), 179.61 (C-4a), 189.18 (C-13), 191.61 (C-3), 197.73 (C-1), 201.71 (C-11). Найдено: m/z 503.1212 [M]⁺ C₂₇H₂₁O₉N. Вычислено: M = 503.1211.

Синтез соединения 219.

2 мМ малонодинитрила растворили в 10 мл ДМСО, добавили 4 мМ гидроксида натрия и перемешивали смесь в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем добавили 1 мМ соединения 159 и перемешивали ещё 1 час. Реакционную смесь вылили в дистиллированную воду и добавляли разбавленную соляную кислоту до достижения pH реакционной смеси ~5. Осадок отфильтровывали, промывали водой для удаления ДМСО, сушили на воздухе. Соединение 219 выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%.

2-{2-[(1R)-12-ацетил-3,11-дигидрокси-5-метокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-2,4,6,9,11-пентаен-6-ил]-2-оксоэтил}пропандинитрил (+)-219. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.



Выход 67%. ИК спектр (ν , см⁻¹): 1025, 1095, 1168, 1191, 1268, 1303, 1369, 1411, 1457, 1544, 1600, 1614, 1679, 2228, 2258, 2927, 3087, 3369. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д.): 1.77 (3H, с, Н-15), 2.18 (3H, с, Н-10), 2.65 (3H, с, Н-12), 3.71-3.74 (2H, д и д, J = 6.8 и 6.8, Н-14), 3.79 (3H, с, Н-16), 4.45 (1H, т, J = 6.8, Н-17), 6.00 (1H, с, Н-4), 11.15 (1H, с, ОН-9), 18.84 (1H, с, ОН-3).

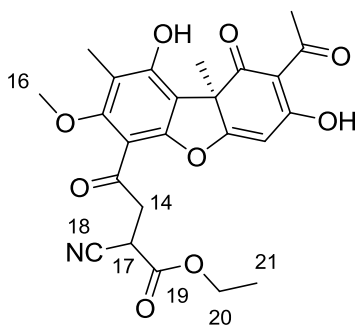
Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 8.64 (C-10), 17.65 (C-17), 27.71 (C-12), 31.65 (C-15), 43.60 (C-14), 58.57 (C-9b), 62.22 (C-16), 98.49 (C-4), 104.93 (C-2), 108.70 (C-9a), 108.93 (C-6), 112.44 (2C-18), 116.83 (C-8), 153.85 (C-5a), 156.78 (C-9), 160.13 (C-7), 178.91 (C-4a), 189.15 (C-13),

191.41 (C-3), 197.45 (C-1), 201.63 (C-11). Найдено: m/z 422.1106 $[M]^+$ C₂₂H₁₈O₇N₂.
Вычислено: M = 422.1109.

Синтез соединения 220a,b.

2 mM этилцианоацетата растворили в 10 мл ДМСО, добавили 4 mM гидроксида натрия и перемешивали смесь в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем добавили 1 mM соединения **159** и перемешивали ещё 1 час. Реакционную смесь вылили в дистиллированную воду и добавляли разбавленную соляную кислоту до достижения pH реакционной смеси ~5. Осадок отфильтровывали, промывали водой для удаления ДМСО, сушили на воздухе. Соединение **220a,b** выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%.

Этиловый эфир 4-[(1R)-12-ацетил-3,11-дигидрокси-5-метокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]тридека-2,4,6,9,11-пентаен-6-ил]-2-циано-4-оксобутановой кислоты (+)-220a,b. Вязкое аморфное вещество жёлтого цвета.

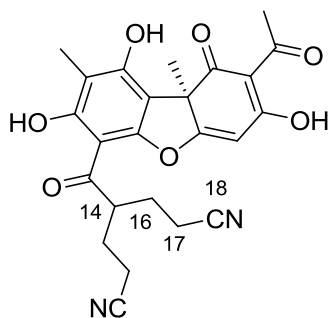


Выход 40%. ИК спектр (ν , см⁻¹): 1029, 1070, 1168, 1193, 1271, 1369, 1460, 1541, 1602, 1618, 1682, 1747, 2251, 2931, 2983, 3087, 3440. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д.): 1.32 (3H, т, J = 6.3 Гц, H-21), 1.74 (3H, с, H-15), 2.16 (3H, с, H-10), 2.62 (3H, с, H-12), 3.50-3.59 (1H, дд, J = 5.7 и 12.0, H-14), 3.65-3.71 (1H, дд, J = 7.0 и 16.0, H-14), 3.75 (3H, с, H-16), 4.08-4.12 (1H, м, J = 5.7 и 7.0, H-17), 4.28 (2H, кв, J = 6.3 Гц, H-20), 5.95 (1H, с, H-4), 11.00 (1H, с, OH-9), 18.81 (1H, с, OH-3). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 8.66 (C-10), 13.81 (C-21), 27.85 (C-12), 31.78 (C-15), 31.86 и 31.89 (C-17), 42.67 (C-14), 58.84 (C-9b), 62.32 (C-16), 63.06 (C-20), 98.28 (C-4), 104.99 и 105.01 (C-2), 108.73 и 108.74 (C-9a), 109.83 и 109.85 (C-6), 116.29 (C-18), 116.72 (C-8), 153.49 и 153.51 (C-5a), 156.02 и 156.04 (C-9), 159.95 и 159.97 (C-7), 165.36 (C-19), 179.42 и 179.46 (C-4a), 191.55 (C-3), 192.09 и 192.11 (C-13), 197.65 (C-1), 201.68 (C-11). Найдено: m/z 469.1365 $[M]^+$ C₂₄H₂₃O₉N. Вычислено: M = 469.1367.

Синтез соединения 221.

1 ммоль УК растворяли в 10 мл ДМФА, добавили 3 ммоль K₂CO₃ (прокалённый) и нагревали смесь при перемешивании до температуры 90 °C. Добавляли 10-кратный избыток акрилонитрила и перемешивали при нагревании ещё 1 час. В процессе реакции реакционная смесь темнеет. После охлаждения добавляли 10 мл дистиллированной воды и разбавленную соляную кислоту до достижения pH реакционной смеси ~5. Смолистый осадок отфильтровывали, промывали водой для удаления ДМФА, сушили на воздухе. Соединение **221** выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%.

4-[(1R)-12-ацетил-3,5,11-тригидрокси-1,4-диметил-13-оксо-8-оксатрицикло[7.4.0.0^{2,7}]гридека-2(7),3,5,9,11-пентаен-6-карбонил]гептандинитрил (+)-221. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 88%. Т.пл. 134-136 °С. $[\alpha]_D +67$ (с 0.2; CHCl_3). ИК спектр (ν , cm^{-1}): 848, 1070, 1190, 1294, 1454, 1535, 1628, 1682, 2247, 2925, 3084, 3425. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 1.76 (3H, с, H-15), 1.87 (2H, м, H-16), 2.08 (3H, с, H-10), 2.17 (2H, м, H-16), 2.36 и 2.43 (4H, 2м, H-17), 2.63 (3H, с, H-12), 4.07 (1H, м, H-14), 6.19 (1H, с, H-4), 11.35 (1H, с, OH-9), 13.24 (1H, с, OH-7), 18.79 (1H, с, OH-3). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.5 (C-10), 14.9 (2C-17), 27.1 и 27.4 (2C-16), 27.9 (C-12), 31.9 (C-15), 46.0 (C-14), 58.6 (C-9b), 99.3 (C-4), 101.3 (C-6), 104.8 (C-9a), 105.1 (C-2), 109.7 (C-8), 118.5 и 118.6 (2C-18), 154.7 (C-5a), 158.7 (C-9), 164.5 (C-7), 178.2 (C-4a), 191.5 (C-3), 197.9 (C-1), 201.9 (C-11), 202.4 (C-13). Найдено: m/z 450.1419 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{N}_2$. Вычислено: $M = 450.1422$.

Синтез соединения 222

Вариант 1

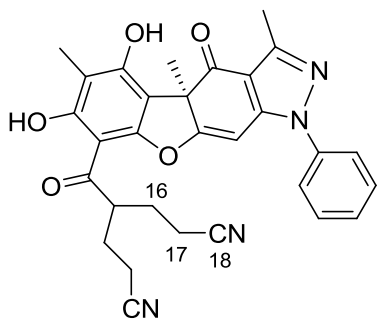
1 ммоль соединения (+)-**35** растворяли в 10 мл ДМФА, добавили 3 ммоль K_2CO_3 (прокалённый) и нагревали смесь при перемешивании до температуры 90 °С. Добавляли 10-кратный избыток акрилонитрила и перемешивали при нагревании ещё 1 час. В процессе реакции реакционная смесь темнеет. После охлаждения добавляли 10 мл дистиллированной воды и разбавленную соляную кислоту до достижения рН реакционной смеси ~5. Смолистый осадок отфильтровывали, промывали водой для удаления ДМФА, сушили на воздухе. Соединение **222** выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%. Выход 30%.

вариант 2

1.1 ммоль фенилгидразина солянокислого перед проведением реакции кипятили в 10 мл спирта на водяной бане 5 мин с добавлением эквимолярного количества триэтиламина до полного растворения реагента. К кипящему раствору добавляли взвесь 1 ммоль соединения **221** в 5 мл этилового спирта. Кипятили на водяной бане 2 ч. Охлаждали, добавляли 30 мл дистиллированной воды. Выпадал осадок светложёлтого цвета. Осадок отфильтровывали, промывали горячей водой, сушили на воздухе. Соединение **222** выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%. Выход 70.5%.

4-[(1R)-3,5-дигидрокси-1,4,14-триметил-16-оксо-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2(7),3,5,9,11(15),13-гексаен-6-

карбонил]гептандинитрил (+)-222. Жёлтый аморфный порошок.



Т.пл. 103-105 °С. $[\alpha]_D +409$ (*c* 0.2; CHCl₃). ИК спектр (ν , см⁻¹): 817, 1066, 1182, 1276, 1381, 1446, 1510, 1624, 1674, 2247, 2927, 3082, 3431. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д.): 1.84 (3H, с, Н-15), 1.86 (2H, м, Н-16), 2.13 (3H, с, Н-10), 2.21 (2H, м, Н-16), 2.32 и 2.47 (4H, 2м, Н-17), 2.59 (3H, с, Н-12), 4.12 (1H, м, Н-14), 6.53 (1H, с, Н-4), 7.45-7.60 (5H, м, Н-аром), 11.47 (1H, с, ОН-9), 13.29 (1H, с, ОН-7). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.):

7.4 (C-10), 13.2 (C-12), 14.9 (2C-17), 27.1 и 27.4 (2C-16), 30.2 (C-15), 45.9 (C-14), 59.9 (C-9b), 90.5 (C-4), 101.3 (C-6), 104.8 (C-9a), 108.8 (C-2), 110.6 (C-8), 118.6 и 118.7 (2C-18), 123.7 (2C) и 128.7 (1C) и 129.6 (2C) и 137.6 (1C) – все аром), 147.9 (C-11), 151.4 (C-3), 155.7 (C-5a), 159.0 (C-9), 164.2 (C-7), 171.8 (C-4a), 196.0 (C-1), 202.2 (C-13). Найдено: m/z 522.1886 [M]⁺ C₃₀H₂₆O₅N₄. Вычислено: M = 522.1898.

Синтез соединения 223

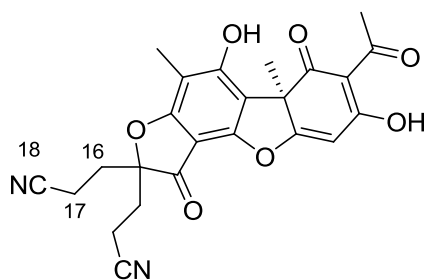
вариант 1

Смесь 1 ммоль соединения **211**, нескольких кристалликов триэтилбензил аммоний хлорида (ТЭБАХ), 30 ммоль акрилонитрила и 1.5 мл 30% КОН в 15 мл диоксана перемешивали при комнатной температуре атмосфере аригона в течение 24 ч, затем реакционную смесь выливали на смесь льда с соляной кислотой. Осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной среды, высушивали на воздухе, затем промывали хлороформом и фильтрат упаривали. Полученный продукт хроматографировали на силикагеле, элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%. Выход 30%.

вариант 2

1 ммоль соединения **211** растворяли в 10 мл ДМФА, добавляли 3 ммоль K₂CO₃ (прокалённый) и нагревали смесь при перемешивании до температуры 40 °С. Добавляли 10-кратный избыток акрилонитрила и перемешивали при нагревании ещё 1 час. В процессе реакции реакционная смесь темнеет. После охлаждения добавляли 10 мл дистиллированной воды и разбавленную соляную кислоту до достижения рН реакционной смеси ~5. Смолистый осадок отфильтровывали, промывали водой для удаления ДМФА, сушили на воздухе. Соединение **223** выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюент - градиент метилового спирта в хлороформе от 0 до 2%. Выход 91%.

3-[(10R)-12-ацетил-4-(2-цианоэтил)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-3,11-диоксо-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]]гексадека-1(9),2(6),7,12,14-пентаен-4-ил]пропаннитрил (+)-223. Жёлтый аморфный порошок.

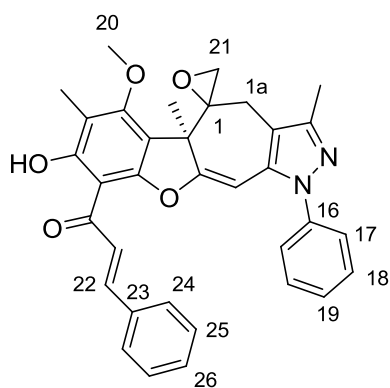


Выход 91%. Т.пл. 104-106 °С. $[\alpha]_D^{25} +228$ (с 0.2; CHCl_3).
 ИК спектр (ν , cm^{-1}): 958, 1070, 1101, 1182, 1460, 1543, 1628, 1691, 2251, 2927, 3086, 3435. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 1.75 (3H, с, H-15), 2.17 (3H, с, H-10), 2.24 -2.38 (8H, м, H-16 и H-17), 2.64 (3H, с, H-12), 6.03 (1H, с, H-4), 11.51 (1H, с, OH-9), 18.84 (1H, с, OH-3). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.2 (C-10), 11.5 (2C-17), 27.8 (C-12), 31.2 и 31.3 (2C-16), 31.8 (C-15), 58.6 (C-9b), 89.9 (C-14), 99.5 (C-4), 99.8 (C-6), 105.1 (C-9a), 106.1 (C-2), 108.2 (C-8), 117.8 и 117.9 (2C-18), 149.4 (C-5a), 161.4 (C-9), 170.9 (C-7), 179.1 (C-4a), 191.6 (C-3), 194.4 (C-13), 197.7 (C-1), 201.9 (C-11). Найдено: m/z 448.1264 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{N}_2$. Вычислено: $M = 448.1265$.

Синтез соединений 224 и 225

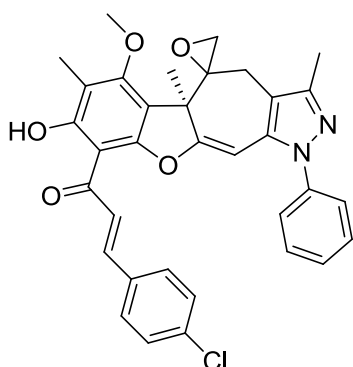
К раствору соединения **122** (1 ммоль) и соответствующего бензальдегида (4 ммоль) в 16 мл CH_3OH приливают 2 мл 50% водного раствора KOH. Смесь нагревают при 70 °С в течение 2,5-3 часов. Конверсию субстрата осуществляют по ТСХ, элюент гексан – диэтиловый эфир. Реакционную смесь выливают в холодную воду (100 мл), подкисляют 10% уксусной кислотой до pH ~5. Экстрагируют трижды CH_2Cl_2 (30 мл), сушат над прокаленным MgSO_4 , удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – CH_2Cl_2 - CH_3OH (до 0,5%).

(E)-1-((5aS)-8-гидрокси-6-метокси-3,5a,7-триметил-1-фенил-4,5a-дигидро-1H-спиро[бензофуоро[3',2':5,6]циклогепта[1,2-с]пирозол-5,2'-оксиран]-9-ил)-3-фенилпроп-2-ен-1-он (+)-224. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 21%. Т.пл. 125-127 °С. $[\alpha]_D^{30} +130$ (с 0.2; CHCl_3).
 Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 1.76 (3H, с, H-15), 2.15 (3H, с, H-10), 2.19 (1H, дд, $^2J = 4.7$, $J_{21, 1a} = 2.0$, H-21 α), 2.25 (3H, с, H-12), 2.38 (1H, д, $^2J = 17.0$, H-4 β), 2.46 (1H, д, $^2J = 4.7$, H-12 β), 3.68 (1H, дд, $^2J = 17.0$, $J_{1a, 21} = 2.0$, H-1a α), 3.95 (3H, с, OCH₃), 6.19 (1H, с, H-4), 7.28-7.59 (10H, м, H-17, H-18, H-19, H-24, H-25, H-26), 7.85 (1H, д, $J = 15.5$, H-14), 7.93 (1H, д, $J = 15.5$, H-22), 13.90 (1H, с, C-7-OH). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ м.д.) 9.53 (C-10), 11.33 (C-12), 17.69 (C-15), 29.88 (C-1a), 50.57 (C-21), 51.69 (C-9b), 57.92 (C-1), 61.41 (C-20), 91.72 (C-4), 102.94 (C-6), 111.14 (C-3), 111.16 (C-9a), 112.77 (C-8), 124.73 (2C-17), 124.99 (C-14), 127.09 (C-19), 128.20 (2C-24), 128.47 (2C-25), 128.65 (2C-18), 130.20 (C-26), 132.90 (C-2), 134.55 (C-23), 139.02 (C-16), 143.96 (C-22), 147.67 (C-11), 155.59 (C-5a), 162.98 (C-9), 163.21 (C-9a), 164.55 (C-7), 190.80 (C-13). Найдено: m/z 546.2150 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{N}_2$. Вычислено: $M = 546.2141$.

(E)-3-(4-хлорфенил)-1-((5aS)-8-гидрокси-6-метокси-3,5a,7-триметил-1-фенил-4,5a-дигидро-1H-спиро[бензофуоро[3',2':5,6]циклогепта[1,2-с]пиразол-5,2'-оксиран]-9-ил)проп-2-ен-1-он (+)-225. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 31%. Т.пл. 110-113 °С. $[\alpha]_D^{30} +147$ (с 0.2; CHCl_3).

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 1.76 (3H, с, Н-15), 2.14 (3H, с, Н-10), 2.19 (1H, дд, $^2J = 4.7$, $J_{21, 1a} = 2.0$, Н-21 α), 2.25 (3H, с, Н-12), 2.41 (1H, д, $^2J = 17.0$, Н-4 β), 2.46 (1H, д, $^2J = 4.7$, Н-12 β), 3.68 (1H, дд, $^2J = 17.0$, $J_{1a, 21} = 2.0$, Н-1a α), 3.95 (3H, с, OCH_3), 6.15 (1H, с, Н-4), 7.22-7.52 (9H, м, Н-17, Н-18, Н-19, Н-24, Н-25), 7.77 (1H, д, $J = 15.6$, Н-14), 7.87 (1H, д, $J = 15.6$, Н-22), 13.82 (1H, с, С-7-ОН).

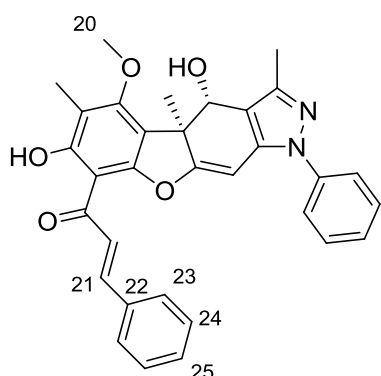
ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.83 (С-10), 11.60 (С-12), 17.97 (С-15),

30.15 (С-1a), 50.86 (С-21), 52.00 (С-9b), 58.21 (С-1), 61.72 (С-20), 92.05 (С-4), 103.17 (С-6), 111.47 (С-3), 111.52 (С-9a), 113.13 (С-8), 125.07 (2С-17), 125.77 (С-14), 127.52 (С-19), 128.99 (2С-18), 129.06 (2С-25), 129.60 (2С-24), 133.16 (С-2), 133.35 (С-23), 136.35 (С-26), 139.27 (С-16), 142.67 (С-22), 147.99 (С-11), 155.85 (С-5a), 163.41 (С-9), 163.50 (С-9a), 164.85 (С-7), 190.82 (С-13). Найдено: m/z 580.1765 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}_2\text{Cl}$. Вычислено: $M = 580.1760$.

Синтез соединений 226-

К раствору соединения **126** (1 ммоль) и соответствующего бензальдегида (4 ммоль) в 16 мл CH_3OH приливают 2 мл 50% водного раствора КОН. Смесь нагревают при 70 °С (в случае *m*-нитробензальдегида 20°C) в течение 2,5-3 часов. Конверсию субстрата осуществляют по ТСХ, элюент гексан – диэтиловый эфир. Реакционную смесь выливают в холодную воду (100 мл), подкисляют 10% уксусной кислотой до pH ~5. Экстрагируют трижды CH_2Cl_2 (30 мл), сушат над прокаленным MgSO_4 , удаляют растворитель и хроматографируют на колонке с силикагелем (60-200 μ), элюент – CH_2Cl_2 - CH_3OH (до 0,5%).

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4a,6-триметил-1-фенил-4,4a-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-фенилпроп-2-ен-1-он (+)-226. Оранжевый аморфный порошок.



Выход 77%. Т.пл. 120-122 °С. $[\alpha]_D^{20} +38$ (с 0.2; CHCl_3).

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 1.52 (3H, с, Н-15), 2.18 (3H, с, Н-10), 2.46 (3H, с, Н-12), 3.97 (3H, с, OCH_3), 4.04 (1H, с, С-1-ОН), 5.44 (1H, с, Н-1), 6.01 (1H, с, Н-4), 7.31-7.63 (10H, м, Н-аром), 7.93 (2H, с, Н-14, Н-21), 13.91 (1H, с, С-7-ОН). ЯМР ^{13}C

(CDCl_3 , δ , м.д.): 9.44 (С-10), 12.83 (С-12), 18.13 (С-15), 52.25 (С-9b), 61.86 (С-20), 74.49 (С-1), 90.20 (С-4), 104.63 (С-6), 112.40

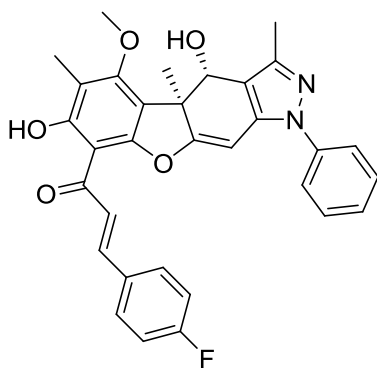
(С-2), 112.72 (С-9a), 115.16 (С-8), 123.14 (2С-17), 124.82 (С-14), 126.89 (С-19), 128.73 (2С-18),

128.92 (2C-23), 129.21 (2C-24), 130.72 (C-25), 134.71 (C-22), 136.32 (C-16), 139.24 (C-3), 145.30 (C-21), 147.89 (C-11), 157.32 (C-5a), 159.75 (C-9), 164.48 (C-7), 167.01 (C-4a), 191.26 (C-13). Найдено: m/z 520.1995 $[M]^+$ C₃₂H₂₈O₅N₂. Вычислено: M = 520.1993.

(E)-1-((4R,4aS)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-фенилпроп-2-ен-1-он (-)-226. Т.пл. 121-122 °С. $[\alpha]_D^{20}$ -41 (*c* 0.2; CHCl₃).

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(4-фторфенил)проп-2-ен-1-он (+)-227. Оранжевый аморфный порошок.

Выход 77%. Т.пл. 103-105 °С. $[\alpha]_D^{20}$ +57 (*c* 0.2; CHCl₃).

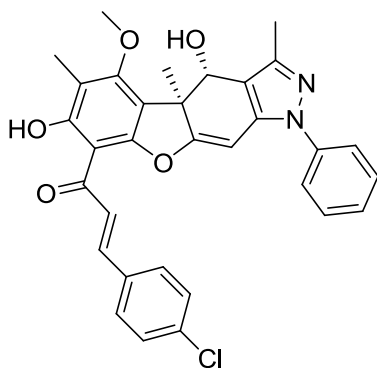


Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.51 (3H, с, H(15)), 2.16 (3H, с, H(10)), 2.46 (3H, с, H(12)), 3.96 (3H, с, OCH₃), 4.03 (1H, с, C(1)-OH), 5.43 (1H, с, H(1)), 5.99 (1H, с, H(4)), 7.09 (2H, м, H(24)), 7.28-7.55 (5H, м, H-аром), 7.61 (2H, м, H(23)), 7.83 (1H, д, *J*=15.5, H(14)), 7.90 (1H, д, *J*=15.5, H(21)), 14.05 (1H, с, C(7)-OH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 9.42 (C(10)), 12.81 (C(12)), 18.12 (C(15)), 52.25 (C(9b)), 61.88 (C(20)), 74.52 (C(1)), 90.24 (C(4)),

104.57 (C(6)), 112.47 (C(2)), 112.78 (C(9a)), 115.25 (C(8)), 116.15 (д, *J*_{CF} = 21.9, C(24)), 123.18 (2C(17)), 124.51 (C(14)), 126.94 (C(19)), 129.22 (2C(18)), 130.67 (д, *J*_{CF} = 8.2, C(23)), 130.98 (д, *J*_{CF} = 3.3, C(22)), 136.27 (C(16)), 139.24 (C(3)), 143.95 (C(21)), 147.90 (C(11)), 157.27 (C(5a)), 159.80 (C(9)), 164.11 (д, *J*_{CF} = 250.7, C(25)), 164.49 (C(7)), 166.96 (C(4a)), 191.05 (C(13)). Найдено: m/z 538.1899 $[M]^+$ C₃₂H₂₇O₅N₂F. Вычислено: M = 538.1890.

(E)-1-((4R,4aS)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(4-фторфенил)проп-2-ен-1-он (-)-227. Т.пл. 102-103 °С. $[\alpha]_D^{27}$ -75 (*c* 0.2; CHCl₃).

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(4-хлорфенил)проп-2-ен-1-он (+)-228. Оранжевый аморфный порошок.



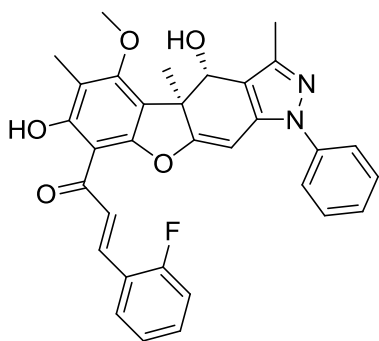
Выход 61%. Т.пл. 111-114 °С. $[\alpha]_D^{20}$ +57 (*c* 0.2; CHCl₃).

Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.53 (3H, с, H(15)), 2.18 (3H, с, H(10)), 2.47 (3H, с, H(12)), 3.98 (3H, с, OCH₃), 4.04 (1H, с, C(1)-OH), 5.45 (1H, с, H(1)), 6.00 (1H, с, H(4)), 7.27-7.58 (9H, м, H-аром), 7.85 (1H, д, *J* = 15.4, H(14)), 7.90 (1H, д, *J* = 15.4, H(21)) 13.87 (1H, с, C(7)-OH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 9.42 (C(10)), 12.81 (C(12)), 18.12 (C(15)), 52.24 (C(9b)), 61.86 (C(20)),

74.47 (C(1)), 90.24 (C(4)), 104.55 (C(6)), 112.37 (C(2)), 112.78 (C(9a)), 115.20 (C(8)), 123.14 (2C(17)), 125.24 (C(14)), 126.95 (C(19)), 129.20 (2C(18)), 129.23 (C(24)), 129.81 (C(23)), 133.18 (C(22)), 136.24 (C(16)), 136.63 (C(25)), 139.19 (C(3)), 143.71 (C(21)), 147.88 (C(11)), 157.27 (C(5a)), 159.87 (C(9)), 164.49 (C(7)), 166.93 (C(4a)), 190.96 (C(13)). Найдено: m/z 554.1603 $[M]^+$ C₃₂H₂₇O₅N₂Cl. Вычислено: M = 554.1587.

(E)-1-((4R,4aS)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(4-хлорфенил)проп-2-ен-1-он (-)-228. Т.пл. 112-113 °С. $[\alpha]_D^{27}$ -68 (с 0.2; CHCl₃).

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(2-фторфенил)проп-2-ен-1-он (+)-229. Оранжевый аморфный порошок.



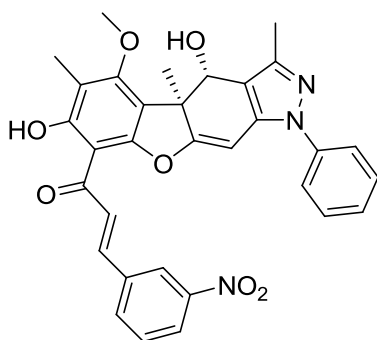
Выход 46%. Т.пл. 93-96 °С. $[\alpha]_D^{27}$ +96 (с 0.2; CHCl₃).

Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.52 (3H, с, H(15)), 2.16 (3H, с, H(10)), 2.47 (3H, с, H(12)), 3.97 (3H, с, OCH₃), 4.04 (1H, д, J = 1.3, C(1)-OH), 5.44 (1H, с, H(1)), 5.99 (1H, с, H(4)), 7.08 (1H, м, H(24)), 7.13 (1H, м, H(26)), 7.31-7.50 (6H, м, H-аром), 7.61 (1H, м, H(25)), 7.99 (1H, д, J = 15.6, H(14)), 8.06 (1H, д, J = 15.6, H(21)) 13.85 (1H, с, C(7)-OH). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.):

9.39 (C(10)), 12.80 (C(12)), 18.08 (C(15)), 52.23 (C(9b)), 61.83 (C(20)), 74.43 (C(1)), 90.17 (C(4)), 104.57 (C(6)), 112.40 (C(2)), 112.69 (C(9a)), 115.17 (C(8)), 116.22 (д, J_{CF} = 21.9, C(26)), 122.87 (д, J_{CF} = 11.6, C(22)), 123.05 (2C(17)), 124.45 (д, J_{CF} = 3.6, C(14)), 126.84 (C(19)), 127.30 (д, J_{CF} = 7.3, C(24)), 129.18 (2C(18)), 129.86 (д, J_{CF} = 2.9, C(23)), 132.02 (д, J_{CF} = 8.6, C(25)), 136.29 (C(16)), 137.70 (д, J_{CF} = 2.0, C(21)), 139.23 (C(3)), 147.85 (C(11)), 157.33 (C(5a)), 159.85 (C(9)), 160 (д, J_{CF} = 255.4, C(27)), 164.48 (C(7)), 166.96 (C(4a)), 191.16 (C(13)). Найдено: m/z 538.1902 $[M]^+$ C₃₃H₃₀O₆N₂. Вычислено: M = 538.1899.

(E)-1-((4R,4aS)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(2-фторфенил)проп-2-ен-1-он (-)-229. Т.пл. 94-96 °С. $[\alpha]_D^{20}$ -109 (с 0.2; CHCl₃).

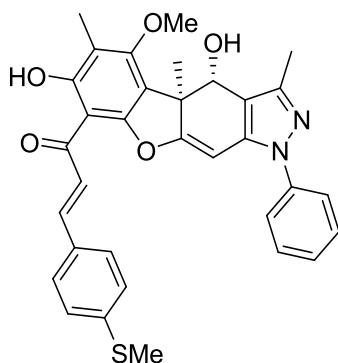
(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(3-нитрофенил)проп-2-ен-1-он (+)-230. Оранжевый аморфный порошок.



Выход 40%. Т.пл. 95-98 °С. $[\alpha]_D^{27} +85$ (с 0.2; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.52 (3H, с, H(15)), 2.17 (3H, с, H(10)), 2.45 (3H, с, H(12)), 3.97 (3H, с, OCH_3), 4.01 (1H, с, C(1)-OH), 5.44 (1H, с, H(1)), 6.09 (1H, с, H(4)), 7.07-7.63 (9H, м, H-аром), 7.86 (1H, д, $J = 15.6$, H(14)), 8.06 (1H, д, $J = 15.6$, H(21)) 13.62 (1H, с, C(7)-OH). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.07 (C(10)), 12.48 (C(12)), 17.75 (C(15)), 52.00 (C(9b)), 61.57 (C(20)), 74.15 (C(1)), 90.26 (C(4)), 104.16 (C(6)), 112.06 (C(2)), 112.53 (C(9a)), 115.12 (C(8)), 122.55 (C(27)), 122.65 (2C(17)), 124.30 (C(24)), 126.62 (C(19)), 127.66 (C(14)), 128.94 (2C(18)), 129.65 (C(24)), 134.01 (C(23)), 135.76 (C(22)), 136.24 (C(16)), 138.81 (C(3)), 141.14 (C(21)), 147.52 (C(11)), 148.31 (C(26)), 157.08 (C(5a)), 159.96 (C(9)), 164.10 (C(7)), 166.32 (C(4a)), 190.33 (C(13)). Найдено: m/z 565.1848 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{O}_7\text{N}_3$. Вычислено: $M = 565.1844$.

(E)-1-((4R,4aS)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(3-нитрофенил)проп-2-ен-1-он (-)-230. Т.пл. 95-97 °С. $[\alpha]_D^{27} -79$ (с 0.2; CHCl_3).

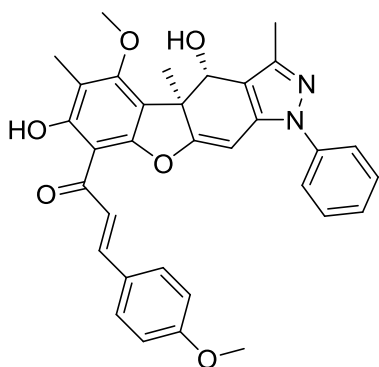
(2E)-1-[(1S,16R)-5,16-dihydroxy-3-methoxy-1,4,14-trimethyl-12-phenyl-8-oxa-12,13-diazatetracyclo[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]hexadeca-2(7),3,5,9,11(15),13-hexaen-6-yl]-3-[4-(methylsulfanyl)phenyl]prop-2-en-1-one (+)-231. Оранжевый аморфный порошок.



Выход 46%, $[\alpha]_D^{20} +417$ (с 0.14, CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.52 (с, 3H, H-15); 2.17 (с, 3H, H-10); 2.46 (с, 3H, H-12); 2.49 (с, 3H, SCH_3), 3.96 (с, 3H, OCH_3); 4.07 (с, 1H, OH-1); 5.44 (с, 1H, H-1); 6.00 (с, 1H, H-4); 7.22—7.55 (м, 9H, H-аром.); 7.88 (шс, 2H, H-14, H-21); 14.01 (с, 1H, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.4 (C-10); 12.8 (C-12); 14.8 (C-28), 18.1 (C-15); 52.2 (C-9b); 61.8 (C-20); 74.4 (C-1); 90.1 (C-4); 104.6 (C-6); 112.3 (C-2); 112.6 (C-9a); 115.0 (C-8); 122.8 (C-17, C-17'); 123.5 (C-14); 125.6 (C-24, C-24'); 126.8 (C-19); 129.0 (C-23, C-23'); 129.2 (C-18, C-18'); 131.0 (C-22); 136.3 (C-16); 139.1 (C-3); 142.8 (C-25); 144.8 (C-21), 147.8 (C-5a), 157.2 (C-11); 159.6 (C-9); 164.4 (C-7); 167.0 (C-4a); 191.0 (C-13). Найдено: m/z 566.1865 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$. Вычислено: $M = 566.1870$.

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(4-метоксифенил)проп-2-ен-1-он (+)-232. Оранжевый аморфный порошок.

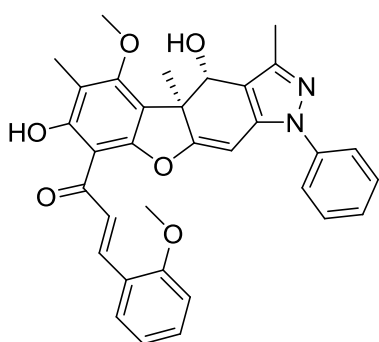
Выход 70%. Т.пл. 105-107 °С. $[\alpha]_D^{20} +23$ (с 0.2; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.50 (3H, с, H-15), 2.14 (3H, с, H-10), 2.45 (3H, с, H-12), 3.81 (3H, с, H-26), 3.94 (3H, с, OCH_3), 4.05 (1H, с, C(1)-OH), 5.42 (1H, с, H-1), 5.97 (1H, с, H-4), 6.89 (2H, д, $J = 8.65$, H-23)



7.29-7.58 (7H, м, Н-аром), 7.77 (1H, д, $J = 15.5$, Н-14), 7.87 (1H, д, $J = 15.5$, Н-21) 14.06 (1H, с, C(7)-ОН). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.40 (C-10), 12.83 (C-12), 18.14 (C-15), 52.20 (C-9b), 55.31 (C-26), 61.82 (C-20), 74.43 (C-1), 90.07 (C-4), 104.62 (C-6), 112.38 (C-2), 112.65 (C-9a), 114.38 (C-24), 115.01 (C-8), 122.28 (C-14), 123.11 (2C-17), 126.85 (C-19), 127.42 (C-22), 129.23 (2C-18), 130.63 (C-23), 136.35 (C-16), 139.26 (C-3), 145.28 (C-21), 147.86 (C-11), 157.16 (C-5a), 159.44 (C-9), 161.85 (C-25), 164.46 (C-7), 167.09 (C-4a), 191.04 (C-13). Найдено: m/z 550.2099 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}_2$. Вычислено: $M = 550.2098$.

(E)-1-((4R,4aS)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(4-метоксифенил)проп-2-ен-1-он (-)-232. Т.пл. 105-106 °С. $[\alpha]_D^{19} -57$ (с 0.4; CHCl_3).

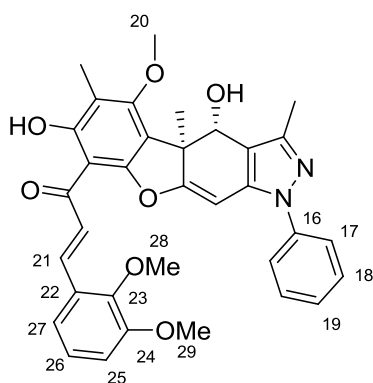
(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(2-метоксифенил)проп-2-ен-1-он (+)-233. Оранжевый аморфный порошок.



Выход 68%. Т.пл. 99-103 °С. $[\alpha]_D^{20} +81$ (с 0.2; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.52 (3H, с, Н(15)), 2.17 (3H, с, Н(10)), 2.47 (3H, с, Н(12)), 3.89 (3H, с, Н(28)), 3.97 (3H, с, OCH_3), 4.06 (1H, д, $J = 1.3$, C(1)-ОН), 5.45 (1H, с, Н(1)), 5.99 (1H, с, Н(4)), 6.92 (1H, д, $J = 8.3$, Н(26)), 6.98 (1H, м, Н(24)), 7.31-7.60 (6H, м, Н-аром), 7.63 (1H, м, Н(23)), 8.04 (1H, д, $J = 15.7$, Н(14)), 8.28 (1H, д, $J = 15.7$, Н(21)) 14.07 (1H, с, C(7)ОН). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.42 (C(10)), 12.83 (C(12)), 18.12 (C(15)), 52.27 (C(9b)), 55.39 (C(28)), 61.82 (C(20)), 74.51 (C(1)), 89.99 (C(4)), 104.74 (C(6)), 111.13 (C(26)), 112.41 (C(2)), 112.63 (C(9a)), 115.02 (C(8)), 120.70 (C(24)), 123.02 (2C(17)), 123.76 (C(22)), 125.21 (C(14)), 126.84 (C(19)), 129.14 (2C(18)), 129.25 (C(25)), 132.08 (C(23)), 136.37 (C(16)), 139.25 (C(3)), 140.72 (C(21)), 147.89 (C(11)), 157.31 (C(5a)), 158.87 (C(27)), 159.53 (C(9)), 164.50 (C(7)), 167.15 (C(4a)), 191.67 (C(13)). Найдено: m/z 550.2091 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}_2$. Вычислено: $M = 550.2098$.

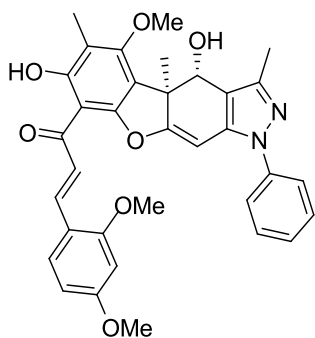
(E)-1-((4R,4aS)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(2-метоксифенил)проп-2-ен-1-он (-)-233. Т.пл. 100-103 °С. $[\alpha]_D^{20} -73$ (с 0.2; CHCl_3).

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(2,3-диметоксифенил)проп-2-ен-1-он (+)-234. Оранжевый аморфный порошок.



Выход 79%, $[\alpha]_D^{20} +458$ (с 0.30, CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.55 (с, 3 H, H-15); 2.19 (с, 3 H, H-10); 2.50 (с, 3 H, H-12); 3.89, 3.94, 4.00 (все с, 3H каждый, OCH_3); 5.44 (с, 1H, OH-1); 5.48 (с, 1H, H-1); 5.95 (с, 1 H, H-4); 6.92 (д, 1H, H-25, $J = 8.0$ Hz); 7.15—7.60 (м, 7H, H-аром.); 7.86 (д, 1 H, H-14, $J = 15.4$ Hz); 7.92 (д, 1 H, H-21, $J = 15.4$ Hz); 14.06 (с, 1 H, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.1 (C-10); 12.5 (C-12); 17.8 (C-15); 52.0 (C-9b); 55.1 и 55.6 (C-28 и C-29); 61.5 (C-20); 74.2 (C-1); 89.5 (C-4); 104.3 (C-6); 109.7 (C-25); 110.7 (C-27); 112.1 (C-2); 112.4 (C-9a); 114.7 (C-8); 122.5 (C-14); 122.7 (C-17, C-17'); 123.2 (C-26); 126.6 (C-19); 127.5 (C-22); 128.8 (C-18, C-18'); 135.9 (C-16); 138.9 (C-3); 144.8 (C-21), 147.6 (C-23); 148.7 (C-11); 151.3 (C-24); 156.8 (C-5a); 159.2 (C-9); 164.2 (C-7); 166.7 (C-4a); 190.6 (C-13). Найдено: m/z 580.2209 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$. Вычислено: $M = 580.2204$.

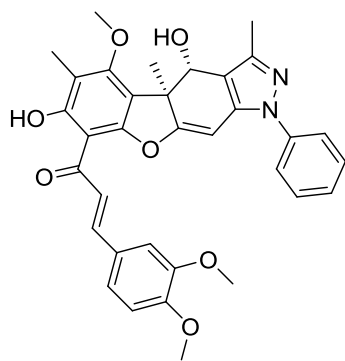
(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4a,6-триметил-1-фенил-4,4a-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(2,4-диметоксифенил)проп-2-ен-1-он (+)-235.
Оранжевый аморфный порошок.



Выход 55%, $[\alpha]_D^{20} +209$ (с 0.19, CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.51 (с, 3 H, H-15); 2.16 (с, 3 H, H-10); 2.46 (с, 3 H, H-12); 3.84, 3.87, 3.96 (все с, 3H каждый, OCH_3); 4.09 (с, 1 H, OH-1); 5.44 (с, 1 H, H-1); 5.99 (с, 1 H, H-4); 6.44 (д, 1H, H-24, $J = 2.3$ Hz); 6.53 (дд, 2 H, H-26, $J = 2.3$ Hz и 8.5 Hz); 7.29—7.53 (м, 5H, H-аром.); 7.57 (д, 1H, H-27, $J = 8.5$ Hz); 7.94 (д, 1 H, H-14, $J = 15.6$ Hz); 8.24 (д, 1 H, H-21, $J = 15.6$ Hz); 14.24 (с, 1 H, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.4 (C-10); 12.7 (C-12); 18.1 (C-15); 52.2 (C-9b); 55.3 и 55.4 (C-28 и C-29); 61.7 (C-20); 74.4 (C-1); 89.8 (C-4); 98.1 (C-24), 104.7 (C-6); 105.5 (C-26), 112.3 (C-2); 112.5 (C-9a); 114.8 (C-8); 116.9 (C-22), 122.4 (C-14); 123.0 (C-17, C-17'); 126.8 (C-19); 129.1 (C-18, C-18'); 131.0 (C-27); 136.4 (C-16); 139.2 (C-3); 141.0 (C-21); 147.8 (C-23), 157.1 (C-5a); 159.2 (C-11); 160.5 (C-9); 163.3 (C-25), 164.4 (C-7); 167.3 (C-4a); 191.5 (C-13). Найдено: m/z 580.2210 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$. Вычислено: $M = 580.2204$.

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4a,6-триметил-1-фенил-4,4a-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(3,4-диметоксифенил)проп-2-ен-1-он (+)-236.
Оранжевый аморфный порошок.

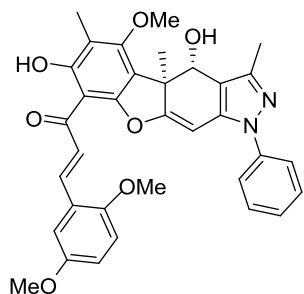
Выход 60%. Т.пл. 115-117 °С. $[\alpha]_D +19$ (с 0.3; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.52 (3H, с, H(15)), 2.17 (3H, с, H(10)), 2.47 (3H, с, H(12)), 3.83 и 3.87 (6H, 2с, H(26) и H(27)), 3.98 (3H, с, OCH_3), 4.04 (1H, с, C(1)-OH), 5.46 (1H, с, H(1)), 5.94 (1H, с, H(4)), 6.89 (1H, д, $J = 8.4$, H(26)), 7.16 (1H, с, H(23)), 7.22 (1H, д, $J = 8.4$, H(25)), 7.34 (1H, м, H(19)), 7.49



(4H, м, H(17), H(18)), 7.86 (1H, д, $J = 15.7$, H(14)), 7.90 (1H, д, $J = 15.7$, H(21)) 14.05 (1H, с, C(7)-OH). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.37 (C(10)), 12.79 (C(12)), 18.08 (C(15)), 52.30 (C(9b)), 55.45 и 55.88 (C(28) и C(29)), 61.79 (C(20)), 74.47 (C(1)), 89.79 (C(4)), 104.60 (C(6)), 110.03 и 111.02 (C(23) и C(26)), 112.37 и 112.69 (C(2) и C(9a)), 115.00 (C(8)), 122.83 (C(27)), 122.98 (2C(17)), 123.49 (C(14)), 126.87 (C(19)), 127.75 (C(22)), 129.08 (2C(18)), 136.21 (C(16)), 139.18 (C(3)), 145.07 (C(21)), 147.90 (C(25)), 149.01 (C(24)), 151.58 (C(11)), 157.17 (C(5a)), 159.52 (C(9)), 164.49 (C(7)), 167.00 (C(4a)), 190.93 (C(13)). Найдено: m/z 580.2190 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{O}_7\text{N}_2$. Вычислено: $M = 580.2204$.

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(3,4-диметоксифенил)проп-2-ен-1-он (-)-236. Т.пл. 115-118 °С. $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -24$ (с 0.2; CHCl_3).

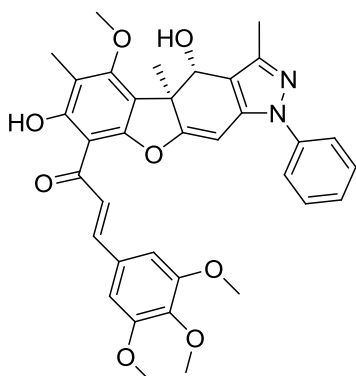
(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(2,5-диметоксифенил)проп-2-ен-1-он (+)-237. Оранжевый аморфный порошок.



Выход 38%, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +337$ (с 0.08, CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.51 (с, 3H, H-15); 2.16 (с, 3H, H-10); 2.46 (с, 3H, H-12); 3.75, 3.84, 3.96 (все с, 3H каждый, OCH_3); 4.05 (с, 1H, OH-1); 5.44 (с, 1H, H-1); 5.95 (s, 1H, H-4); 6.84 (d, 1H, H-24, $J = 8.97$ Hz); 6.92 (дд, 2H, H-25, $J = 8.97$ Hz и 3.00 Hz); 7.15 (д, 1H, H-27, $J = 3.00$ Hz); 7.29—7.58 (м, 5H, H-аром.); 8.01 (д, 1H, H-14, $J = 15.6$ Hz); 8.20 (д, 1H, H-21, $J = 15.6$ Hz); 14.00 (с, 1H, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.4 (C-10); 12.8 (C-12); 18.0 (C-15); 52.2 (C-9b); 55.4 и 55.8 (C-28 и C-29); 61.8 (C-20); 74.4 (C-1); 89.9 (C-4); 104.6 (C-6); 112.2 (C-2); 112.6 (C-9a); 112.3 and 113.3 (C-24, C-25); 115.0 (C-8); 117.7 (C-27), 122.8 (C-17, C-17'); 124.2 (C-22); 125.5 (C-14); 126.8 (C-19); 129.0 (C-18, C-18'); 136.2 (C-16); 139.1 (C-3); 140.2 (C-21); 147.8 (C-23), 153.1 (C-26); 153.3 (C-11); 157.2 (C-5a); 159.5 (C-9); 164.4 (C-7); 167.0 (C-4a); 191.5 (C-13). Найдено: m/z 580.2206 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$. Вычислено: $M = 580.2204$.

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(3,4,5-триметоксифенил)проп-2-ен-1-он (+)-238. Оранжевый аморфный порошок.

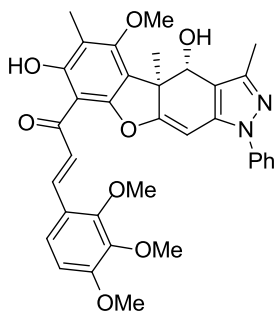
Выход 58%. Т.пл. 119-121 °С. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +23$ (с 0.2; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.49 (3H, с, H(15)), 2.12 (3H, с, H(10)), 2.44 (3H, с, H(12)), 3.83 (6H, с, H(26)), 3.87 (3H, с, H(27)), 3.95 (3H, с, OCH_3), 3.96 (1H, с, C(1)-OH), 5.40 (1H, с, H(1)), 5.86 (1H, с, H(4)), 6.82



(2H, с, Н(23)), 7.28-7.50 (5H, м, Н-аром), 7.74 (1H, д, $J = 15.3$, Н(14)), 7.91 (1H, д, $J = 15.3$, Н(21)), 13.90 (1H, с, C(7)-OH). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.34 (C(10)), 12.81 (C(12)), 18.04 (C(15)), 52.35 (C(9b)), 55.76 (C(26)), 60.88 (C(27)), 61.80 (C(20)), 74.49 (C(1)), 89.73 (C(4)), 104.55 (C(6)), 105.62 (C(23)), 112.35 (C(2)), 112.75 (C(9a)), 115.07 (C(8)), 122.89 (2C(17)), 124.44 (C(14)), 126.95 (C(19)), 129.03 (2C(18)), 130.24 (C(22)), 136.09 (C(16)), 139.13 (C(3)), 140.52 (C(25)), 144.71 (C(21)), 147.92 (C(11)), 153.24 (C(24)), 157.17 (C(5a)), 159.71 (C(9)), 164.49 (C(7)), 166.85 (C(4a)), 190.89 (C(13)). Найдено: m/z 610.2303 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{O}_8\text{N}_2$. Вычислено: $M = 610.2310$.

(E)-1-((4R,4aS)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(3,4,5-триметоксифенил)проп-2-ен-1-он (-)-238.
Т.пл. 118-121 °С. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -29$ (с 0.2; CHCl_3).

(E)-1-((4S,4aR)-4,7-дигидрокси-5-метокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-4,4а-дигидро-1Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-8-ил)-3-(2,3,4-триметоксифенил)проп-2-ен-1-он (+)-239.
Оранжевый аморфный порошок.



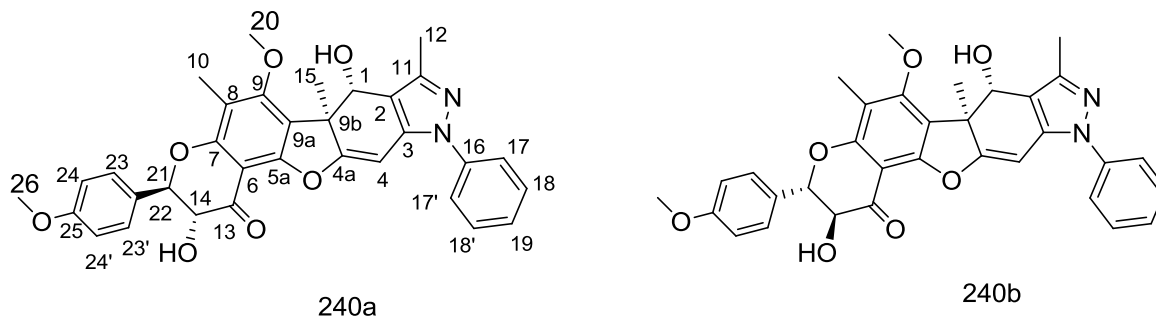
Выход 70%, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +523$ (с 0.14, CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.51 (с, 3H, Н-15); 2.16 (с, 3H, Н-10); 2.47 (с, 3H, Н-12); 3.85, 3.89, 3.94, 3.97 (все с, 3H каждый, OCH_3); 5.40 (с, 1H, OH-1); 5.43 (с, 1H, Н-1); 5.98 (с, 1H, Н-4); 6.71 (д, 1H, Н-25, $J = 8.7$ Hz); 7.26—7.57 (м, 6H, Н-аром.); 7.93 (д, 1H, Н-14, $J = 15.6$ Hz); 8.14 (д, 1H, Н-21, $J = 15.6$ Hz); 14.08 (с, 1H, OH-7). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.3 (C-10); 12.8 (C-12); 18.1 (C-15); 52.3 (C-9b); 56.0 (C-20); 60.8, 61.4 и 61.8 (C-28, C-29 и C-30); 74.5 (C-1); 89.9 (C-4); 104.8 (C-6); 107.6 (C-26); 112.4 (C-2); 112.6 (C-9a); 115.0 (C-8); 121.8 (C-22); 123.0 (C-14); 123.1 (C-17, C-17'); 123.7 (C-19); 126.8 (C-27); 128.8 (C-18, C-18'); 136.4 (C-16); 139.3 (C-3); 140.6 (C-21), 142.4 (C-24); 147.9 (C-23); 154.0 (C-11); 156.1 (C-25); 157.2 (C-5a); 159.4 (C-9); 164.5 (C-7); 167.2 (C-4a); 191.4 (C-13). Найдено: m/z 610.2294 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8$. Вычислено: $M = 610.2310$.

Синтез соединений 240a,b и 241.

К раствору 220 мг соединения **232** (0.4 ммоль) в 5 мл метилового спирта добавляли 0.15 мл 33%-ной перекиси водорода, 0.025 мл 6N раствора NaOH. Перемешивали при температуре 10-14 °С в течение 4 часов до полной конверсии субстрата (контроль по ТСХ). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры, разбавляли водой, нейтрализовали разбавленной соляной кислотой, выпавший осадок отфильтровывали и сушили на воздухе. Хроматографировали на колонке с силикагелем, элюент – хлористый

метилен с градиентом этилового спирта от 0 до 20%. Смесь трех соединений **240a,b** и **241** выделена с общим выходом около 80%. Соотношение продуктов в смеси ~1:1:1. Соединение **241** выделено в индивидуальном виде с выходом 17%.

Соединения **240a,b** представляют собой *транс*-диастереомеры по центрам C¹⁴ и C²¹. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР проведено с использованием обогащенного одним из диастереомеров образца.



(2*S*,3*R*,15*R*,16*S*)-3,15-дигидрокси-20-метокси-2,5,19-триметил-7,16-дифенил-11,17-диокса-6,7-дизапентацикло[10.8.0.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{13,18}]эйкоза-1(12),4(8),5,9,13(18),19-гексаен-14-он (+)-240a или (+)-240b. Жёлтой аморфное вязкое вещество.

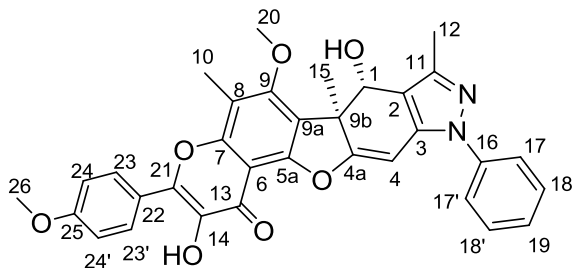
Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, CDCl₃, δ м.д., J Гц): 1.51 (3H, с, H(15)), 2.13 (3H, с, H(10)), 2.45 (3H, д, J_{12,1}=0.3, H(12)), 3.76 (1H, ш.с, OH(14)), 3.82 (1H, д, J_{OH,1}=1.6, OH(1)), 3.83 (3H, с, H(26)), 3.95 (3H, с, H(20)), 4.49 (1H, д, J_{21,14}=12.2, H(14)), 5.06 (1H, д, J_{14,21}=12.2, H(21)), 5.42 (1H, дд, J_{1,OH}=1.6, J_{1,12}=0.3, H(1)), 6.99 (2H, д, J_{24,23}=8.8, H(24)), 7.48 (2H, д, J_{23,24}=8.8, H(23)), 7.46-7.51 (2H, м, H(17)) 7.41-7.46 (2H, м, H(18)) 7.28-7.32 (1H, м, H(19)). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ м.д.): 74.43 (C-1), 112.08 (C-2), 136.37 (C-3), 91.15 (C-4), 167.39 (C-4a), 156.61 (C-5a), 102.85 (C-6), 154.61 (C-7), 113.09 (C-8), 160.14 (C-9), 118.84 (C-9a), 52.16 (C-9b), 9.53 (C-10), 147.47 (C-11), 12.81 (C-12), 191.28 (C-13), 73.11 (C-14), 18.07 (C-15), 139.12 (C-16), 122.80 (C-17), 129.11 (C-18), 126.84 (C-19), 61.96 (C-20), 83.14 (C-21), 128.20 (C-22), 128.65 (C-23), 114.01 (C-24), 160.22 (C-25), 55.22 (C-26).

(2*S*,3*R*,15*S*,16*R*)-3,15-дигидрокси-20-метокси-2,5,19-триметил-7,16-дифенил-11,17-диокса-6,7-дизапентацикло[10.8.0.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{13,18}]эйкоза-1(12),4(8),5,9,13(18),19-гексаен-14-он ((+)-240a или (+)-240b)

Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, CDCl₃, δ м.д., J Гц): 1.49 (3H, с, H(15)), 2.13 (3H, с, H(10)), 2.45 (3H, д, J_{12,1}=0.3, H(12)), 3.76 (1H, ш.с, OH(14)), 3.82 (1H, д, J_{OH,1}=1.6, OH(1)), 3.83 (3H, с, H(26)), 3.96 (3H, с, H(20)), 4.50 (1H, д, J_{21,14}=12.2, H(14)), 5.03 (1H, д, J_{14,21}=12.2, H(21)), 5.43 (1H, дд, J_{1,OH}=1.6, J_{1,12}=0.3, H(1)), 6.99 (2H, д, J_{24,23}=8.8, H(24)), 7.48 (2H, д, J_{23,24}=8.8, H(23)), 7.46-7.51 (2H, м, H(17)) 7.41-7.46 (2H, м, H(18)) 7.28-7.32 (1H, м, H(19)). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ м.д.): 74.38 (C-1), 112.12 (C-2), 136.41 (C-3), 91.95 (C-4), 167.39 (C-4a), 156.61 (C-5a), 102.55 (C-6), 154.66 (C-7), 113.10 (C-8), 160.47 (C-9), 118.84 (C-9a), 52.08 (C-9b), 9.72 (C-

10), 147.75 (C-11), 12.80 (C-12), 191.25 (C-13), 73.23 (C-14), 17.97 (C-15), 139.13 (C-16), 122.81 (C-17), 129.11 (C-18), 126.84 (C-19), 61.85 (C-20), 83.12 (C-21), 128.16 (C-22), 128.68 (C-23), 114.02 (C-24), 160.22 (C-25), 55.22 (C-26).

(2S,3R)-3,15-дигидрокси-20-метокси-2,5,19-триметил-7,16-дифенил-11,17-диокса-6,7-дизапентацикло[10.8.0.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{13,18}]эйкоза-1(12),4(8),5,9,13(18),15,19-гептаен-14-он (+)-241. Жёлтый аморфный порошок.

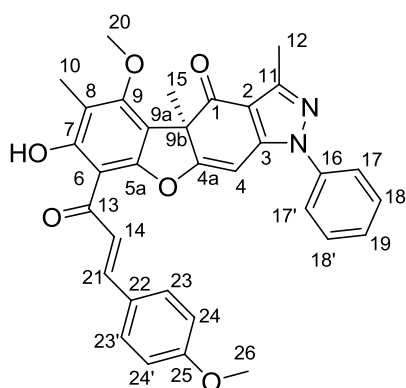


Выход 17%. $T_{пл} = 156-159\text{ }^{\circ}\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3 , δ м.д., J Гц): 1.55 (3H, с, H(15)), 2.50 (3H, с, H(10)), 2.46 (3H, д, $J_{12,11}=0.3$, H(12)), 3.89 (1H, д, $J_{OH,11}=1.6$, OH(1)), 3.87 (3H, с, H(26)), 4.02 (3H, с, H(20)), 5.50 (1H, дд, $J_{1,OH}=1.6$, $J_{1,12}=0.3$, H(1)), 7.03 (2H, д, $J_{24,23}=9.1$, H(24)), 7.04 (1H, ш.с, OH(14)), 8.19 (2H, д, $J_{23,24}=9.1$, H(23)), 7.46-7.51 (2H, м, H(17)) 7.41-7.46 (2H, м, H(18)) 7.28-7.32 (1H, м, H(19)). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ м.д.): 74.38 (C-1), 111.81 (C-2), 136.50 (C-3), 91.24 (C-4), 167.46 (C-4a), 156.39 (C-5a), 105.75 (C-6), 154.71 (C-7), 113.22 (C-8), 157.50 (C-9), 120.90 (C-9a), 52.65 (C-9b), 9.79 (C-10), 147.17 (C-11), 12.82 (C-12), 171.10 (C-13), 137.39 (C-14), 18.18 (C-15), 139.14 (C-16), 122.76 (C-17), 129.11 (C-18), 126.82 (C-19), 62.46 (C-20), 144.42 (C-21), 123.33 (C-22), 129.11 (C-23), 114.13 (C-24), 161.02 (C-25), 55.30 (C-26).
Найдено: m/z 564.1887 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{O}_7\text{N}_2$. Вычислено: $M = 564.1891$.

Синтез соединений 242 и 243

К раствору 163 мг соединения **232** или **234** (0.3 ммоль) в 10 мл сухого толуола добавляли 0.3 мл 5.5 М раствора *t*-BuOOH в гексане и 7 кристалликов ванадилацетилацетоната. Перемешивали при температуре бани 55 $^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой, экстрагировали хлороформом. Хлороформный экстракт упаривали, хроматографировали остаток на колонке с силикагелем, элюент – хлороформ с градиентом этилового спирта от 0 до 20%.

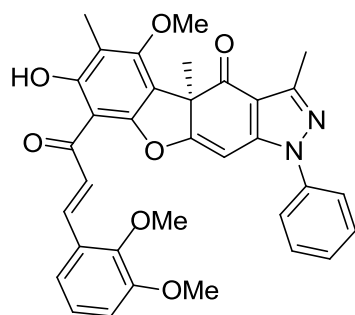
(R,E)-7-гидрокси-5-метокси-8-(3-(4-метоксифенил)акрилоил)-3,4а,6-триметил-1-фенил-1H-бензофуоро[3,2-f]индазол-4(4aH)-он (+)-242. Оранжевый аморфный порошок.



Выход 67%. $T_{пл} = 155-157\text{ }^{\circ}\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ м.д., J/Гц): 1.89 (3H, с, H(15)), 2.20 (3H, с, H(10)), 2.55 (3H, с, H(12)), 3.83 (3H, с, H(26)), 4.10 (3H, с, H(20)), 6.17 (1H, с, H(4)), 6.90 (2H, д, $J = 8.5$, H(24), H(24')), 7.35-7.60 (м, H(аром)), 7.74 (1H, д, $J = 15.5$, H(14)), 7.89 (1H, д, $J = 15.5$, H(21)), 13.96 (1H, с, H(7)). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ м.д.): 192.73 (C-1), 111.28 (C-2),

145.48 (C-3), 88.69 (C-4), 172.12 (C-4a), 156.02 (C-5a), 104.22 (C-6), 164.64 (C-7), 115.21 (C-8), 162.14 (C-9), 110.96 (C-9a), 61.05 (C-9b), 9.45 (C-10), 150.69 (C-11), 12.94 (C-12), 190.99 (C-13), 122.45 (C-14), 27.73 (C-15), 138.31 (C-16), 123.68 (C-17), 129.45 (C-18), 128.00 (C-19), 62.38 (C-20), 145.06 (C-21), 127.50 (C-22), 130.52 (C-23), 114.37 (C-24), 161.79 (C-25), 55.30 (C-26). Найдено: m/z 548.1937 $[M]^+$ C₃₃H₂₈O₆N₂. Вычислено: M = 548.1942.

(1R)-6-[(2E)-3-(2,3-диметоксифенил)проп-2-еноил]-5-гидрокси-3-метокси-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]гексадека-2(7),3,5,9,11(15),13-гексаен-16-он (+)-243. Оранжевый аморфный порошок.



Выход 73%. $[\alpha]_D^{20}$ +631 (с 0.14, CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.89 (с, 3H, H-15); 2.20 (с, 3H, H-10); 2.55 (с, 3H, H-12); 3.87, 3.87, 4.10 (все с, 3H каждый, OCH₃); 6.16 (с, 1H, H-4); 6.95 (д, 1H, H-25, J = 8.0 Hz); 7.06 (т, 2H, H-26, J = 8.0 Hz и 3.00 Hz); 7.24 (д, 1H, H-27, J = 8.0 Hz); 7.29—7.58 (м, 5H, H-аром.); 7.92 (д, 1H, H-14, J = 15.7 Hz); 8.22 (д, 1H, H-21, J = 15.7 Hz); 13.85 (с, 1H, OH-7). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 10.3 (C-10); 13.8 (C-12); 30.6 (C-15); 56.6 (C-20); 61.9 (C-9b); 62.1 и 63.2 (C-28 и C-29); 89.6 (C-4); 105.1 (C-6); 111.8 (C-2); 112.1 (C-9a); 115.0 (C-25); 116.0 (C-8); 120.5 (C-27), 124.4 (C-17, C-17'); 124.9 (C-14); 127.1 (C-26); 128.9 (C-19); 129.8 (C-22); 130.3 (C-18, C-18'); 139.0 (C-16); 140.7 (C-21); 146.3 (C-3), 149.8 (C-11); 151.5 (C-23); 153.9 (C-24); 156.9 (C-5a); 163.1 (C-9); 165.5 (C-7); 172.9 (C-4a); 192.1 (C-13); 193.6 (C-1). Найдено: m/z 578.2040 $[M]^+$ C₃₄H₃₀N₂O₇.

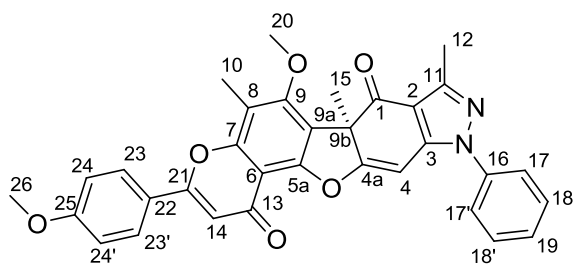
Вычислено: M = 578.2048.

Синтез соединения 244

К раствору 200 мг соединения **232** (0.36 ммоль) в 10 мл диоксана добавляли 184 мг (0.72 ммоль) DDQ. Кипятили в течение 15 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой, добавляли насыщенный раствор NaHCO₃, экстрагировали хлороформом. Хлороформный экстракт упаривали, хроматографировали остаток на колонке с силикагелем, элюент – хлористый метилен с градиентом метилового спирта от 0 до 20%.

20-метокси-2,5,19-триметил-7,16-дифенил-11,17-диокса-6,7-дизапентацикло[10.8.0.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{13,18}]эйкоза-1(12),4(8),5,9,13(18),15,19-гептаен-3,14-дион (+)-244. Жёлтый аморфный порошок.

Выход 75%. T_{пл} = 140-142 °C. Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, CDCl₃, δ, м.д., J/Гц): 1.89 (3H, с, H(15)), 2.51 (3H, с, H(10)), 2.56 (3H, с, H(12)), 3.88 (3H, с, H(26)), 4.17 (3H, с, H(20)), 6.40 (1H, с, H(4)), 6.65 (1H, с, H(14)), 7.02 (2H, д, J_{24, 23}=9.0, H(24)), 7.38-7.42 (1H, м, H(19)), 7.47-7.52 (2H, м, H(18)), 7.53-7.57 (2H, м, H(17)). 7.84 (2H, д, J_{23, 24}=9.0, H(23)). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ

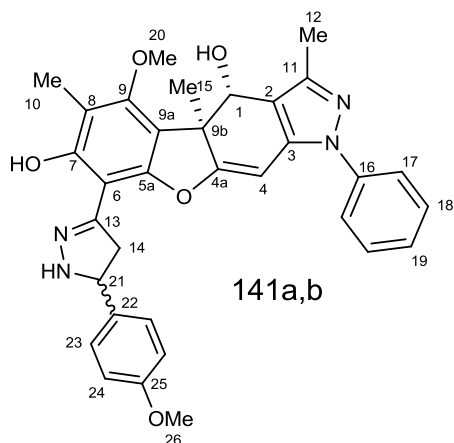


м.д.): 192.32 (C-1), 110.97 (C-2), 145.94 (C-3), 89.57 (C-4), 172.72 (C-4a), 153.81 (C-5a), 108.10 (C-6), 155.95 (C-7), 115.79 (C-8), 159.83 (C-9), 117.88 (C-9a), 61.08 (C-9b), 9.94 (C-10), 150.68 (C-11), 13.01 (C-12), 176.60 (C-13), 106.39 (C-14), 29.96 (C-15), 138.21 (C-16), 123.49 (C-17), 129.38 (C-18), 128.05 (C-19), 63.06 (C-20), 162.39 (C-21), 123.75 (C-22), 127.75 (C-23), 114.51 (C-24), 162.41 (C-25), 55.42 (C-26). Найдено: m/z 546.1788 $[M]^+$ C₃₃H₂₆O₆N₂. Вычислено: M = 546.1785.

Синтез соединений 245a,b.

К раствору 260 мг соединения **232** (0.5 ммоль) в 10 мл этанола добавляли (0.5 ммоль) гидразин моногидрата и эквимольное количество уксусной кислоты. Кипятили в течение 2 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой, выпавший осадок отфильтровывали, сушили на воздухе, хроматографировали на колонке с силикагелем, элюент – хлороформ с градиентом этилового спирта от 0 до 20%. Спектры ЯМР были сняты для образца содержащего смесь диастереомеров в соотношении 1:1.

(1S,16R)-3-метокси-6-[(5R)-5-(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-пиразол-3-ил]-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}] гексадека-2(7),3,5,9,11(15),13-гексаен-5,16-диол (+)-245a и **(1S,16R)-3-метокси-6-[(5S)-5-(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-пиразол-3-ил]-1,4,14-триметил-12-фенил-8-окса-12,13-дiazатетрацикло[7.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}] гексадека-2(7),3,5,9,11(15),13-гексаен-5,16-диол (+)-245b**. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 82%. T_{пл} = 117-119 °C. Спектр ЯМР ¹H ((+)-**245a** и (+)-**245b**). (600 МГц, CDCl₃, δ, м.д., J/Гц): 1.47 (3H, с, H(15)), 1.49 (3H, с, H(15)), 2.19 (3H, с, H(10)), 2.19 (3H, с, H(10)), 2.44 (3H, с, H(12)), 2.45 (3H, с, H(12)), 3.27 (1H, дд, ²J=17.4, J_{21, 14}=9.2, H(14)), 3.28 (1H, дд, ²J=17.4, J_{21, 14}=9.2, H(14)), 3.71 (1H, дд, ²J=17.4, J_{21, 14}=10.2, H(14)), 3.71 (1H, дд, ²J=17.4, J_{21, 14}=10.2, H(14)), 3.76 (3H, с, H(26)), 3.78 (3H, с, H(26)), 3.90 (3H, с, H(20)), 3.91 (3H, с, H(20)), 4.11 (1H, д, J_{OH, 1}=1.4, OH(1)), 4.12 (1H, д, J_{OH, 1}=1.4, OH(1)), 4.78 (1H, дд, J_{14, 21}=10.2, J_{14, 21}=9.2, H(21)), 4.79 (dd, J_{14, 21}=10.2, J_{14, 21}=9.2, H(21)), 5.39 (1H, д, J_{1, OH}=1.4, H(1)), 5.39 (1H, д, J_{1, OH}=1.4, H(1)), 6.84 (2H, д, J_{24, 23}=8.7, H(24)), 6.86 (2H, д, J_{24, 23}=8.7, H(24)), 7.25 (2H, д, J_{23, 24}=8.7, H(23)), 7.26 (2H, д, J_{23, 24}=8.7, H(23)), 7.44-7.56 (2H, м, H(17)), 7.44-7.56 (2H, м, H(17)), 7.38-7.41 (2H, м, H(18)), 7.38-7.41 (2H, м, H(18)), 7.24-7.28 (1H, м, H(19)), 7.24-7.28 (1H, м, H(19)). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ м.д.): 74.65 (C-1), 112.22

(C-2), 136.75 (C-3), 89.21 (C-4), 167.75 (C-4a), 154.57 (C-5a), 99.37 (C-6), 157.88 (C-7), 111.85 (C-8), 154.97 (C-9), 114.81 (C-9a), 52.69 (C-9b), 9.48 (C-10), 147.71 (C-11), 12.78 (C-12), 151.26 (C-13), 41.12 (C-14), 18.20 (C-15), 139.22 (C-16), 122.86 (C-17), 129.02 (C-18), 126.65 (C-19), 61.69 (C-20), 62.08 (C-21), 133.96 (C-22), 127.35 (C-23), 114.11 (C-24), 159.23 (C-25), 55.17 (C-26). Найдено: m/z 564.2360 $[M]^+$ $C_{33}H_{32}O_5N_4$. Вычислено: $M = 564.2373$.

Синтез соединений 246-249, 251-260

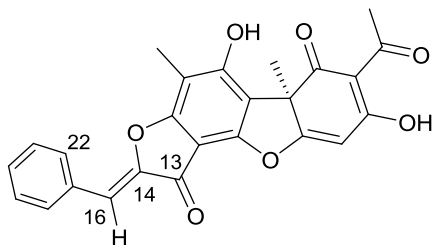
К раствору 1 ммоль соединения **211** в 24 мл MeOH добавили 1.1 ммоль соответствующего альдегида, 1 мл 50% водного раствора KOH и кипятили в течение 1.5 часов. Затем реакционную смесь разбавили водой (до ~50-60 мл), подкислили HCl (1:4) до pH = 3-4. Экстрагировали CH_2Cl_2 (3×10 мл), сушили над прокаленным $MgSO_4$, удаляли растворитель и хроматографировали остаток на колонке с силикагелем, элюент – CH_2Cl_2 .

Структуру устанавливали с привлечением одномерных и двумерных (с настройкой $^1J_{H,C} = 160$ Гц для HSQC и $^nJ_{H,C} = 7$ Гц для HMBC) спектров.

Первоначальный набор конформеров для обоих возможных изомеров по двойной связи $C_{14}-C_{16}$ соединения **255** получали с помощью программы ChemAxon Marvin (conformers plugin), затем проводили оптимизацию структур методом RM1 по программе MOPAC2009. Для структур, обладающих наименьшей энергией, искали конформеры с использованием систематического генератора – Confab, и затем проводили оптимизацию методом DFT (функционал PBE, базис L1 (Λ01, аналог cc-pVDZ), программа ПРИРОДА). Химические сдвиги считали методом GIAO/DFT/PBE (базис L22 (Λ22, аналог cc-pCVTZ), программа ПРИРОДА). Квантовохимические расчеты проводили на кластере информационно-вычислительного центра Новосибирского государственного университета.

(10S,4Z)-4-(Бензилиден)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-246. Жёлтый аморфный порошок.

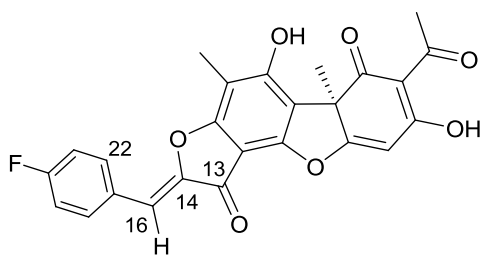
Выход 61%. Т.пл. 203 °C. $[\alpha]_D^{25} +267$ (c 0.45; $CHCl_3$).



Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д.): 1.78 (3H, с, H-15), 2.32 (3H, с, H-10), 2.67 (3H, с, H-12), 6.07 (1H, с, H-4), 6.81 (1H, с, H-16), 7.39 (1H, м, H-20), 7.46 (2H, м, H-19, H-21), 7.87 (2H, м, H-18, H-22), 11.42 (1H, с, OH-9), 18.86 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.50 (C-10), 27.86 (C-12), 31.96 (C-15),

58.70 (C-9b), 99.13 (C-4), 100.85 (C-6), 105.12 (C-2), 105.77 (C-8), 108.23 (C-9a), 112.12 (C-16), 128.81 (C-18, C-22), 129.69 (C-20), 131.23 (C-19, C-21), 132.13 (C-17), 147.44 (C-14), 149.81 (C-5a), 159.36 (C-9), 165.72 (C-7), 179.57 (C-13, C-4a), 191.62 (C-3), 197.86 (C-1), 201.79 (C-11). Найдено: m/z 430.1039 $[M]^+$ $C_{25}H_{18}O_7$. Вычислено: $M = 430.1047$.

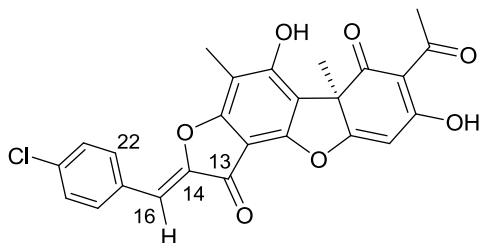
(10*S*,4*Z*)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(4-фторбензилиден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-247. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 61%. Т.пл. 198 °С. $[\alpha]_D^{20} +281$ (*c* 0.4; CHCl₃).

Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д.): 1.75 (3H, с, Н-15), 2.26 (3H, с, Н-10), 2.66 (3H, с, Н-12), 6.04 (1H, с, Н-4), 6.69 (1H, с, Н-16), 7.10 (2H, м, Н-19, Н-21), 7.81 (2H, м, Н-18, Н-22), 11.39 (1H, с, ОН-9), 18.84 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д., J/Гц): 7.48 (C-10), 27.82 (C-12), 31.95 (C-15), 58.67 (C-9b), 99.10 (C-4), 100.76 (C-6), 105.10 (C-2), 105.69 (C-8), 108.27 (C-9a), 110.67 (C-16), 116.00 (д, J_{C-F} = 22 Гц, C-19, C-21), 128.43 (д, J_{C-F} = 3.18 Гц, C-17), 133.10 (д, J_{C-F} = 8.41 Гц, C-18, C-22), 147.01 (д, J_{C-F} = 2.64 Гц, C-14), 149.76 (C-5a), 159.29 (C-9), 163.00 (д, J_{C-F} = 252.39 Гц, C-20), 165.55 (C-7), 179.22 (C-4a), 179.48 (C-13), 191.60 (C-3), 197.82 (C-1), 201.77 (C-11).
Найдено: *m/z* 448.0957 [M]⁺ C₂₅H₁₇O₇F₁. Вычислено: M = 448.0953.

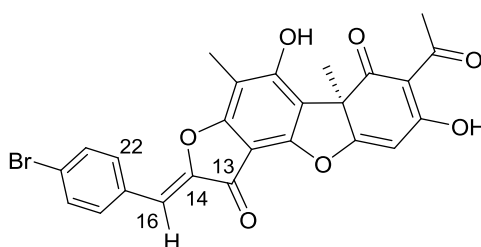
(10*S*,4*Z*)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(4-хлорбензилиден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-248. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 55%. Т.пл. 217 °С. $[\alpha]_D^{20} +262$ (*c* 0.3; CHCl₃).

Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д.): 1.75 (3H, с, Н-15), 2.26 (3H, с, Н-10), 2.66 (3H, с, Н-12), 6.04 (1H, с, Н-4), 6.67 (1H, с, Н-16), 7.36 (2H, м, Н-19, Н-21), 7.74 (2H, м, Н-18, Н-22), 11.41 (1H, с, ОН-9), 18.84 (1H, с, ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.49 (C-10), 27.84 (C-12), 31.96 (C-15), 58.66 (C-9b), 99.14 (C-4), 100.68 (C-6), 105.12 (C-2), 105.75 (C-8), 108.35 (C-9a), 110.42 (C-16), 129.06 (C-19, C-21), 130.64 (C-17), 132.21 (C-18, C-22), 135.54 (C-14), 147.52 (C-20), 149.80 (C-5a), 159.41 (C-9), 165.53 (C-7), 179.15 (C-4a), 179.43 (C-13), 191.59 (C-3), 197.81 (C-1), 201.77 (C-11).
Найдено: *m/z* 464.0660 [M]⁺ C₂₅H₁₇O₇Cl₁. Вычислено: M = 464.0657.

(10*S*,4*Z*)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(4-бромбензилиден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-249. Жёлтый аморфный порошок.

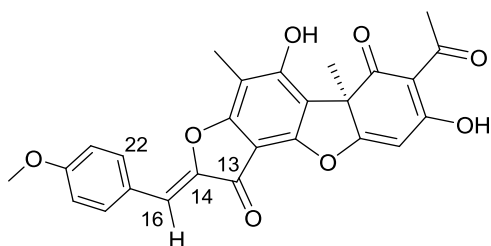


Выход 53%. Т.пл. 218-219 °С. $[\alpha]_D^{20} +406$ (*c* 0.3; CHCl₃).

Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д.): 1.76 (3H, с, Н-15), 2.28 (3H, с, Н-10), 2.65 (3H, с, Н-12), 6.06 (1H, с, Н-4), 6.72 (1H, с, Н-16), 7.56 (2H, м, Н-19, Н-21), 7.70 (2H, м, Н-18, Н-22), 11.44 (1H, с, ОН-9), 18.84 (1H, с, ОН-3).

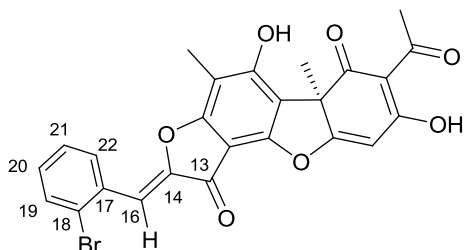
ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.19 (C-10), 27.53 (C-12), 31.63 (C-15), 58.35 (C-9b), 98.88 (C-4), 100.41 (C-6), 104.81 (C-2), 105.49 (C-8), 108.05 (C-9a), 110.23 (C-16), 123.72 (C-20), 130.76 (C-17), 131.75 (C-19, C-21), 132.10 (C-18, C-22), 147.36 (C-14), 149.54 (C-5a), 159.18 (C-9), 165.28 (C-7), 178.97 (C-4a), 179.14 (C-13), 191.30 (C-3), 197.51 (C-1), 201.48 (C-11). Найдено: m/z 508.0161 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{Br}_1$. Вычислено: $M = 508.0152$.

(10*S*,4*Z*)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(4-метоксибензилиден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-251. Жёлтый аморфный порошок.



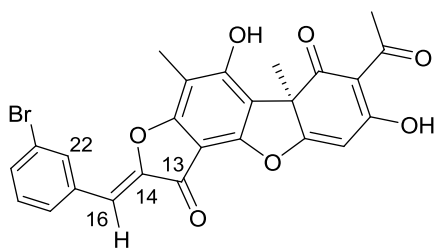
Выход 65%. Т.пл. 258-260 °С. $[\alpha]_{\text{D}} +300$ (c 0.45; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 1.75 (3H, с, H-15), 2.29 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 3.84 (3H, с, H-23), 6.04 (1H, с, H-4), 6.78 (1H, с, H-16), 6.95 (2H, м, H-19, H-21), 7.81 (2H, м, H-18, H-22), 11.34 (1H, с, OH-9), 18.83 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.54 (C-10), 27.88 (C-12), 32.00 (C-15), 55.28 (C-23), 58.80 (C-9b), 99.06 (C-4), 102.93 (C-6), 105.14 (C-2), 105.65 (C-8), 108.06 (C-9a), 112.38 (C-16), 114.43 (C-19, C-21), 124.92 (C-17), 133.10 (C-18, C-22), 146.42 (C-14), 149.81 (C-5a), 158.99 (C-9), 160.85 (C-20), 165.56 (C-7), 179.42 (C-4a), 179.77 (C-13), 191.65 (C-3), 197.94 (C-1), 201.79 (C-11). Найдено: m/z 460.1148 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_8$. Вычислено: $M = 460.1153$.

(10*S*,4*Z*)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-4-(*o*-бромфенилметилен)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-252. Жёлтый аморфный порошок.



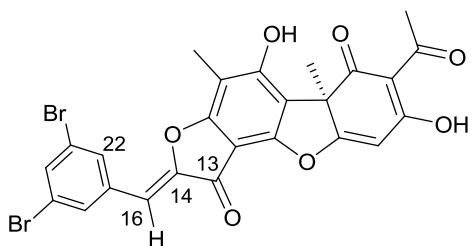
Выход 58%. Т.пл. 230 °С с разложением. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.25 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 6.06 (1H, с, H-4), 7.19 (1H, с, H-16), 7.19 (H, т, $J = 7.7$, H-20), 7.39 (H, т, $J = 7.7$, H-21), 7.61 (H, д, $J = 7.7$, H-22), 8.23 (H, д, $J = 7.7$, H-19), 11.44 (1H, с, OH-9), 18.85 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.49 (C-10), 27.90 (C-12), 31.95 (C-15), 58.65 (C-9b), 99.19 (C-4), 100.67 (C-6), 105.11 (C-2), 105.81 (C-8), 108.36 (C-9a), 109.63 (C-16), 126.35 (C-18), 131.92 (C-17), 127.57, 130.49, 131.84 (C-20, C-21 и C-22), 133.30 (C-19), 148.17 (C-14), 149.89 (C-5a), 159.49 (C-9), 165.63 (C-7), 179.15 (C-4a), 179.49 (C-13), 191.61 (C-3), 197.80 (C-1), 201.82 (C-11). Найдено: m/z 508.0161 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{Br}_1$. Вычислено: $M = 508.0152$

(10*S*,4*Z*)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-4-(*m*-бромфенилметилен)-5,16-диоксатетрацикло [7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}] гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-253. Жёлтый аморфный порошок.



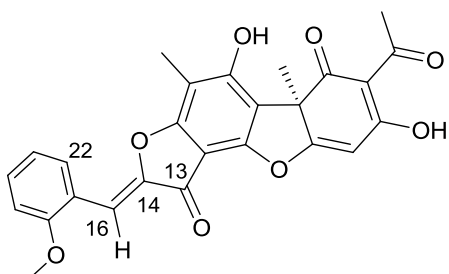
Выход 30%. Т.пл. 218-219 °С. $[\alpha]_D^{20} +406$ (с 0.3; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.28 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 6.05 (1H, с, H-4), 6.67 (1H, с, H-16), 7.29 (H, дд, H-19), 7.49 (H, д, H-18), 7.72 (H, д, H-20), 8.02 (H, с, H-22), 11.44 (1H, с, OH-9), 18.84 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.45 (C-10), 27.84 (C-12), 31.93 (C-15), 58.64 (C-9b), 99.20 (C-4), 100.60 (C-6), 105.10 (C-2), 105.88 (C-8), 108.39 (C-9a), 109.97 (C-16), 122.78 (C-21), 129.55, 130.19, 132.30 и 133.68 (C-18, C-19, C-20 и C-22), 134.17 (C-17), 147.94 (C-14), 149.88 (C-5a), 159.61 (C-9), 165.62 (C-7), 179.21 (C-4a), 179.41 (C-13), 191.59 (C-3), 197.79 (C-1), 201.79 (C-11). Найдено: m/z 508.0161 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{Br}_1$. Вычислено: $M = 508.0152$

(4Z,10R)-12-acetyl-4-[(3,5-dibromophenyl)methylidene]-8,13-dihydroxy-7,10-dimethyl-5,16-dioxatetracyclo[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]hexadeca-1,6,8,12,14-pentaene-3,11-dione (+)-254. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 62%. Т.пл. 176-178 °С. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.79 (3H, с, H-15), 2.32 (3H, с, H-10), 2.68 (3H, с, H-12), 6.08 (1H, с, H-4), 6.62 (1H, с, H-16), 7.66 (1H, т, $J = 1.7$, H-20), 7.94 (2H, д, $J = 1.7$, H-18), 11.53 (1H, с, OH-9), 18.84 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.41 (C-10), 27.83 (C-12), 31.86 (C-15), 58.60 (C-9b), 99.31 (C-4), 100.40 (C-6), 105.12 (C-2), 105.94 (C-8), 108.31 (C-16), 108.55 (C-9a), 123.11 (2C-19), 132.24 (2C-18), 134.45 (C-20), 135.56 (C-17), 148.48 (C-14), 150.02 (C-5a), 159.75 (C-9), 165.54 (C-7), 179.04 (C-4a), 179.22 (C-13), 191.03 (C-3), 197.78 (C-1), 201.23 (C-11). Найдено: m/z 585.9250 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{O}_7\text{Br}_2$. Вычислено: $M = 585.9257$

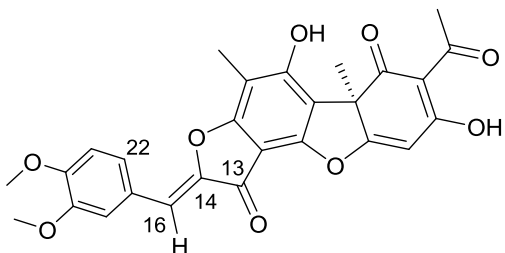
(10S,4Z)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(2-метоксибензилиден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-255. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 74%. Т.пл. 206-208 °С. $[\alpha]_D^{20} +362$ (с 0.4; CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.76 (3H, с, H-15), 2.29 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-14), 3.89 (3H, с, H-23), 6.06 (1H, с, H-4), 6.91 (1H, дд, $J_{19,20}=8.3$, $J_{19,21}=0.7$, H-19), 7.05 (1H, ддд, $J_{21,22}=7.8$, $J_{21,20}=7.4$, $J_{21,19}=0.7$, H-21), 7.35 (1H, ддд, $J_{20,19}=8.3$, $J_{20,21}=7.4$, $J_{20,22}=1.7$, H-20), 7.39 (1H, с, H-16), 8.23 (1H, дд, $J_{22,21}=7.8$, $J_{22,20}=1.7$, H-22), 11.37 (1H, с, OH-9), 18.86 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.54 (C-10), 27.94 (C-12), 31.99 (C-15), 55.46 (C-23), 58.77 (C-9b), 99.08 (C-4), 101.14 (C-6), 105.11 (C-2), 105.69 (C-8), 106.26 (C-16), 108.02 (C-9a), 110.63 (C-

19), 120.75 (C-21), 121.15 (C-17), 131.29 (C-20), 131.56 (C-22), 147.49 (C-14), 149.74 (C-5a), 158.65 (C-18), 159.06 (C-9), 165.62 (C-7), 179.60 (C-13), 179.76 (C-4a), 191.65 (C-3), 197.91 (C-1), 201.82 (C-11). Найдено: m/z 460.1154 $[M]^+$ C₂₆H₂₀O₈. Вычислено: M = 460.1153.

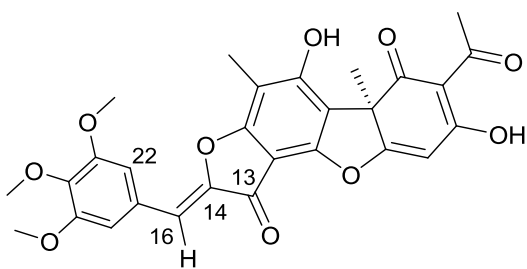
(10S,4Z)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(3,4-диметоксибензилиден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-256. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 60%. Т.пл. 230 °С с разл. $[\alpha]_D +273$ (с 0.2; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.74 (3H, с, H-15), 2.26 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 3.91, 3.95 (6H, 2с, H-23, H-24), 6.02 (1H, с, H-4), 6.72 (1H, с, H-16), 6.88 (1H, д, J=8.5, H-21), 7.30 (1H, м, H-22), 7.54 (1H, д, J=1.9, H-18), 11.38 (1H, с, OH-9), 18.84 (1H, с,

ОН-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.34 (C-10), 27.84 (C-12), 32.02 (C-15), 55.50, 55.79 (C-23, C-24), 58.72 (C-9b), 99.00 (C-4), 101.08 (C-6), 105.08 (C-2), 105.31 (C-8), 108.09 (C-9a), 110.95 (C-18), 112.53 (C-16), 112.85 (C-21), 125.08 (C-17), 125.81 (C-22), 146.36 (C-14), 148.80 (C-20), 149.69 (C-5a), 150.49 (C-19), 158.09 (C-9), 165.34 (C-7), 179.10 (C-13), 179.56 (C-4a), 191.60 (C-3), 197.85 (C-1), 201.79 (C-11). Найдено: m/z 490.1254 $[M]^+$ C₂₇H₂₂O₉. Вычислено: M = 490.1258.

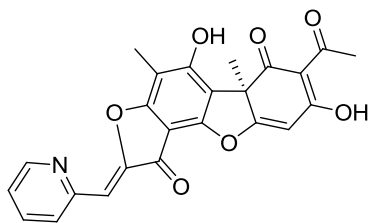
(10S,4Z)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(3,4,5-триметоксибензилиден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-257. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 72%. Т.пл. 174-176 °С. $[\alpha]_D +224$ (с 0.4; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.72 (3H, с, H-15), 2.23 (3H, с, H-10), 2.63 (3H, с, H-12), 3.87 (3H, с, H-24), 3.89 (6H, с, H-23, H-25), 6.02 (1H, с, H-4), 6.65 (1H, с, H-16), 7.09 (2H, с, H-18, H-22), 11.39 (1H, с, OH-9), 18.82 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C

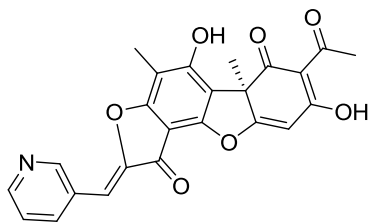
(CDCl₃, δ, м.д.): 7.28 (C-10), 27.80 (C-12), 31.98 (C-15), 55.80 (C-24, C-25), 58.67 (C-9b), 60.83 (C-23), 99.11 (C-4), 100.87 (C-6), 105.09 (C-2), 105.32 (C-8), 108.24 (C-9a), 108.30 (C-18, C-22), 112.23 (C-16), 127.43 (C-17), 139.56 (C-20), 146.95 (C-14), 149.79 (C-5a), 153.04 (C-19, C-21), 159.15 (C-9), 165.41 (C-7), 179.11 (C-4a), 179.47 (C-13), 191.61 (C-3), 197.80 (C-1), 201.79 (C-11). Найдено: m/z 520.1374 $[M]^+$ C₂₈H₂₄O₁₀. Вычислено: M = 520.1364.

(10S,4Z)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-4-(2-пиридинилметилен) -5,16-диоксатетрацикло [7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}] гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-258. Жёлтый аморфный порошок.



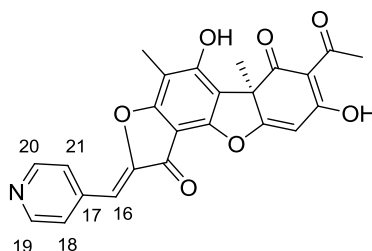
Выход 45%, Т.пл. 200 °С с разл., $[\alpha]_D^{20} +1084$ (с 0.18, CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.76 (3H, с, H-15), 2.29 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 6.05 (1H, с, H-4), 6.95 (1H, с, H-16), 7.24 (1H, дд, H-20, $J = 4.0$ и 7.8 Hz), 7.78 (1H, дд, H-19, $J = 1.7$ и 7.8 Hz), 8.14 (1H, д, H-18, $J = 7.8$ Hz), 8.69 (1H, д, H-21, $J = 4.0$ Hz), 11.46 (1H, с, 9-OH), 18.83 (1H, с, 3-OH). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.54 (C-10), 27.84 (C-12), 31.93 (C-15), 58.64 (C-9b), 99.25 (C-4), 100.58 (C-6), 105.14 (C-2), 105.90 (C-8), 108.456 (C-9a), 111.65 (C-16), 123.08 (C-20), 126.10 (C-18), 136.40 (C-19), 148.84 (C-14), 150.07 (C-21), 150.07 (C-5a), 151.83 (C-17), 159.73 (C-9), 165.82 (C-7), 177.31 и 179.35 (C-13, C-4a), 191.60 (C-3), 197.84 (C-1), 201.81 (C-11). Найдено: m/z 431.1006 $[\text{M}]^+ \text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{NO}_7$. Вычислено: $M = 431.1000$

(10R,4Z)-4-(Пиридин-3-илметил)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0.2,6.0.10,15]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-259.
Жёлтый аморфный порошок.



Выход 66%, т. пл. $>200^\circ\text{C}$ с разложением, $[\alpha]_D^{20} +1084$ (с 0.18, CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.26 (3H, с, H-10), 2.64 (3H, с, H-12), 6.04 (1H, с, H-4), 6.72 (1H, с, H-16), 7.38 (1H, дд, H-19, $J = 3.4$ и 7.8 Hz), 8.18 (1H, д, H-18, $J = 7.8$ Hz), 8.56 (1H, д, H-20, $J = 3.4$ Hz), 8.99 (1H, с, H-21), 11.47 (1H, с, 9-OH), 18.85 (1H, с, 3-OH). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.47 (C-10), 27.84 (C-12), 31.88 (C-15), 58.54 (C-9b), 99.24 (C-4), 100.46 (C-6), 105.05 (C-2), 105.87 (C-8), 107.80 (C-16), 108.45 (C-9a), 123.67 (C-18), 128.41 (C-17), 137.38 (C-19), 148.57 (C-14), 149.70 (C-20), 149.88 (C-5a), 151.80 (C-21), 159.69 (C-9), 165.52 (C-7), 178.97 and 179.25 (C-13, C-4a), 191.54 (C-3), 197.71 (C-1), 201.78 (C-11). Найдено: m/z 431.1006 $[\text{M}]^+ \text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{NO}_7$. Вычислено: $M = 431.1000$

(10R,4Z)-4-(Пиридин-4-илметил)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0.2,6.0.10,15]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-260.
Жёлтый аморфный порошок.



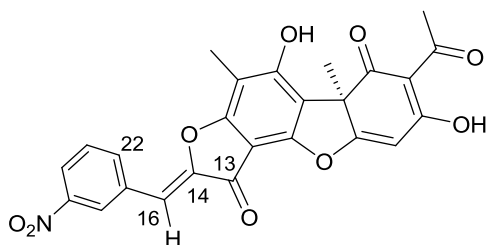
Выход 60%, т. пл. $>240^\circ\text{C}$ с разложением, $[\alpha]_D^{20} +1107$ (с 0.08, CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.76 (3H, с, H-15), 2.29 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 6.06 (1H, с, H-4), 6.65 (1H, с, H-16), 7.67 (2H, д, H-18,21, $J = 5.0$ Hz), 8.68 (2H, д, H-19,20, $J = 5.0$ Hz), 11.55 (1H, с, 9-OH), 18.88 (1H, с, 3-OH). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.52 (C-10), 27.84 (C-12), 31.86 (C-15), 58.49 (C-9b), 99.39 (C-4), 100.21 (C-6), 105.07 (C-2), 106.00 (C-8), 108.10 (C-9a), 108.64 (C-16), 124.32 (C-18,21), 139.35

(C-17), 150.18 (C-19,20), 149.75 (C-14), 150.03 (C-5a), 160.06 (C-9), 165.63 (C-7), 179.07 and 179.11 (C-13, C-4a), 191.53 (C-3), 197.69 (C-1), 201.82 (C-11). Найдено: m/z 431.1009 [M]⁺ C₂₄H₁₇NO₇. Вычислено: M = 431.1000.

Синтез соединений 250, 261-269.

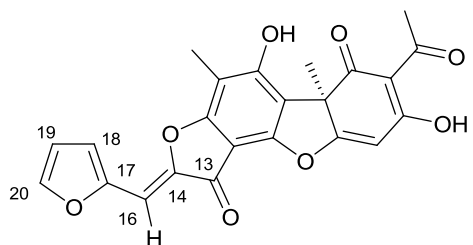
К раствору 1 ммоль соединения **211** в 24 мл MeOH добавили 1.1 ммоль соответствующего альдегида, 1 мл 50% водного раствора KOH и перемешивали при комнатной температуре в течение 1.5 часов. Затем реакционную смесь разбавили водой (до ~50-60 мл), подкислили HCl (1:4) до pH = 3-4. Экстрагировали CH₂Cl₂ (3×10 мл), сушили над прокаленным MgSO₄, удаляли растворитель и хроматографировали остаток на колонке с силикагелем, элюент – CH₂Cl₂.

(10S,4Z)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(3-нитробензилиден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-250. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 167 мг (35%). Т.пл. 230 °С с разл. $[\alpha]_D +364$ (*c* 0.2; CH₂Cl₂). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.80 (3H, с, H-15), 2.34 (3H, с, H-10), 2.66 (3H, с, H-12), 6.09 (1H, с, H-4), 6.77 (1H, с, H-16), 7.64, 8.12, 8.21 (3H, 3м, H-20, H-21, H-22), 8.83 (4H, с, H-18), 11.53 (1H, с, OH-9), 18.88 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CD₂Cl₂, δ, м.д.): 6.34 (C-10), 27.26 (C-12), 31.34 (C-15), 58.39 (C-9b), 98.81 (C-4), 100.05 (C-6), 104.89 (C-2), 105.63 (C-8), 107.73 (C-16), 108.49 (C-9a), 123.21, 124.81, 129.43, 136.06 (C-18, C-19, C-20, C-21), 133.60 (C-17), 148.17 (C-14), 148.46 (C-5a), 159.57 (C-9), 165.33 (C-7), 178.45 (C-4a), 179.09 (C-13), 191.38 (C-3), 197.70 (C-1), 201.62 (C-11). Найдено: m/z 475.0895 [M]⁺ C₂₅H₁₇O₉N₁. Вычислено: M = 475.0898.

(10S,4Z)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(фуран-2-илметилен)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-261. Жёлтый аморфный порошок.

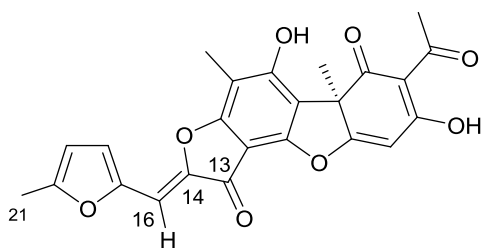


Выход 65%. Т.пл. 188-192 °С. $[\alpha]_D +365$ (*c* 0.3; CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J Гц): 1.76 (3H, с, H-15), 2.29 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 6.05 (1H, с, H-4), 6.59 (1H, с, H-16), 6.83 (1H, м, H-19), 7.07 (1H, м, H-18), 7.58 (1H, м, H-20), 11.38 (1H, с, OH-9), 18.83 (1H, с, OH-3). ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ, м.д.): 7.41 (C-10), 27.89 (C-12), 31.96 (C-15), 58.72 (C-9b), 99.13 (C-4), 101.30 (C-6), 100.84 (C-19), 105.13 (C-2), 105.80 (C-8), 108.19 (C-9a), 113.01 (C-18), 116.69 (C-16), 145.03 (C-20), 145.70 (C-14), 148.65 (C-17), 149.67 (C-5a), 159.21 (C-9), 165.30 (C-7),

178.78 (C-4a), 179.63 (C-13), 191.64 (C-3), 197.89 (C-1), 201.81 (C-11). Найдено: m/z 420.0839 $[M]^+$ $C_{23}H_{16}O_8$. Вычислено: $M = 420.0840$.

(10R,4Z)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(фуран-2-илметилден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (-)-261. $[\alpha]_D -360$ (c 0.40; $CHCl_3$).

(10S,4Z)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(5-метилфуран-2-илметилден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-262. Жёлтый аморфный порошок.

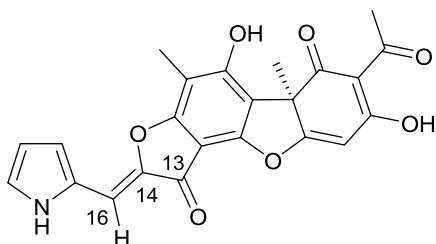


Выход 63%. Т.пл. 220 °С с разложением. Спектр

ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.26 (3H, с, H-10), 2.38 (3H, с, H-21), 2.64 (3H, с, H-12), 6.03 (1H, с, H-4), 6.20 (1H, д, H-19), 7.05 (1H, м, H-16), 6.98 (1H, д, H-18), 11.34 (1H, с, OH-9), 18.81 (1H, с, OH-3).

ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.05 (C-10), 13.56 (C-21), 27.54 (C-12), 31.63 (C-15), 58.44 (C-9b), 98.71 (C-4), 101.13 (C-19), 104.78 (C-6), 105.36 (C-2), 106.62 (C-8), 107.74 (C-9a), 109.55 (C-18), 118.44 (C-16), 144.58 (C-17), 146.85 (C-14), 149.48 (C-5a), 155.77 (C-20), 158.62 (C-9), 164.80 (C-7), 178.40 (C-4a), 179.39 (C-13), 191.30 (C-3), 197.60 (C-1), 201.46 (C-11). Найдено: m/z 434.0990 $[M]^+$ $C_{24}H_{18}O_8$. Вычислено: $M = 434.0996$.

(4Z,10R)-12-ацетил-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-4-[(1H-пиррол-2-ил)метилен]-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-263. Жёлтый аморфный порошок.

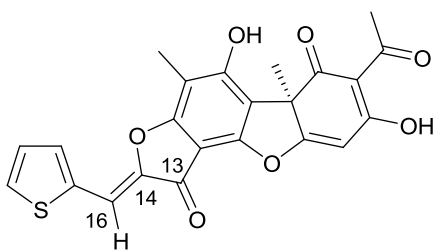


Выход 45%. Т.пл. 143-146 °С. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$,

δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.21 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 6.04 (1H, с, H-4), 6.36 (1H, м, H-19), 6.64 (1H, м, H-18), 6.96 (1H, с, H-16), 7.08 (1H, м, H-20), 11.24 (1H, с, OH-9), 12.91 (1H, NH), 18.84 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ ,

м.д.): 7.20 (C-10), 27.88 (C-12), 32.03 (C-15), 58.92 (C-9b), 98.96 (C-4), 102.91 (C-6), 105.10 (C-2), 105.24 (C-8), 107.81 (C-9a), 111.98 (C-18), 114.21 (C-19), 119.14 (C-16), 124.04 (C-20), 126.80 (C-17), 145.07 (C-14), 149.58 (C-5a), 158.39 (C-9), 164.43 (C-7), 177.45 (C-4a), 179.85 (C-13), 191.63 (C-3), 197.92 (C-1), 201.74 (C-11). Найдено: m/z 419.1002 $[M]^+$ $C_{23}H_{17}NO_7$. Вычислено: $M = 419.1005$.

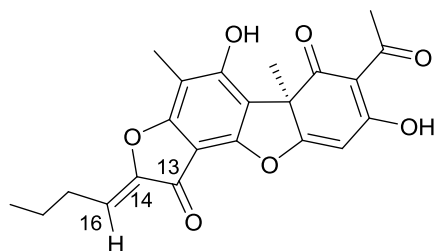
(4Z,10R)-12-ацетил-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-4-[(тиофен-2-ил)метилен]-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2,6}.0^{10,15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-264. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 75%. Т.пл. > 220 °С с разложением. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.75 (3H, с, H-15), 2.31 (3H, с, H-10), 2.65 (3H, с, H-12), 6.05 (1H, с, H-4), 7.10 (1H, с, H-16), 7.12 (1H, м, H-19), 7.46 (1H, д, J = 3.6, H-18), 7.58 (1H, д, J = 5.0, H-20), 11.38 (1H, с, OH-9), 18.84 (1H, с, OH-3).

ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.53 (C-10), 27.92 (C-12), 31.98 (C-15), 58.74 (C-9b), 99.12 (C-4), 101.51 (C-6), 105.13 (C-2), 105.90 (C-8), 106.25 (C-16), 108.21 (C-9a), 127.85 (C-19), 131.51 (C-18), 132.72 (C-20), 135.50 (C-17), 145.92 (C-14), 149.66 (C-5a), 159.22 (C-9), 165.28 (C-7), 178.70 (C-4a), 179.63 (C-13), 191.64 (C-3), 197.88 (C-1), 201.82 (C-11). Найдено: m/z 436.0608 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{O}_7\text{S}$. Вычислено: $M = 436.0611$.

(10S)-4-(Бутилиден)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-265. Жёлтый аморфный порошок.

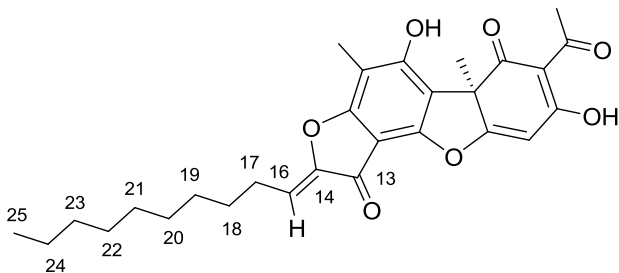


Выход 20%. Т.пл. 65-70 °С. $[\alpha]_D +242$ (с 0.5; CHCl_3).

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 1.00 (3H, т, J = 7.4 Гц, H-19), 1.58 (2H, к, J=7.4, H-18), 1.75 (3H, с, H-15), 2.21 (3H, с, H-10), 2.43 (2H, к, J=7.4, H-17), 2.66 (3H, с, H-12), 6.04 (1H, с, H-4), 6.10 (1H, т, J=7.9, H-16), 11.32 (1H, с, OH-9), 18.84 (1H, с, OH-3).

ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.39 (C-10), 13.75 (C-19), 21.76 (C-18), 27.80 (C-12), 29.55 (C-17), 31.98 (C-15), 58.74 (C-9b), 99.04 (C-4), 105.03 (C-6), 105.09 (C-2), 106.60 (C-8), 109.20 (C-9a), 116.60 (C-16), 149.50 (C-14), 149.63 (C-5a), 157.42 (C-9), 171.15 (C-7), 179.20 (C-4a), 179.30 (C-13), 191.63 (C-3), 197.92 (C-1), 201.78 (C-11). Найдено: m/z 396.1207 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_7$. Вычислено: $M = 396.1204$.

(10S)-8,13-Дигидрокси-7,10-диметил-4-(децилиден)-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-266. Жёлтый аморфный порошок.



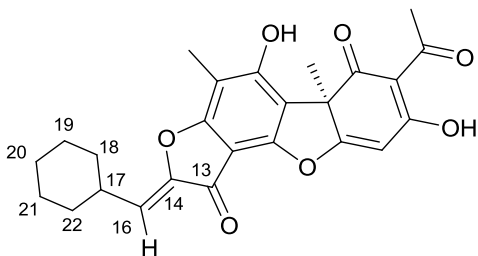
Выход 13%. Т.пл. 65-70 °С. $[\alpha]_D +304$ (с 0.4; CHCl_3).

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 0.84 (3H, т, J=7.4, H-25), 1.24 (H, м, H-19 – H-24), 1.53 (2H, м, H-18), 1.74 (3H, с, H-15), 2.19 (3H, с, H-10), 2.42 (2H, к, J=7.4, H-17), 2.64 (3H, с, H-12), 6.03 (1H, с, H-4), 6.08 (1H, т, J=7.9, H-16), 11.30 (1H, с, OH-9), 18.82 (1H, с, OH-3).

ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.20 (C-10), 13.97 (C-25), 22.54 (C-24), 25.60, 28.41 – 29.48 (C-18 – C-23), 27.87 (C-12), 31.95 (C-17), 58.75 (C-9b), 99.03 (C-4), 101.4 (C-6), 105.10 (C-2), 105.52 (C-8), 107.66 (C-9a), 116.66 (C-16), 149.52

(C-14), 149.77 (C-5a), 159.21 (C-9), 165.84 (C-7), 178.80 (C-4a), 179.77 (C-13), 191.64 (C-3), 197.93 (C-1), 201.77 (C-11). Найдено: m/z 480.2144 $[M]^+$ $C_{28}H_{32}O_7$. Вычислено: $M = 480.2143$.

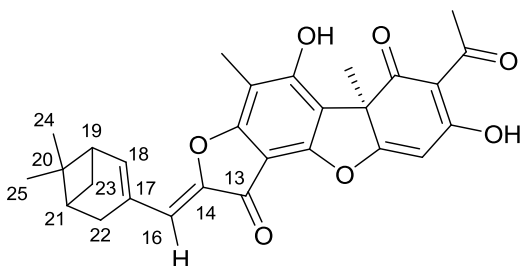
(4Z,10R)-12-ацетил-4-(циклогексилметилен)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-267. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 46%. Т.пл. 110 °С. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 1.23-1.39 (3H, м, H-19 и H-20 и H-21), 1.73 (3H, с, H-15), 1.78 (2H, м, H-18 и H-22), 2.20 (3H, с, H-10), 2.64 (3H, с, H-12), 2.69 (1H, м, H-17), 5.95 (1H, д, J = 9.5, H-16), 6.04 (1H, с, H-4), 11.30 (1H, с, OH-9), 18.83

(1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.28 (C-10), 25.32 (C-19 и C-21), 25.33 (C-20), 27.87 (C-12), 31.94 (C-15), 31.97 (C-18 и C-22), 35.19 (C-17), 58.74 (C-9b), 99.01 (C-4), 101.56 (C-6), 105.08 (C-2), 105.49 (C-8), 107.61 (C-9a), 121.27 (C-16), 147.99 (C-14), 149.70 (C-5a), 159.17 (C-9), 165.85 (C-7), 179.25 (C-4a), 179.76 (C-13), 191.62 (C-3), 197.91 (C-1), 201.75 (C-11). Найдено: m/z 436.1512 $[M]^+$ $C_{25}H_{24}O_7$. Вычислено: $M = 436.1517$.

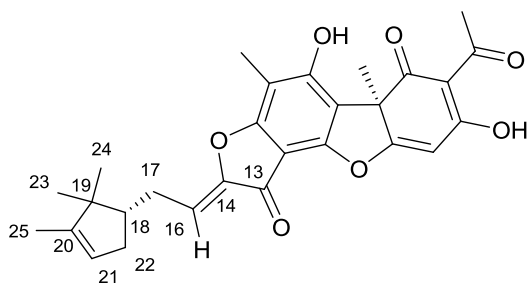
(4Z,10R)-12-ацетил-4-({6,6-диметилбицикло[3.1.1]гепт-2-ен-3-ил}метилен)-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-268. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 34%. Т.пл. 153-154 °С. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J Гц): 0.87 (3H, с) и 1.40 (3H, с) – H-24 и H-25, 1.26 (1H, м, H-23), 1.76 (3H, с, H-15), 2.16 (1H, м, H-23), 2.24 (3H, с, H-10), 2.47-2.59 (3H, м, 2H-22 и H-21), 2.68 (3H, с, H-12), 3.12 (1H, ш.т, J = 5.5,

H-19), 6.07 (1H, с, H-4), 6.42 (1H, с, H-16), 6.40 (1H, м, H-18), 11.34 (1H, с, OH-9), 18.88 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 7.30 (C-10), 21.03 и 26.05 (C-24 и C-25), 27.85 (C-12), 31.21 (C-23), 31.90 (C-15), 33.23 (C-22), 37.57 (C-20), 39.84 (C-21), 44.27 (C-19), 58.70 (C-9b), 98.92 (C-4), 101.06 (C-6), 105.03 (C-2), 105.35 (C-8), 107.76 (C-9a), 113.76 (C-16), 136.51 (C-18), 143.06 (C-17), 145.49 (C-14), 149.42 (C-5a), 158.69 (C-9), 165.24 (C-7), 179.59 (C-4a), 179.75 (C-13), 191.56 (C-3), 197.84 (C-1), 201.70 (C-11). Найдено: m/z 474.1666 $[M]^+$ $C_{28}H_{26}O_7$. Вычислено: $M = 474.1673$.

(4Z,10R)-12-ацетил-8,13-дигидрокси-7,10-диметил-4-{2-[(1S)-2,2,3-триметилциклопент-3-ен-1-ил]этилиден}-5,16-диоксатетрацикло[7.7.0.0^{2.6}.0^{10.15}]гексадека-1,6,8,12,14-пентаен-3,11-дион (+)-269. Жёлтый аморфный порошок.



Выход 41%. Т.пл. 79-80 °С. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 0.85 (3H, с) и 1.02 (3H, с) – H-23 и H-24, 1.60 (3H, м, H-25), 1.73 (3H, с, H-15), 1.95 (2H, м, H-18 и H-17), 2.19 (3H, с, H-10), 2.34 (1H, м) и 2.40 (1H, м) и 2.54 (1H, м) – H-17 и 2H-22, 2.64 (3H, с, H-12), 5.20 (1H, м, H-21), 6.03 (1H, с, H-4), 6.13 (1H, т, J = 8.0, H-16), 11.31 (1H, с, OH-9), 18.83 (1H, с, OH-3). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.18 (C-10), 12.49 и 25.73 (C-23 и C-24), 19.62 (C-25), 26.44 (C-17), 27.85 (C-12), 31.91 (C-15), 35.45 (C-22), 46.85 (C-19), 49.49 (C-18), 58.69 (C-9b), 98.98 (C-4), 101.58 (C-6), 105.05 (C-2), 105.48 (C-8), 107.63 (C-9a), 116.29 (C-16), 121.35 (C-21), 148.18 (C-20), 149.65 (C-14), 149.72 (C-5a), 159.16 (C-9), 165.74 (C-7), 178.62 (C-4a), 179.70 (C-13), 191.59 (C-3), 197.86 (C-1), 201.73 (C-11). Найдено: m/z 476.1823 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{O}_7$. Вычислено: $M = 476.1830$.

6. ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы направленного синтеза эфиров усниновой кислоты по гидроксильным группам, позволяющие получать метиловый или полифторсодержащие эфиры УК по фенольной группе у 7-го атома углерода. Показано, что синтез метилового эфира селективно по 9-ому фенольному гидроксилу протекает при действии диазометана после разрушения связывающей его водородной связи.

2. Изучено взаимодействие усниновой кислоты и некоторых ее производных с диазометаном. Показано, что реакция протекает по нескольким направлениям, среди которых расширение цикла, образование оксиранового цикла по карбонильной группе и метилирование фенольного гидроксила. Модификация условий реакции способствует более глубокому взаимодействию с вовлечением в реакцию пяти молекул диазометана и приводит к образованию соединений с аннелированными кольцу А усниновой кислоты пирановым и фурановым циклами.

3. Показано, что восстановление карбонильных групп усниновой кислоты комплексными гидридами бора проходит последовательно. Наиболее реакционноспособна эндоциклическая карбонильная группа, восстановление её протекает стереоселективно. Карбонильная группа ($C^{13}=O$) восстанавливается лишь при повышенной температуре и не стереоселективно. Изучение механизма реакции позволяет предположить, что восстановление карбонильной группы ($C^{13}=O$) протекает через образование парахинонметидного интермедиата.

4. Разработан новый метод окисления усниновой кислоты и ее производных органическими надкислотами. Показано, что взаимодействие происходит по кольцу А усниновой кислоты и сопровождается разрушением ароматической системы и образованием соединений, содержащих эпоксидные циклы. Установлено, что эпоксидирование двойной связи протекает стереоспецифично.

5. Разработан один из наиболее удобных и перспективных путей к дальнейшей функционализации усниновой кислоты – электрофильное бромирование. Показано, что реакция протекает селективно по ацетильной группе в кольце А усниновой кислоты.

6. Реакцией бромпроизводных усниновой кислоты и её метилового эфира с серуцентрированными нуклеофилами синтезированы библиотеки новых серусодержащих производных. Реакцией с тиолами получены тиоэфиры, дальнейшее окисление которых приводит к сульфонам. Изучены возможности хирального окисления тиоэфиров в сульфоксиды. Реакцией с тиоамидами, замещёнными тиомочевинами и замещёнными

тиосемикарбазидами синтезированы производные усниновой кислоты, содержащие тиазольный цикл.

7. Изучены реакции бромпроизводных усниновой кислоты и её метилового эфира с O-, N-, и C-центрированными нуклеофилами. Показано, что в зависимости от условий реакции взаимодействие с кислородцентрированными нуклеофилами протекает либо по пути внутримолекулярной циклизации, либо с нуклеофильным замещением атома брома и образованием эфиров, либо в случае дибромпроизводного усниновой кислоты по двум этим направлениям одновременно. Установлено, что реакция бромпроизводного усниновой кислоты с N- и C-центрированными нуклеофилами приводит лишь к продукту внутримолекулярной циклизации, образование новых C-N и C-C связей возможно лишь на основе метилового эфира усниновой кислоты.

8. Разработан метод цианэтилирования усниновой кислоты, показано, что реакция идёт селективно по пути C-алкилирования в одной из двух ацильных групп. На основе производных усниновой кислоты синтезированы новые соединения, содержащие по два цианэтильных фрагмента.

9. Разработаны методы получения соединений с флавоноидными остовами на основе усниновой кислоты. Осуществлен четырёхстадийный синтез на базе остова усниновой кислоты соединений, содержащих структурный фрагмент халконов. Дальнейшей модификацией халконов синтезированы флавонолы, дигидрофлавонолы и флавоны. Исходя из бромпроизводного усниновой кислоты, по реакции с ароматическими и алифатическими альдегидами синтезированы соединения, содержащие структурный фрагмент ауронов.

10. На основе разработанных синтетических методов синтезированы библиотеки производных как (+)-, так и (-)-усниновых кислот. В результате биотестирования новых производных усниновой кислоты впервые выявлены соединения с существенными цитотоксическими свойствами в отношении некоторых опухолевых линий клеток крови, соединения, ингибирующие некоторые репарационные ферменты, вещества с противотуберкулёзной активностью, с вирусингибирующими свойствами в отношении вируса гриппа А, соединения, перспективные в качестве гиполипидемических агентов, а также производные, проявляющие инсектицидную активность в комбинации с биоагентом.

7. ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.

УК – усниновая кислота

Физико-химические методы:

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография;

ТСХ – тонкослойная хроматография.

РСА – рентгеноструктурный анализ

ЯМР – ядерный магнитный резонанс;

КССВ - константы спин-спинового взаимодействия

COSY – Correlation Spectroscopy – корреляционная спектроскопия;

NOE – Nuclear Overhauser Effect – ядерный эффект Оверхаузера;

NOESY - Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена;

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Connectivity – гетероядерная одноквантовая корреляция;

HMBC – Heteronuclear Multiple-Bond Correlation – гетероядерная многополосная корреляция;

DFT-метод - density functional theory - метод функционала плотности

Исследование биологической активности:

МИК₅₀ и **МИК₉₀** - минимальная концентрация вещества, угнетающая рост микроорганизмов для 50% и 90% исследованных штаммов соответственно;

ИК₅₀ - концентрация вещества, угнетающая рост микроорганизмов для 50% исследованных штаммов;

ЭД₇₀ и **ЭД₅₀** – эффективная доза – доза вещества, которая обеспечивает требуемый результат у 70% и 50% организмов соответственно;

МБК - минимальная бактерицидная концентрация вещества

ИК₅₀ - концентрация вещества, необходимая для 50 % ингибирования тестовой реакции, **ЛД₅₀** – количество потребленного вещества, которое вызывает летальный исход у 50% организмов;

ЛК₅₀, ЛК₉₀, ЛК₁₀₀ – концентрация вещества, которая вызывает летальный исход у 50, 90 и 100% организмов соответственно;

ЦТД₅₀ - цитотоксическая доза - концентрация соединения, при которой наблюдается гибель 50% клеток

ХТИ - химиотерапевтический индекс - отношение ЦТД₅₀ к ЭД₅₀.

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

АЛТ – аланинаминотрансфераза,

АСТ - аспаратаминотрансфераза;

АФК - активные формы кислорода,

АФА - активные формы азота

ПОЛ - перекисное окисление липидов

LDH – лактатдегидрогеназа

ДРРН - дифенил-2-пикрилгидразил.

ПАРП - поли(АДФ-рибозо)полимераза

ЭРО - эксцизионная репарация оснований

ЭРН - эксцизионная репарация нуклеотидов

пол β - полимераза β

Tdp1 - тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1

Top1 - топоизомераза 1

МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

Сокращения названий химических соединений:

DMSO, ДМСО – Dimethylsulfoxid – диметилсульфоксид;

DMF, ДМФА – Dimethylformamide – диметилформамид;

THF, ТГФ – Tetrahydrofuran – тетрагидрофуран;

ВОС – *трет*-бутоксикарбонил;

DMAP – 4-диметиламинопиридин;

МСРВА - *мета*-хлорнадбензойная кислота

МРРА - моноадфталевая кислота

DDQ – дихлордицианобензохинон

ТФУ - трифторуксусная кислота

ГМДС - гексаметилдисилан

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- ¹ Cocchietto M., Skert N., Nimis P.L., Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound // *Naturwissenschaften*. - 2002. - V. 89. - P. 137-146.
- ² Ingolfsdottir K. Usnic acid // *Phytochemistry*. - 2002. - V. 61. - P. 729-736.
- ³ Guo L., Shi Q., Fang J.L., Mei N., Ali A.A., Lewis S.M., Leakey J.E., Frankos V.H. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity // *J. Environ. Sci. Health. Part C*. - 2008. - V. 26. - № 4. - P. 317-338.
- ⁴ **Соколов Д.Н., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. Усниновая кислота: получение, строение, свойства и химические трансформации // *Успехи химии*. - 2012. - №8. - С. 747-768.**
- ⁵ Kutney J.P., Sanchez I.H. Studies in the usnic acid series. I. The condensation of (+)-usnic acid with aliphatic and aromatic amines // *Can. J. Chem.* - 1976. - V. 54. - P. 2795-2803; Kutney J.P., Sanchez I.H., Yee T. Studies in the usnic acid series. IV. The base catalyzed usnic acid - isousnic acid rearrangement. Part II. An improved synthesis of (+)-isousnic acid // *Can. J. Chem.* - 1977. - V. 55. - P. 1073.
- ⁶ <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/>
- ⁷ Takahashi K., Akai A., Oshima K., Ueda Y., Miyashita S. Usnic acid. II. Methylusnic acid // *Chem. Pharm. Bull.* - 1962. - V. 10. - P. 607-611.
- ⁸ Huneck S., Akinniyi J.A., Cameron A.F., Connolly J.D., Mulholland A.G. The absolute configurations of (+)-usnic and (+)-isousnic acid. X-ray analyses of the (-)- α -phenylethylaminoderivative of (+)-usnic acid and of (-)-pseudoplacodiolic acid, a new dibenzofuran, from the lichen *Rhizoplaca chrysoleuca* // *Tetrahedron Lett.* - 1981. - V. 22. - № 4. - P. 351-352.
- ⁹ Bazin M.-A., Le Lamer A.-C., Delcros J.-G., Rouaud I., Uriac P., Boustie J., Corbel J.-C., Tomasi S. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives // *Bioorg. Med. Chem.* - 2008. - V. 16. - P. 6860-6866; Legouin B., Uriac P., Tomasi S., Toupet L., Bondon A., van de Weghe P. Novel Chiral Molecular Tweezer from (+)-Usnic Acid // *Org. Lett.* - 2009. - V. 11. - № 3. - P. 745-748.
- ¹⁰ Shibata S., Ukita T., Tamura T., Miura Y. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and derivatives // *Jap. Med. J.* - 1948. - V. 1. - P. 152-155.
- ¹¹ Marshak A., Schaefer W. B., Rajagopalan S. Antibacterial activity of d-usnic acid and related compounds on *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1949, V. 70. P. 565-568.
- ¹² Möse J.R. Zur antibakteriellen Wirksamkeit der Usninsäure // *Arz-neim.-Forsch.* - 1955. - V. 5. - P. 510-513.

-
- ¹³ Klosa J. Antibiotika aus Flechten und Ihre therapeutische Verwendungsmöglichkeiten // Z. Physiol. Chem. - 1951. - V. 287. - P. 195–204.
- ¹⁴ Klosa, J. 1951. Über die antibiotische Wirkung von Flechtenstoffen. Z. Physiol. Chem. **287**:195–204
- ¹⁵ Ghione M., Parrello D., Grasso L. Usnic acid revisited, its activity on oral flora // Chemioterapia. - 1988. - V. 7. - P. 302–305.
- ¹⁶ Grasso L., Ghirardi P.E., Ghione M. Usnic acid, a selective antimicrobial agent against *Streptococcus mutans*: a pilot clinical study // Curr. Ther. Res. Clin. Exp. - 1989. - V. 45. - P. 1067–1070.
- ¹⁷ Lauterwein M., Oethinger M., Belsner K., Peters T., Marre R. In Vitro Activities Of The Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (+)-Usnic Acid, And (-)-Usnic Acid Against Aerobic And Anaerobic Microorganisms // Antimicrob. Agents Chemother. - 1995. - P. 2541–2543.
- ¹⁸ Tay T., Türk A.Ö., Yılmaz M., Türk H., Kıvanç M. Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Acetone Extract of the Lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-Usnic Acid, Norstictic Acid, and Protocetraric Acid Constituents // Z. Naturforsch. - 2004. - V. 59c. - P. 384–388.
- ¹⁹ Yuan C., Zhang X.J., Du Y.D., Guo Y.H., Sun L.Y., Ren Q., Zhao Z.T. Antibacterial Compounds and other Constituents of *Evernia divaricata* (L.) // J. Arch. Chem. Soc. Pak. - 2010. - V. 32. - №2. - P. 189–193.
- ²⁰ Paudel B., Bhattarai H.D., Lee H.K., Oh H., Shin H.W., Yim J.H. Antibacterial activities of Ramalin, usnic acid and its three derivatives isolated from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata* // Z. Naturforsch. C. - 2010. - V. 65. - P. 34–38.
- ²¹ Ranković B., Mišić M., Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes* // World J. Microbiol. Biotechnol. - 2008. - V. 24. - P.1239–1242.
- ²² Kokubun T., Shiu W.K.P., Gibbons S. Inhibitory activities of lichen-derived compounds against methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* // Planta Med. - 2007. - V. 73. - №2. - P.176–179.
- ²³ Manojlovic N., Gritsanapan W., Milosev M., Manojlovic I. Antimicrobial activity of some lichen substances // Planta Med. - 2007. - V. 73. - №9. - KL_004.
- ²⁴ Segatore B., Bellio P., Setacci D., Brisdelli F., Piovano M., Garbarino J.A., Nicoletti M., Amicosante G., Perilli M., Celenza G. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods // Phytomedicine. - 2012. - V. 19. - P. 341–347.

- ²⁵ Weckesser S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K., Schempp C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance // *Phytomedicine*. - 2007. - V. 14. - P. 508–516.
- ²⁶ Elo H., Matikainen J., Pelttari E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Naturwissenschaften*. - 2007. - V. 94. - P. 465–468; Elo H., Matikainen J., Pelttari E. Lichens as a source of antibiotics against resistant bacteria // *Planta Med*. - 2006. - V. 72. - №11. - P. 122.
- ²⁷ Zizovic I., Ivanovic J., Misic D., Stamenic M., Djordjevic S., Kukic-Markovic J., Petrovic S.D. SFE as a superior technique for isolation of extracts with strong antibacterial activities from lichen *Usnea barbata* L. // *J. Supercrit. Fluids*. - 2012. - V. 72. - P. 7– 14.
- ²⁸ Ivanova V., Bačkor M., Dahse H.-M., Graefe U. Molecular Structural Studies Of Lichen Substances With Antimicrobial, Antiproliferative, And Cytotoxic Effects From *Parmelia subrudecta* // *Prep. Biochem. Biotechnol*. - 2010. - V. 40. - P. 377–388.
- ²⁹ Sultana N., Afolayan A.J. A new depsidone and antibacterial activities of compounds from *Usnea undulata* Stirton // *J. Asian Nat. Prod. Res*. - 2011. - V. 13. - №12. - P. 1158-1164.
- ³⁰ Maciąg-Dorszyńska M., Węgrzyn G., Guzow-Krzemińska B. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis // *FEMS Microbiol. Lett*. - 2014. - V. 353. - №1. - P. 57-62.
- ³¹ Schmeda-Hirschmann G., Tapia A., Lima B., Pertino M., Sortino M., Zacchino S., de Arias A.R., Feresin G.E. A New Antifungal and Antiprotozoal Depside from the Andean Lichen *Protousnea poeppigii* // *Phytother. Res*. - 2008. - V. 22. - P. 349–355.
- ³² Ark P.A., Bottini A.T., Thompson J.P. Sodium usnate as an antibiotic for plant diseases // *Plant Dis. Rep*. - 1980. - V. 44. - P. 200 – 203.
- ³³ Sundset M.A., Kohn A., Mathiesen S.D., Præsteng K.E. *Eubacterium rangiferina*, a novel usnic acid resistant bacterium from the reindeer rumen // *Naturwissenschaften*. - 2008. - V. 95. - P. 741–749.
- ³⁴ Luo H., Yamamoto Y., Jeon H.-S., Liu Y.P., Jung J.S., Koh Y.J., Hur J.-S. Production of Anti-*Helicobacter pylori* Metabolite by the Lichen-Forming Fungus *Nephromopsis pallescens* // *Journal of Microbiology*. - 2011. - V. 49. - №1. - P. 66-70.
- ³⁵ Safak B., Ciftci I.H., Ozdemir M., Kiyildi N., Cetinkaya Z., Aktepe O.C., Altindis M., Asik G. *In Vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Usnic Acid // *Phytother. Res*. - 2009. - V. 23. - P. 955–957.

-
- ³⁶ Grogan D.W. Phenotypic Characterization of the Archaeobacterial Genus *Sulfolobus*: Comparison of Five Wild-Type Strains // *J. Bacteriol.* - 1989. - V. 171. - №12. - P. 6710-6719.
- ³⁷ Yılmaz M., Türk A.Ö., Tay T., Kıvanç M. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents // *Z. Naturforsch.* - 2004. - V. 59c. - P. 249-254.
- ³⁸ Ivanova V., Graefe U., Schlege B., Kolarova M., Aleksieva K., Najdenski H., Tzvetkova I., Chipeva V. Usnic Acid, Metabolite From *Neuropogon* Sp., An Antarctic Lichen Isolation, Structure Elucidation And Biological Activity // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* - 2004. - V. 18. - №1. - P. 66-71.
- ³⁹ Gupta V.K., Verma S., Gupta S., Singh A., Pal A., Srivastava S.K., Srivastava P.K., Singh S.C., Darokar M.P. Membrane-damaging potential of natural L-(-)-usnic acid in *Staphylococcus aureus* // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* - 2012. - V. 31. - P. 3375–3383.
- ⁴⁰ Pompilio A., Pomponio S., Di Vincenzo V., Crocetta V., Nicoletti M., Piovano M., Garbarino J.A., Di Bonaventura G. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients // *Future Microbiology.* - 2013. - V. 8. - P. 281-292.
- ⁴¹ Salta M., Wharton J.A., Dennington S.P., Stoodley P., Stokes K.R. Anti-Biofilm Performance of Three Natural Products against Initial Bacterial Attachment // *International Journal of Molecular Sciences.* - 2013. - V. 14. - № 11. - P. 21757-21780.
- ⁴² Francolini I., Norris P., Piozzi A., Donelli G., Stoodley P. Usnic Acid, a Natural Antimicrobial Agent Able To Inhibit Bacterial Biofilm Formation on Polymer Surfaces // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2004. - P. 4360–4365.
- ⁴³ Kim S., Greenleaf R., Miller M.C., Satish L., Kathju S., Ehrlich G., Post J.C., Sotereanos N.G., Stoodley P. Mechanical effects, antimicrobial efficacy and cytotoxicity of usnic acid as a biofilm prophylaxis in PMMA // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* - 2011. - V. 22. - P. 2773–2780.
- ⁴⁴ Grumezescu V., Socol G., Grumezescu A.M., Holban A.M., Ficai A., Trus R., Bleotu C., Balaure P.C., Cristescu R., Chifiriuc M.C. Functionalized antibiofilm thin coatings based on PLA–PVA microspheres loaded with usnic acid natural compounds fabricated by MAPLE // *Appl. Surf. Sci.* - 2013. - V. 302. - P. 262-267.
- ⁴⁵ Labib M.E., Brumlik C.J., Stoodley P., Dukhin S.S., Davidson T., Tabani Y. The long-term release of antibiotics from monolithic nonporous polymer implants for use as tympanostomy tubes // *Colloids Surf., A.* - 2010. - V. 354. - №1-3. - P. 331-337.

- ⁴⁶ Lazar V., Chifiriuc M.C. The influence of usnic acid on the *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms development // Romanian Archives of Microbiology and Immunology. - 2010. - V. 69. - №3. - P. 125-138.
- ⁴⁷ Gomide Tozatti M., da Silva Ferreira D., Morette Mazza G., da Silva Moraes T., Gomes Martins C.H., Andrade Silva M.L., Januário A.H., Pauletti P.M., Cunha W.R. In vitro evaluation of the synergetic interaction between antibiotics tetracyclin and penicillin with (+)-usnic acid isolated from *Usnea steineri* against multiresistant bacteria // Planta Med. - 2014. - V. 80. - №16. - P2058.
- ⁴⁸ Grumezescu A.M., Cotar A.I., Andronescu E., Ficaí A., Ghitulica C.D., Grumezescu V., Vasile B.S., Chifiriuc M.C. (2013) In vitro activity of the new water-dispersible Fe₃O₄@usnic acid nanostructure against planktonic and sessile bacterial cells. // Journal of Nanoparticle Research. – V. 15. - №7. - P. 1 - 10.
- ⁴⁹ Lira M.C.B., Ferraz M.S., da Silva D.G., Cortes M.E., Teixeira K.I., Caetano N.P., Sinisterra R.D., Ponchel G., Santos-Magalhães N.S. Inclusion complex of usnic acid with *b*-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes.// J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2009. - V. 64. - P. 215–224.
- ⁵⁰ Nikolić V., Stanković M., Nikolić L., Nikolić G., Ilić-Stojanović S., Popsavin M., Zlatković S., Kundaković T. Inclusion complexes with cyclodextrin and usnic acid // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. - 2013. - V. 76. - P. 173-182.
- ⁵¹ Karabacak R.B., Tay T., Kıvanç M. Preparation of novel antimicrobial polymer colloids based on (+)-usnic acid and poly(vinylbenzyl chloride) // React. Funct. Polym. - 2014. - V. 83. - P. 7–13.
- ⁵² Johnson R.B., Feldott G., Lardy H.A. The mode of action of the antibiotic usnic acid // Arch. Biochem. Biophys. - 1950. - V. 28. - P. 317–323.
- ⁵³ Brock T.D. Effect of antibiotics and inhibitors on m protein synthesis // J. Bacteriol. - 1963. - V. 85. - №3. - P. 527-531.
- ⁵⁴ Miura Y., Nakamura Y., Matsudaira H. Le mode d'action de l'acide usnique contre les bacteries // Bull. soc. chim. biol. - 1951. - V. 33. - №10. - P. 1577-1583.
- ⁵⁵ Grumezescu A.M., Andronescu E., Albu M.G., Ficaí A., Bleotu C., Dragu D., Lazar V. Wound Dressing Based Collagen Biomaterials Containing Usnic Acid as Quorum Sensing Inhibitor Agent: Synthesis, Characterization and Bioevaluation // Curr. Org. Chem. - 2013. - V. 17. - № 2. - P. 125-131.
- ⁵⁶ Correche E.R., Carrasco M., Escudero M.E., Velazquez L., De Guzman A.M.S. Study of the cytotoxic and antimicrobial activities of usnic acid and derivatives // Fitoterapia. - 1998. - V. 64. - P. 493-501.

- ⁵⁷ Melgarejo M., Sterner O., Castro J.V., Mollinedo P. More Investigations In Potent Activity And Relationship Structure Of The Lichen Antibiotic (+)-Usnic Acid And Its Derivate Dibenzoylusnic Acid // *Revista Boliviana De Química*. - 2008. - V. 25. - №1. - P. 24-29.
- ⁵⁸ Shaheen F., Ahmad M., Khan S.N., Hussain S.S., Anjum S., Tashkhodjaev B., Turgunov K., Sultankhodzhaev M.N., Choudhary M.I., Atta-ur-Rahman New α -Glucosidase Inhibitors and Antibacterial Compounds from *Myrtus communis* L.// *Eur. J. Org. Chem.* - 2006. - P. 2371–2377.
- ⁵⁹ Sassa T., Igarashi M. Structures of (-)-Mycousnine, (+)-Isomycousnine and (+)-Oxomycousnine, New Usnic Acid Derivative sfrom Phytopathogenic *Mycosphaerella nawae* // *Agric. Biol. Chem.* - 1990. - V. 54. - №9. - P. 2231-2237.
- ⁶⁰ Hoffman A.M., Mayer S.G., Strobel G.A., Hess W.M., Sovocool G.W., Grange A.H., Harper J.K., Arif A.M., Grant D.M., Kelley-Swift E.G. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic Phoma species // *Phytochemistry*. - 2008. - V. 69. - P. 1049–1056.
- ⁶¹ Virtanen O.E. Antibiotic activity of amino compound derivatives of l-usnic acid. II. // *Suomen Kemistilehti*. - 1954. - V. 27B. - P. 67-70.; Kortekangas A.E.; Virtanen O.E. The antibiotic activity of some amino-compound derivatives of usnic acid. III. // *Suomen Kemistilehti*. - 1956. - V. 29B. - P. 2-4.
- ⁶² Solid-Phase Synthesis of Polyfunctionalized Natural Products: Application to Usnic Acid, a Bioactive Lichen Compound // *J. Comb. Chem.* - 2006. - V. 8. - P. 11-14.
- ⁶³ Sladic D., Beljanski V., Prelesnik B., Bogdanovic G., Ivanovic I., Andjelkovic K. Preparation, crystal structure and antibacterial activity of condensation products of usnic acid and acyl hydrazides // *J. Serb. Chem. Soc.* - 1998. - V. 63. - P. 171-182.
- ⁶⁴ Beljanski V., Anđelković K., Poletić D., Živoslav T., Brćeski I., Sladić D. Copper (II) complexes of usnic acid condensation derivatives and their antibacterial activities // *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* - 1998. - V. 28. - P. 1607-1617.
- ⁶⁵ Natič M., Tešić Z., Anđelković K., Brćeski I., Radulović S., Manić S., Sladić D. Synthesis and Biological Activity of Pd(II) and Cu(II) Complexes with Acylhydrazones of Usnic Acid. Synthesis And Reactivity // *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* - 2004. - V. 34. - №1. - P. 101–113.
- ⁶⁶ Koçer. S., Uruş S., Cakır A., Güllüce M., Diğrak M., Alan Y., Aslan A., Tümer M., Karadayı M., Kazaz C., Dal H. The synthesis, characterization, antimicrobial and antimutagenic activities of hydroxyphenylimino ligands and their metal complexes of usnic acid isolated from *Usnea longissima*.// *Dalton Transactions*. - 2014. - V. 43. - №16. - P. 6148-6164.
- ⁶⁷ McDonnell G., Russell A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1999 – V. 12 (1). -P. 147-179.

- ⁶⁸ Marshak A. A crystalline antibacterial substance from the lichen *Ramalina reticulata* // U.S. Public Health Reports - 1947. - V. 62. - P. 3-19.; Marshak A., Barry G.T., Craig L.C. Antibiotic compound isolated from the lichen *Ramalina reticulata* // Science. - 1947. - V. 106. - P. 394-395.
- ⁶⁹ Marshak A., Kuschner M. The action of streptomycin and usnic acid on the development of tuberculosis in guinea pigs // Public Health Rep. - 1950. - V. 65. - №5. - P. 131-162.
- ⁷⁰ Stoll A., Brack A., Reng J. Die antibakterielle Wirkung der Usninsäure auf Mykobakterien und andere Mikroorganismen // Experientia 1947. - V. 3. - P. 115-117.
- ⁷¹ Klosa J. Chemische Konstitution und antibiotische Wirkung der Flechtenstoffe // Pharmazie. - 1953. - V. 8. - P. 435-442.
- ⁷² Vartia K.O. Antibiotics in lichens // Ann. Med. Exp. et Biol. Fenniae. 1949. V. 27. P. 46.
- ⁷³ Stoll A., Brack A., Renz J. Die Wirkung von Flechtenstoffen auf Tuberkelbakterien und auf einige andere Mikroorganismen // Schweiz. Z. Allgem. Pathol. Bakteriologie. - 1950 - V. 13. P. 729-751.
- ⁷⁴ Ingólfssdóttir K., Chung G.A.C., Skúlason V.G., Gissurarson S.R., Vilhelmsdóttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro // Eur. J. Pharm. Sci. - 1998. - V. 6. - P. 141-144.
- ⁷⁵ König G.M., Wright A.D. ¹H and ¹³C-NMR and Biological Activity Investigations of Four Lichen-derived Compounds // Phytochem. Anal. - 1999. - V. 10. - P. 279-284.
- ⁷⁶ Tosun F., Akyüz Kizilay Ç., Sener B., Vural M. The evaluation of plants from Turkey for the *in vitro* antimicrobial activity // Pharm. Biol. - 2005. - V. 43. - №1. - P. 58-63.
- ⁷⁷ Tasdemir D., Franzblau S.G. In vitro antituberculous activity of several lichen metabolites // Planta Med. - 2007. - V. 73. - №9. - P. 174.
- ⁷⁸ Honda N.K., Pavan F.R., Coelho R.G., de Andrade Leite S.R., Micheletti A.C., Lopes T.I.B. Antimycobacterial activity of lichen substances // Phytomedicine. - 2010. - V. 17. - P. 328-332.
- ⁷⁹ Ramos D.F., da Silva P.E.A. Antimycobacterial activity of usnic acid against resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria // Pharmaceutical Biology. - 2010. - V. 48. - №3. - P. 260-263.
- ⁸⁰ Lucarini R., Tozatti M.G., de Oliveira Salloum A.I., Crotti A.E.M., Silva M.L.A., Gimenez V.M.M., Groppo M., Januário A.H., Martins C.H.G., Cunha W.R. Antimycobacterial activity of *Usnea steineri* and its major constituent (+)-usnic acid // African Journal of Biotechnology. - 2012. - V. 11. - №20. - P. 4636-4639.
- ⁸¹ Castle H., Kubsch F. The production of usnic, didymic, and rhodocladonic acids by the fungal component of the lichen *Cladonia cristatella* // Archives of Biochemistry. - 1949. - V. 23. - № 1. - P. 158-160.

-
- ⁸² Bandoni R.J., Towers G.H.N. Degradation of usnic acid by microorganisms // *Can. J. Biochem.* - 1967. - V. 45. - P. 1197-1201.
- ⁸³ Cardarelli M., Serino G., Campanella L., Ercole P., De Cicco Nardone F., Alesiani O., Rossiello F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems // *Cell. mol. life sci.* - 1997. - V. 53. - P. 667-672.
- ⁸⁴ Kowalski M., Hausner G., Piercey-Normore M.D. Bioactivity of secondary metabolites and thallus extracts from lichen fungi // *Mycoscience.* - 2011. - V. 52. - №6. - P. 413-418.
- ⁸⁵ Henningsson B., Lundstrom H. The influence of lichens, lichen extracts and usnic acid on wood destroying fungi // *Mater. Org. (Berl.)*. - 1970. - V. 5. - P. 19-31.
- ⁸⁶ Pires R.H., Lucarini R., Mendes-Giannini M.J.S. Effect of usnic acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2012. - V. 56. - №1. - P. 595-597.
- ⁸⁷ Goldner W.R., Hoffman F.M., Medve R.J. Allelopathic effects of *Cladonia cristatella* on ectomycorrhizal fungi common to bituminous strip-mine spoils // *Can. J. Bot.* - 1986. - V. 64. - P. 1586-1590.
- ⁸⁸ Proksa B., Sturdikova M., Pronayova N., Liptaj T. (-)-Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity // *Pharmazie.* - 1996. - V. 51. - P. 195-196.
- ⁸⁹ Halama P., Van Haluwin C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids // *BioControl.* - 2004. - V. 49. - P. 95-107.
- ⁹⁰ De Battisti F., Codolo R., and Nicolato A. Attivita di una associazione antibatterico-antimicotico sulla sintomatologia della *Tinea pedis* in un gruppo di sportive // *Chron. Derm.* - 1991. - P. 375-380.
- ⁹¹ Speakmen J.B., Karl R., Lorenz G., Ammerman E., Wuerzer B., Meyer N., Ditrich K. Dihydrodibenzofuran derivatives and fungicides containing these compounds // US Patent № 4983587. 1991.
- ⁹² Conover M.A., Mierzwa R., King A., Loebenberg D., Bishop W.R., Puar M., Patel M., Coval S., Hershenhorn J., Strobel G.A. Usnic acid amide, a minor phytotoxin and antifungal agent from *Cercosporidium henningsii* // *Phytochemistry.* - 1991. - V. 31. - P. 2999-3001.
- ⁹³ Wu J., Zhang M., Ding D., Tan T., Yan B. Effect of *Cladonia alpestris* on *Trichomonas vaginalis* in vitro // *Chinese J. Preventative Med.* - 1995. - V. 13. - P. 126-129.
- ⁹⁴ Fournet A., Ferreira M.E., Rojas D.A., Torres D.O., Inchausti A., Yaluff G., Quilhot W., Fernandez E., Hidalgo M.E. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis // *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* - 1997. - V. 116. - P. 51-54.

-
- ⁹⁵ De Carvalho E.A.B., Andrade P.P., Silva N.H., Pereira E.C., Figueiredo R.C.B.Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study // *Micron*. - 2005. - V. 36. - P. 155–161.
- ⁹⁶ Seaman T., Campbell W., Lategan C., Smith P. The antimicrobial activity of South African lichens and lichen-derived usnic acid // *Planta Med.* - 2007. - V. 73. - №9. - P. 137.
- ⁹⁷ Verotta L., Appendino G., Bombardelli E., Brun R. In vitro antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure–activity study // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2007. - V. 17. - P. 1544–1548.
- ⁹⁸ Sussmann, R.A.C., Angeli, C.B., Peres, V.J., Kimura, E.A., Katzin, A.M. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize vitamin e // *FEBS Letters*. - 2011. - V. 585. - №24. - P. 3985-3991.
- ⁹⁹ Bruno M., Trucchi B., Monti D., Romeo S., Kaiser M., Verotta L. Synthesis of a Potent Antimalarial Agent through Natural Products Conjugation // *ChemMedChem*. - 2013. - V. 8. - P. 221 – 225; Verotta L., Monti D. Compounds with antimalarial activity // Patent WO 034512 A1. 2010.
- ¹⁰⁰ Yamamoto Y., Miura Y., Kimoshita Y., Higuchi M., Yamada Y., Murakami A., Ohigashi H., Koshimizu K. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation // *Chem. Pharm. Bull.* - 1995. - V. 43. - P. 1388-1390.
- ¹⁰¹ Perry N.B., Benn M.H., Brennan N.J., Burgess E.J., Ellis G., Galloway D.J., Lorimer S.D., Tangney R.S. Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxic Activity of New Zealand Lichens // *Lichenologist*. - 1999. - V. 31. - P. 627-636.
- ¹⁰² Scirpa P., Scambia G., Masciullo V., Battaglia F., Foti E., Lopez R., Villa P., Malecore M., Mancuso S. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus // *Minerva Ginecologica*. - 1999. - V. 51. - №6. - P. 255-260.
- ¹⁰³ Campanella L., Delfini M., Ercole P., Iacoangeli A., Risuleo G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription // *Biochimie*. - 2002. - V. 84. - P. 329–334.
- ¹⁰⁴ Al-Bekairi A.M., Qureshi S., Chaudhry M.A., Krishna D.R., Shah A.H. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice // *J. Ethnopharmacol.* - 1991. - V. 33. - P. 217-220.

-
- ¹⁰⁵ Fazio A.T., Adler M.T., Bertoni M.D., Sepulveda C.S., Damonte E.B., Maier M.S. Lichen Secondary Metabolites from the Cultured Lichen Mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their Antiviral Activities // *Z. Naturforsch.* - 2007. - V. 62c. - P. 543-549.
- ¹⁰⁶ Wu J., Tao J., Zhu Y., Li C., Huang Z., Yuan T. Application Of Usnic Acid In Anti-Influenza Virus Medicaments // Patent CN 101693027. 2010.
- ¹⁰⁷ Lai D., Odimegwu D.C., Esimone C., Grunwald T., Proksch P. Phenolic Compounds with In Vitro Activity against Respiratory Syncytial Virus from the igerian Lichen *Ramalina farinacea* // *Planta Med.* - 2013. - V. 79. - P. 1440–1446.
- ¹⁰⁸ Schimmer O., Lehner H. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure auf die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* // *Arch. Mikrobiol.* - 1973. - V. 93. - P. 145-154.
- ¹⁰⁹ Bačkor M., Klemová K., Bačkorová M., Ivanova V. Comparison of the Phytotoxic Effects of Usnic Acid on Cultures of Free-Living Alga *Scenedesmus quadricauda* and Aposymbiotically Grown Lichen Photobiont *Trebouxia erici* // *J. Chem. Ecol.* - 2010. - V. 36. - №4. - P. 405 - 411.
- ¹¹⁰ Hager A., Brunauer G., Türk R., Stocker-Wörgötter E. Production and Bioactivity of Common Lichen Metabolites as Exemplified by *Heterodea muelleri* (Hampe) Nyl. // *J. Chem. Ecol.* - 2008. - V. 34. - P. 113–120.
- ¹¹¹ Bud'ová J., Bačkor M., Bačkorová M., Židzik J. Usnic acid and copper toxicity in aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici* // *Symbiosis.* - 2006. - V. 42. - P. 169-174.
- ¹¹² Kinraidew T.B., Ahmadjian V. The effects of usnic acid on the physiology of two cultured species of the lichen alga *Trebouxia Puym.* // *Lichenologist.* - 1970. - V. 4. - P. 234 -247.
- ¹¹³ Vainshtein, F.A. Lichen acids and permeability of alga *Trebouxia erici* cells // *Fiziol. Rast.* (Moscow). - 1985. - V. 32. - P. 1153 -1157.
- ¹¹⁴ Barbalic L. Beitrag zur Kenntnis der Einwirkung von L-Usninsäure auf höhere Pflanzen // *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles.* - 1963. - V. 9. - №3. - P. 286-296.
- ¹¹⁵ Dalvi R.R., Singh B., Salunkhe D.K. Physiological and biochemical investigations on the phytotoxicity of usnic acid // *Phyton.* - 1972. - V. 29. - P. 63–72.
- ¹¹⁶ Nishitoba Y., Nishimura H., Nishiyama T., Mizutani J. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima* // *Phytochemistry.* - 1987. - V. 26. - P. 3181–3185.
- ¹¹⁷ Kytöviita M.M., Stark S. No allelopathic effect of the dominant forest-floor lichen *Cladonia stellaris* on pine seedlings // *Funct. Ecol.* - 2009. - V. 23. - P. 435-441.
- ¹¹⁸ Romagni J.G., Meazza G., Nanayakkara N.P.D., Dayan F.E. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase // *FEBS Letters.* - 2000. - V. 480. - P. 301-305.

-
- ¹¹⁹ Dauriac H., Rondon Y. Quelques aspects des propriétés d'un lichen, le *Letharia vulpina* (L.). Hue, en biologie végétale expérimentale. I. Action sur la germination du blé et le développement de l'ail // Bull. Soc. Bot. Fr. - 1976. - V. 123. - P. 235-241.
- ¹²⁰ Gardner C.R., Müller D.M.J. Factors affecting the toxicity of several lichen acids: effects of pH and lichen acid concentration // Am. J. Bot. - 1981. - V. 68. - P. 87-95.
- ¹²¹ Lechowski Z., Mej E., Bialczyk J. Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid // Environmental and Experimental Botany. - 2006. - V. 56. - P. 239-244.
- ¹²² Lasceve G., Gaugain F. Effects of Usnic Acid on Sunflower and Maize Plantlets // J. Plant Physiol. - 1990. - V. 136. - P. 723-727.
- ¹²³ Latkowska E., Lechowski Z., Bialczyk J., Pilarski J. Photosynthesis and water relations in tomato plants cultivated long-term in media containing (-)-usnic acid // J. Chem. Ecol. - 2006. - V. 32. - P. 2053-2066.
- ¹²⁴ Folmann G., Villagran V. Flechtenstoffe und Zellpermeabilität // Z. Naturforsch. - 1965. - V. 20. - P. 723.
- ¹²⁵ Follmann G. Flechtenstoffe und Stecklingsbewurzelung // Naturwissenschaften. - 1965. - V. 52. - P. 266.
- ¹²⁶ Toledo Marante F.J., Garcia Castellano A., Estevez Rosas F., Quintana Aguiar J., Bermejo Barrera J. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*, phytotoxicity and antioxidative activity // J. Chem. Ecol. - 2003. - V. 29. - P. 2049-2071.
- ¹²⁷ Bouaid K., Vicent C. Chlorophyll degradation effected by lichen substances // Ann. Bot. Fennici. - 1998. - V. 35. - P. 71-74.
- ¹²⁸ Orus M.J., Estevez P., Vicente C. Manganese depletion in chloroplasts of *Quercus rotundifolia* during chemical simulation of lichen epiphytic states // Physiol. Plant. - 1981. - V. 52. - P. 263-266.
- ¹²⁹ Gimenez I., Vicente C. On the mode of action of usnic acid as photosynthetic uncoupling agent // Phyton. - 1989. - V. 49. - P. 119-121.
- ¹³⁰ Inoue H., Noguchi M., Kubo K. Effects of usnic acid on photosystem II electron transport / The oxygen evolving system of photosynthesis. // Eds Inoue Y., Crofts A., Govindje E., Murata N., Renger G., Satoh K. Tokyo: Academic Press. - 1983. - P. 351-356.
- ¹³¹ Inoue H., Noguchi M., Kullo K. Site of inhibition of usnic acid at oxidizing side of photosystem 2 of spinach chloroplasts // Photosynthetica. - 1987. - V. 21. - P. 88-90.
- ¹³² Vavasseur A., Gautier H., Thibaud M., Lasceve G. Effects of Usnic Acid on the Oxygen Exchange Properties of Mesophyll Cell Protoplasts from *Commelina communis* L. // J. Plant Physiol. - 1991. - V. 139. - P. 90-94.

- ¹³³ Endo T., Takahagi T., Kinoshita Y., Yamamoto Y., Sato F. Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides // *Biosci., Biotechnol., Biochem.* - 1998. - V. 62. - P. 2023-2027.
- ¹³⁴ Romagni J.G., Meazza G., Nanayakkara N.P.D., Dayan F.E. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase // *FEBS Letters.* - 2000. - V. 480. - P. 301-305.
- ¹³⁵ Legaz M.E., Monso M.A., Vicente C. Harmful effects of epiphytic lichens on trees // *Recent Res. Devel. Agron. Hortic.* - 2004. - V. 1. - P. 1-10.
- ¹³⁶ Emmerich R., Giez I., Lange O.L., Proksch P. Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis* // *Phytochemistry.* - 1993. - V. 33. - P. 1389–1394.
- ¹³⁷ Cetin H., Tufan-Cetin O., Turk A.O., Tay T., Candan M., Yanikoglu A., Sumbul H. Insecticidal activity of major lichen compounds, (–)- and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens L.* // *Parasitol. Res.* - 2008. - V. 102. - P. 1277–1279.
- ¹³⁸ Cetin H., Tufan-Cetin O., Turk A.O., Tay T., Candan M., Yanikoglu A., Sumbul H. Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae) // *Natural Product Research.* - 2011. - V. 26. - №4. - P. 350-355.
- ¹³⁹ Shang X., Miao X., Lv H., Wang D., Zhang J., He H., Yang Z., Pan H. Acaricidal activity of usnic acid and sodium usnic acid against *Psoroptes cuniculi* in vitro // *Parasitol. Res.* - 2014. - V. 113. - №6. - P. 2387-2390.
- ¹⁴⁰ Salloum A.I.O., Lucarini R., Tozatti M.G., Medeiros J., Silva M.L.A., Magalhães L.G., Cunha W.R. In vitro schistosomicidal activity of *Usnea steineri* extract and its major constituent (+)-usnic acid against *Schistosoma mansoni* // *Planta Med.* - 2012. - V. 78. - №11. - PI304.
- ¹⁴¹ Mikoshiba K. The pharmacological action of d-usnic acid and its degradation products // *Japan J. Med. Sci. IV. Pharmacol.* - 1936. - V. 9. - P. 77-105.
- ¹⁴² Söderberg U. A note on the action of usnic acid on anesthetized cats // *Acta Physiol. Scand.* - 1953. - V. 28. - P. 202-210.
- ¹⁴³ Virtanen O.E., Kärki N. On the toxicity of an usnic preparation with the trade name USNO // *Suom. Kemistilehti.* - 1956. - V. 29B. - P. 225-226.
- ¹⁴⁴ Kingsbury J.M. / *Poisonous Plants of the United States and Canada* // NJ: Prentice-Hall, Englewood Cliffs. - 1964. - P. 86–87.
- ¹⁴⁵ Hesbacher S., Baur B., Baur A., Proksch P. Sequestration of lichen compounds by three species of terrestrial snails // *J. Chem. Ecol.* - 1995. - V. 21. - №2. - P. 233-246.

- ¹⁴⁶ Sundset M.A., Barboza P.S., Green T.K., Folkow L.P., Blix A.S., Mathiesen S.D. Microbial degradation of usnic acid in the reindeer rumen // *Naturwissenschaften*. - 2010. - V. 97. - P. 273–278.
- ¹⁴⁷ Hsu L.M., Huang Y.S., Chang F.Y., Lee S.D. “Fat burner” herb, usnic acid, induced acute hepatitis in a family // *J. Gastroenterol. Hepatol.* - 2005. - V. 20. - P. 1138–1139.
- ¹⁴⁸ Neff G.W., Reddy K.R., Durazo F.A., Meyer D., Marrero R., Kaplowitz N. Severe hepatotoxicity associated with the use of weight loss diet supplements containing ma huang or usnic acid // *Journal of Hepatology*. - 2004. - V. 41. - №6. - P. 1062–1064.
- ¹⁴⁹ Sanchez W., Maple J.T., Burgart L.J., Kamath P.S. Severe Hepatotoxicity Associated With Use of a Dietary Supplement Containing Usnic Acid // *Mayo Clin. Proc.* - 2006. - V. 81. - №4. - P. 541–544
- ¹⁵⁰ Durazo F.A., Lassman C., Han S.H.B., Saab S., Lee N.P., Kawano M., Saggi B., Gordon S., Farmer D.G., Yersiz H., Goldstein R.L.I., Ghobrial M., Busuttil R.W. Fulminant liver failure due to usnic acid for weight loss // *Am. J. Gastroenterol.* - 2004. - V. 99. - P. 950–952.
- ¹⁵¹ Frankos V.H. Nomination for usnic acid and *Usnea barbata* herb [Электронный ресурс] // National Toxicology Program. Washington, DC: Food and Drug Administration, Division of Dietary Supplement Programs - 2005 (Режим доступа: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumPdf/UsnicAcid.pdf).
- ¹⁵² Abo-Khatwa A.N., Al-Robai A.A., Al-Jawhari D.A. Lichen Acids as Uncouplers of Oxidative Phosphorylation of Mouse-Liver Mitochondria // *Natural Toxins*. - 1996. - V. 4. - P. 96–102.
- ¹⁵³ Pramyothin P., Jantasoat W., Pongnimitprasert N., Phrukudom S., Ruangrunsi N. Hepatotoxic effect of (+)usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria // *J. Ethnopharmacol.* - 2004. - V. 90. - P. 381–387.
- ¹⁵⁴ Han D., Matsumaru K., Rettori D., Kaplowitz N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress // *Biochem. Pharmacol.* - 2004. - V. 67. - P. 439–445.
- ¹⁵⁵ Sonko B.J., Schmitt T.C., Guo L., Shi Q., Boros L.G., Leakey J.E.A., Beger R.D. Assessment of usnic acid toxicity in rat primary hepatocytes using ¹³C isotopomer distribution analysis of lactate, glutamate and glucose // *Food Chem. Toxicol.* - 2011. - V. 49. - №11. - P. 2968–2974.
- ¹⁵⁶ Correche E.R., Enriz R.D., Piovano M., Garbarino J., Gomez-Lechon M.J. Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens // *Alternatives to Laboratory Animals*. - 2004. - V. 32. - №6. - P. 605–615.

- ¹⁵⁷ Sahu S.C., O'Donnell M.W., Sprando R.L. Interactive toxicity of usnic acid and lipopolysaccharides in human liver HepG2 cells // *J. Appl. Toxicol.* - 2012. - V. 32. - №9. - P. 739-49.
- ¹⁵⁸ Moreira C.T., Oliveira A.L., Comar J.F., Peralta R.M., Bracht A. Harmful effects of usnic acid on hepatic metabolism // *Chem. Biol. Interact.* - 2013. - V. 203. - P. 502–511.
- ¹⁵⁹ Cheng Y.B., Wei L.L., Gu N., Si K.W., Shi L., Li X.Q., Li C., Yuan Y.K. Oral acute toxicity of (+)-usnic acid in mice and its cytotoxicity in rat cardiac fibroblasts // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* - 2009. - V. 29. - №8. - P. 1749-1751.
- ¹⁶⁰ Lu, X., Zhao, Q., Tian, Y., Xiao, S., Jin, T., and Fan, X. A metabonomic characterization of (+)-usnic acid-induced liver injury by gas chromatography-mass spectrometry-based metabolic profiling of the plasma and liver in rat // *Int. J. Toxicol.* - 2011. - V. 30. - P. 478–491.
- ¹⁶¹ Al-Ahmadi A.A., Ayuob N.N., Ali S.S., Al-Robai A.A., Abo-Khatwa N.A. Effect of (+)-Usnic Acid as a Fat Burner on the Rat Hepatocyte; Correlated Histological and Biochemical in vivo Study // *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2012. V. 11. P. 1368-1377.
- ¹⁶² Dailey R.N., Montgomery D.L., Ingram J.T., Siemion R., Vasquez M., Raisbeck M.F. Toxicity of the lichen secondary metabolite (+)-usnic acid in domestic sheep // *Vet. Pathol.* - 2008. - V. 45. - P. 19–25.
- ¹⁶³ Yokouchi Y., Imaoka M., Niino N., Kiyosawa N., Sayama A., Jindo T. (+)-Usnic Acid-induced Myocardial Toxicity in Rats // *Toxicologic Pathology.* - 2013. - P. 1-11.
- ¹⁶⁴ Marshak, A., Harting J. Inhibition of cleavage and ³²p_uptake in *Arbacia* by D-usnic acid // *J. Cell. Comp. Physiol.* - 1948. - V. 31. - P. 321-325.
- ¹⁶⁵ Marshak A., Fager J. Prevention of nuclear fusion and mitosis and inhibition of deoxyribonuclease by d-usnic acid // *J. Cell. Comp. Physiol.* - 1950. - V. 35. - P. 317-329.
- ¹⁶⁶ Öztürk S., Güvenç S., Erikan N., Yılmaz Ö. Effect of usnic acid on mitotic index on root tips of *Allium cepa* L. // *Lagascalia.* - 1999. - V. 21. - №1. - P. 47-52.
- ¹⁶⁷ O'Neill M.A., Mayer M., Murray K.E., Rolim-Santos H.M.L., Santos-Magalhaes N.S., Thompson A.M., Appleyard V.C.L. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells? // *Braz. J. Biol.* - 2010. - V. 70. - P. 659–664.
- ¹⁶⁸ Kumar S., Müller K. Lichen Metabolites. 2. Antiproliferative and Cytotoxic Activity of Gyrophoric, Usnic, and Diffractaic Acid on Human Keratinocyte Growth // *J. Nat. Prod.* - 1999. - V. 62. - P. 821-823.
- ¹⁶⁹ Shibamoto T., Wei C.L. Mutagenicity of lichen constituents // *Environmental Mutagenesis.* - 1984. - V. 6. - №5. - P. 757–762.

- ¹⁷⁰ Leandro L.F., Munari C.C., Sato V.L., Alves J.M., de Oliveira P.F., Mastrocola D.F., Martins S., Moraes T., de Oliveira A.I., Tozatti M.G., Cunha W.R., Tavares D.C. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays // *Mutation Research*. - 2013. - V. 753. - P. 101–106.
- ¹⁷¹ Polat Z., Aydin E., Türkez H., Aslan A. In vitro risk assessment of usnic acid compound // *Toxicology and Industrial Health*. - 2013. - P. 1–8.
- ¹⁷² Mayer M., O'Neill M.A., Murray K.E., Santos-Magalhaes N.S., Carneiro-Leao A.M.A., Thompson A.M., Appleyard V.C.L. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anticancer properties // *Anticancer Drugs*. - 2005. - V. 16. - P. 805–809.
- ¹⁷³ Koparal A.T., Tüylü B.A., Türk H. In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their nongenotoxicity on human lymphocytes // *Nat. Prod. Res.* - 2006. - V. 20. - P. 1300–1307.
- ¹⁷⁴ Wiesner B.P., Yudkin J. Control of fertility by antimetabolic agents // *Nature*. - 1955. - V. 176. - P. 249-250.
- ¹⁷⁵ Boehm F., Clarke K., Edge R., Fernandez E., Navaratnam S., Quilhot W., Rancan F., Truscott T.G. Lichens – photophysical studies of potential new sunscreens // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* - 2009. - V. 95. - P. 40–45.
- ¹⁷⁶ Joseph A., Lee T., Moland C.L., Branham W.S., Fuscoe J.C., Leakey J.E.A., Allaben W.T., Lewis S.M., Ali A.A., Desai V.G. Effect of (+)-usnic acid on mitochondrial functions as measured by mitochondria-specific oligonucleotide microarray in liver of B6C3F1 mice // *Mitochondrion*. - 2009. - V. 9. - №2. - P. 149-58.
- ¹⁷⁷ Liu Q., Zhao X., Lu X., Fan X., Wang Y. Proteomic study on usnic-acid-induced hepatotoxicity in rats // *J. Agric. Food Chem.* - 2012. - V. 60. - P. 7312–7317.
- ¹⁷⁸ Kupchan S.M., Kopperman H.L. L-Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens // *Experientia*. - 1975. - V. 31. - P. 625–752.
- ¹⁷⁹ Bezivin C., Tomasi S., Rouaud I., Delcros J.G., Boustie J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convolute* // *Planta Med.* - 2004. - V. 70. - P. 874-877.
- ¹⁸⁰ Periera E.C., Nascimento S.C., Lima R.C., Silva N.H., Oliveira A.F., Bandeira E., Boitard M., Beriel H., Vicente C., Legaz M.E. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity // *Tokai J. Exp. Clin. Med.* - 1994. - V. 19. - P. 47.
- ¹⁸¹ Dias, D.A., Urban, S. Phytochemical investigation of the Australian lichens *Ramalina glaucescens* and *Xanthoria parietina* // *Nat. Prod. Commun.* - 2009. - V. 4. - P. 959–964.

- ¹⁸² Bačkorová M., Bačkor M., Mikeš J., Jendželovský R., Fedoročko P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid // *Toxicol. In Vitro.* - 2011. - V. 25. - P. 37–44.
- ¹⁸³ Burlando B., Ranzato E., Volante A., Appendino G., Pollastro F., Verotta L. Antiproliferative Effects on Tumour Cells and Promotion of Keratinocyte Wound Healing by Different Lichen Compounds // *Planta Med.* - 2009. - V. 75. - P. 607–613.
- ¹⁸⁴ Brandão L.F.G., Alcantara G.B., Matos M.C., Bogo D., Freitas D., Oyama N.M., Honda N.K. Cytotoxic Evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells // *Chem. Pharm. Bull.* - 2013. - V. 63. - №2. - P. 176–183.
- ¹⁸⁵ Brisdelli F., Perilli M., Sellitri D., Piovano M., Garbarino J.A., Nicoletti M., Bozzi A., Amicosante G., Celenza G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study // *Phytother. Res.* - 2013. - V. 27. - № 3. - P. 431–437.
- ¹⁸⁶ Hardardóttir G., Ögmundsdóttir H.M., Ingólfssdóttir K. Usnic acid: anti-proliferative, apoptotic and morphological effects on human malignant cell lines // *Planta Med.* - 2006. - V.72. - №11. - P_050.
- ¹⁸⁷ Einarsdóttir E., Groeneweg J., Björnsdóttir G.G., Harðardóttir G., Omarsdóttir S., Ingólfssdóttir K., Ögmundsdóttir H.M. Cellular Mechanisms of the Anticancer Effects of the Lichen Compound Usnic Acid // *Planta Med.* - 2010. - V. 76. - P. 969–974.
- ¹⁸⁸ Bačkorová M., Jendželovský R., Kello M., Bačkor M., Mikeš J., Fedoročko P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines // *Toxicology in Vitro.* - 2012. - V. 26. - P. 462–468.
- ¹⁸⁹ Rabelo T.K., Zeidán-Chuliá F., Vasques L.M., dos Santos J.P.A., da Rocha R.F., de Bittencourt Pasquali M.A., Rybarczyk-Filho J.L., Araújo A.A.S., Moreira J.C.F., Gelain D.P. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y) // *Toxicology in Vitro.* - 2012. - V. 26. - P. 304–314.
- ¹⁹⁰ Singh N., Nambiar D., Kale R.K., Singh R.P. Usnic Acid Inhibits Growth and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma A549 Cells // *Nutrition and Cancer.* - 2013. - V. 65. - P. 36-43.
- ¹⁹¹ Song Y., Dai F., Zhai D., Dong Y., Zhang J., Lu B., Luo J., Liu M., Yi Z. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways // *Angiogenesis.* - 2012. - V. 15. - №3. - P. 421 – 432.
- ¹⁹² Ribeiro-Costa R.M., Alves A.J., Santos N.P., Nascimento S.C., Pereira E.C., Silva N.H., Honda N.K., Santos-Magalhaes N.S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA microspheres // *J. Microencapsul.* - 2004. - V. 21. - P. 371–384.

- ¹⁹³ da Silva Santos N.P., Nascimento S.C., Wanderley M.S., Pontes-Filho N.T., da Silva J.F., de Castro C.M., Pereira E.C., da Silva N.H., Honda N.K., Santos-Magalhães N.S. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. - 2006. - V. 64. - №2. - P. 154-160.
- ¹⁹⁴ Kristmundsdottir T., Aradottir H.A., Ingolfsdottir K., Ögmundsdottir H.M. Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture // *J. Pharm. Pharmacol.* - 2002. - V. 54. - P. 1447-1452.
- ¹⁹⁵ Takai M., Uehara Y., Beisler J.A. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents // *J. Med. Chem.* - 1979. - V. 22. - P. 1380–1384.
- ¹⁹⁶ Millot M., Kaouadji M., Champavier Y., Gamond A., Simon A., Chulia A.J. Usnic acid derivatives from *Leprocaulon microscopicum* // *Phytochemistry Letters*. - 2013. - V. 6. - №1. - P. 31-35.
- ¹⁹⁷ Thune P., Solberg Y., McFadden N., Staerfeld F., Sandberg M. Perfume allergy due to oak moss and other lichens // *Contact Dermatitis*. - 1982. - V. 8. - P. 396–400.
- ¹⁹⁸ Dahlquist I., Fregert S. Contact allergy to anthranorin and perfumes // *Contact Dermatitis*. - 1980. - V. 6. - P. 111–119.
- ¹⁹⁹ Sheu M., Simpson E.L., Law S.V., Storrs F.J. Allergic contact dermatitis from a natural deodorant: A report of 4 cases associated with lichen acid mix allergy // *Journal of the American Academy of Dermatology*. - 2006. - V. 55. - №2. - P. 332–337.
- ²⁰⁰ Heine A. Allergisches Kontaktekzem durch Usninsäure in Deodorant Sprays // *Derm. Monatsschr.* - 1987. - V. 173. - P. 221–225.
- ²⁰¹ Gonçalo S. Contact sensitivity to lichens and compositae in *Frullania dermatitis* // *Contact Dermatitis*. - 1987. - V. 16. - P. 84-86.
- ²⁰² Gonçalo S., Cabral F., Gonçalo M. Contact sensitivity to oak moss // *Contact Dermatitis*. - 1988. - V. 19. - P. 335-357.
- ²⁰³ Mitchell J.C., Maibach H.I. Sensitizing capacity of usnic acid derived from lichenized fungi // *Acta dermato-venereologica*. - 1969. - V. 49. - P. 498-500.
- ²⁰⁴ Hausen B.M., Emde L., Marks V. An investigation of the allergenic constituents of *Cladonia stellaris* (Opiz) Pous & Vezda ('silver moss', 'reindeer moss' or 'reindeer lichen') // *Contact Dermatitis*. - 1993. - V. 28. - P. 70–76.
- ²⁰⁵ Mitchell J.C. Stereoisomeric specificity of d—usnic acid in delayed hypersensitivity // *J. Invest. Derm.* - 1966. - V. 47. - P. 167.
- ²⁰⁶ Salo H., Hannuksela M., Hausen B.M. Lichen picker`s dermatitis // *Contact Dermatitis*. - 1981. - V. 7. - P. 9-13.

- ²⁰⁷ Rafanelli S., Bacchilega R., Stanganelli I., Rafanelli A. Contact dermatitis from usnic acid in vaginal ovules // *Contact Dermatitis*. - 1995. - V. 33. - №4. - P. 271–272.
- ²⁰⁸ Thune P.O., Solberg Y.J. Photosensitivity and allergy to aromatic lichen acids, Compositae oleoresins and other plant substances // *Contact Dermatitis*. - 1980. - V. 6. - P. 64–71.
- ²⁰⁹ Pacheco D., Travassos A.R., Antunes J., Soares de Almeida L., Filipe P., Correia T. Occupational airborne contact dermatitis caused by usnic acid in a domestic worker // *Allergologia et Immunopathologia*. - 2014. - V. 42. - №1. - P. 80-82.
- ²¹⁰ Krishna D.R., Venkataramana D. Pharmacokinetics of D(+)-usnic acid in rabbits after intravenous and oral administration // *Drug metabolism and disposition*. - 1992. - V. 20. - №6. - P. 909-911.
- ²¹¹ Venkataramana D., Krishna D.R. Pharmacokinetics of d(+)-usnic acid in rabbits after intravenous administration // *European Journal of Drug metabolism and Pharmacokinetics*. - 1993. - V. 18. - №2. - P. 161-163.
- ²¹² Foti R.S., Dickmann L.J., Davis J.A., Greene R.J., Hill J.J., Howard M.L., Pearson J.T., Rock D.A., Tay J.C., Wahlstrom J.L., Slatter J.G. Metabolism and related human risk factors for hepatic damage by usnic acid containing nutritional supplements // *Xenobiotica*. - 2008. - V.38. - №3. - P. 264–280.
- ²¹³ Krishna D.R., Ramana D.V., Mamidi N. V. In vitro protein binding and tissue distribution of D(+) usnic acid // *Drug Metabol. Drug Interact.* - 1995. - V. 12. - P. 53–63.
- ²¹⁴ Kutney J.P., Ebizuka Y., Salisbury P.J., Watt C.K., Towers G. An inducible hydrolase from *Mortierella isabellina* (basidiomycetes). The deacylation of (+)-usnic acid // *Phytochemistry*. - 1978. - V. 17. - №1. - P. 49-52.
- ²¹⁵ Vicente C., Gonzalez A., Legaz M.E. Factors affecting two different usnic acid dehydrogenases in the lichen *Evernia prunastri* // *Biochem. Syst. Ecol.* - 1986. - V. 14. - P. 263-266.
- ²¹⁶ Avalos A., Vicente C. Equivalence between Pfr and Cyclic AMP in the Induction of D-USnic Acid Dehydrogenase in the Lichen *Evernia prunastri* // *Plant Physiol.* - 1987. - V. 84. - P. 803-807.
- ²¹⁷ Shi Q., Greenhaw J., Salminen W.F. Inhibition of cytochrome P450s enhances (+)-usnic acid cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes // *J. Appl. Toxicol.* - 2014. - V. 34. - P. 835-840.
- ²¹⁸ Jayaprakasha G.K., Rao L.J. Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. // *Z. Naturforsch. [C]*. – 2000. – V. 55. – P. 1018–1022.
- ²¹⁹ Caviglia A.M., Nicora P., Giordani P., Brunialti G., Modenesi P. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (lichens) // *Il Farmaco*. - 2001. - V. 37.- P. 379–382.

- ²²⁰ Buffoni-Hall R.S., Bornman J.F., Björn L.O. UV-induced changes in pigment content and light penetration in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* spp. mitis // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* - 2002. - V. 66. - P. 13–20.
- ²²¹ Nybakken L., Julkunen-Tiitto R. UV-B induces usnic acid in reindeer lichens // *Lichenologist.* - 2006. - V. 38. - P. 477–485.
- ²²² Bjerke J.W., Lerfall K., Elvebakk A. Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divaricatic acids in two arctic-alpine lichens // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2002. - V. 1. - P. 678–685.
- ²²³ BeGora M.D., Fahselt D. Usnic acid and atranorin concentrations in lichens in relation to bands of UV irradiance // *Bryologist.* - 2001. - V. 104. - P. 134–140.
- ²²⁴ Rancan F., Rosan S., Boehm K., Fernandez E., Hidalgo M.E., Quihot W., Rubio C., Boehm F., Piazena H., Oltmanns U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* - 2002. - V. 68. - P. 133–139.
- ²²⁵ Odabasoglu F., Cakir A., Suleyman H., Aslan A., Bayir Y., Halici M., Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats // *J. Ethnopharmacol.* - 2006. - V. 103. - P. 59–65.
- ²²⁶ Kohlhardt-Floehr C., Boehm F., Troppens S., Lademann J., Truscott T.G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation—studies on human cells // *Journal J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* - 2010. - V. 101. - P. 97–102.
- ²²⁷ Behera B.C., Mahadik N., Morey M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation // *Pharmaceutical Biology.* - 2012. - V. 50. - №8. - P. 968–979.
- ²²⁸ Atalay F., Halici M.B., Mavi A., Çakir A., Odabaşoğlu F., Kazaz C., Aslan A., Küfrevioğlu Ö.I. Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species // *Turk. J. Chem.* - 2011. - V. 35. - P. 647 – 661.
- ²²⁹ Kumar S., Müller K. Lichen Metabolites. 1. Inhibitory Action Against Leukotriene B4 Biosynthesis by a Non-Redox Mechanism // *J. Nat. Prod.* - 1999. - V. 62. - P. 817-820.
- ²³⁰ Santos L.C., Honda N.K., Carlos I.Z., Vilegas W. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens // *Fitoterapia.* - 2004. - V. 75. - №5. - P. 473-479.
- ²³¹ Jin J., Li C., He L. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor- κ B-dependent tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7 // *Phytotherapy Research.* - 2008. - V. 22. - № 12. - P. 1605-1609.

- ²³² Boehm F., Clarke K., Edge R., Fernandez E., Navaratnam S., Quilhot W., Rancan F., Truscott T.G. Lichens – photophysical studies of potential new sunscreens // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* - 2009. - V. 95. - P. 40–45.
- ²³³ Valencia-Islas N., Zambrano A., Rojas J.L. Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichens exposed to chronic oxidant air pollution from Mexico City // *J. Chem. Ecol.* - 2007. - V. 33. - P. 1619–1634.
- ²³⁴ Thadhani V.M., Choudhary M.I., Ali S., Omar I., Siddique H., Karunaratne V. Antioxidant activity of some lichen metabolites // *Natural Product Research.* - 2011. - V. 25. - №19. - P. 1827–1837.
- ²³⁵ Vicente, C., Azpiroz A., Esttvez M.P., Gonzales L. Quaternary structure changes and kinetics of urease inactivation by L-usnic acid in relation to the regulation of nutrient transfer between lichen symbionts // *Plant, Cell and Environment.* - 1978. - V. 1. - P. 29-33.
- ²³⁶ Lawrey J.D. Lichen allelopathy: A review. // *American Chemical Society Symposium Series.* - 1995. - V. 582. - P. 26–38.
- ²³⁷ Vicente C., Cifuentes B. L-usnate and permeability // *Cryptogamie, Bryol. Lichenol.* - 1981. - V. 2. – P. 213-222.
- ²³⁸ Bialczyk J., Latkowska E., Lechowski Z. Allelopathic effects of (+)-usnic acid on some phytohormone concentrations in tomato plants // *Allelopathy Journal.* - 2011. - V. 28. - №1. - P. 115-122.
- ²³⁹ Cifuentes B., Vicente C. Binding studies on L-usnic acid to D-fructose-6-P aminotransferase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1980. - V. 95. - P. 1550–1554.
- ²⁴⁰ Gonzalez A., Cifuentes B. Reversal by dithiothreitol of urease inactivation by L-usnic acid // *Phytochemistry.* - 1986. - V. 25. - №5. - P. 1063-1066.
- ²⁴¹ Arribas L., Vicente C. Enzyme Inhibition by Usnic Acids // *Current Enzyme Inhibition.* - 2008. - V. 4. - №4. - P. 180-185.
- ²⁴² Planelles V., Estrella Legaz M. Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid // *Plant Science.* - 1987. - V. 51. - №1. - P. 9-16.
- ²⁴³ Legaz M.E., Vicente C., Pedrosa M.M. Binding of lichen phenolics to purified secreted arginase from the lichen *Evernia prunastri* // *J. Biochem. Molec. Biol.* - 2001. - V. 34. - P. 194–200.
- ²⁴⁴ Bucar F., Schneider I., Ogmundsdóttir H., Ingólfssdóttir K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets // *Phytomedicine.* - 2004. - V. 11. - №7-8. - P. 602-606.

- ²⁴⁵ Cifuentes B., Vicente C. Action of L-usnic acid on glucosamine phosphate isomerase activity of *Proteus mirabilis* // *Cryptogam. Bryol. Lichenol.* - 1983. - V. 4. - P. 255- 257.
- ²⁴⁶ Seo C., Sohn J.H., Park S.M., Yim J.H., Lee H.K., Oh H. Usimines A-C, Bioactive Usnic Acid Derivatives from the Antarctic Lichen *Stereocaulon Alpinum* // *J. Nat. Prod.* - 2008. - V. 71. - P. 710–712.
- ²⁴⁷ Bruno M., Trucchi B., Burlando B., Ranzato E., Martinotti S., Akkol E.K., Süntar I., Keleş H., Verotta L. (+)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* – 2013. – V. 21. P. 1834–1843.
- ²⁴⁸ Vijayakumar C.S., Viswanathan S., Kannappa Reddy M., Parvathavarthini S., Kundu A.B., Sukumar E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid // *Fitoterapia.* – 2000. – V. 71. - №5. – P. 564-566.
- ²⁴⁹ Huang Z., Zheng G., Tao J., Ruan J. Anti-inflammatory effects and mechanisms of usnic acid // *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* – 2011. – V. 26. - №5. - P. 955 - 959.
- ²⁵⁰ Okuyama E., Umeyama K., Yamazaki M., Kinoshita Y., Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta* // *Planta Medica.* – 1995. – V. 61. - №2. – P. 113-115.
- ²⁵¹ Mustafa M.R., Mohamad R., Din L., Wahid S. Smooth muscle relaxant activities of compounds isolated from Malaysian medicinal plants on rat aorta and Guinea-pig ileum // *Phytother. Res.* – 1995. – V. 9. – P. 555–558.
- ²⁵² Buemi G., Zuccarello F. Molecular conformations, hydrogen-bond strengths and electronic structure of usnic acid: an AM1 and CNDO/S study // *Journal of Molecular Structure: Theochem* – 1990. – V. 209. – P. 89-99.
- ²⁵³ Galasso V. Probing the molecular and electronic structure of the lichen metabolite usnic acid: A DFT study // *Chemical Physics.* – 2010. – V. 374. – P. 138-145.
- ²⁵⁴ Sharma R.K., Jannke P.J. Acidity of usnic acid // *Indian J. Chem.* – 1966. – V. 4. – P. 16-18.
- ²⁵⁵ Пат. РФ № 2317076С1. Способ получения усниновой кислоты. / Н.Ф. Салахутдинов, М.П. Половинка, М.Ю. Панченко // *Бюл.* – 2008. - №5
- ²⁵⁶ **Половинка М.П., Комарова Н.И., Корчагина Д.В., Соколов Д.Н., Лузина О.А., Власенко Н.Г., Малюга А.А., Романова Е.В., Салахутдинов Н.Ф. Вторичные метаболиты лишайника *Cladonia stellaris* // *Химия природных соединений.* – 2012. – V. 48. - № 3. – P. 356-359.**
- ²⁵⁷ Manaktala S.K., Neelakantan S., Seshadri T.R. A study of the condensation products of usnic acid with amino compounds // *Indian J. Chem.* - 1967. - V. 5. - P. 29-33.

- ²⁵⁸ Сорокина И.В., Крысин А.П., Хлебникова Т.Б., Кобрин В.С., Попова Л.Н. Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободно радикальному окислению // Экология. Серия аналитических обзоров мировой литературы. – 1997 – V. 46. - № 3. – 66с.
- ²⁵⁹ Машковский М. Д. Лекарственные средства. — М.: ООО «Новая волна», 2002. — Т. 1. — 540 с.
- ²⁶⁰ Tomasi S., Picard S., Laine S., Babonneau V., Goujeon A., Boustie J., Uriac P. Solid-phase synthesis of polyfunctionalized natural products: application to usnic acid, a bioactive lichen compound // J. Comb. Chem. - 2006. - V. 8. - P. 11-14.
- ²⁶¹ Purser S., Moore P. R., Swallow S., Gouverneur V. Fluorine in medicinal chemistry. // Chem. Soc. Rev. – 2008. – V. 37. - P. 320-330.
- ²⁶² Тазетдинова А.А., Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Толстикова Г.А. Аминопроизводные усниновой кислоты // Химия природных соединений. – 2009. - № 6. - С. 672-675.
- ²⁶³ Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Толстикова Г.А. Химическая модификация усниновой кислоты. Сообщение 2. Взаимодействие (+)-усниновой кислоты с аминокислотами // Изв. Акад. наук. Сер. Хим. – 2007. - № 6. – С. 1203-1205.
- ²⁶⁴ Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Толстикова Г.А. Химическая модификация усниновой кислоты. III. Взаимодействие (+)-усниновой кислоты с замещёнными фенилгидразинами. // ЖОрХ. – 2009. - Т. 45. - № 12. С. 1790-1795.
- ²⁶⁵ Лузина О. А., Соколов Д. Н., Покровский М. А., Покровский А. Г., Беккер О. Б., Даниленко В. Н., Салахутдинов Н. Ф. Синтез и биологическая активность энаминопроизводных усниновой кислоты. // Химия природных соединений. -2015. – V. 51. – №4. -С. 557-562.
- ²⁶⁶ Патент РФ № 2477127. Получение квартернизованных производных усниновой кислоты и их биологические свойства. / О.Б. Беккер, В.Н. Даниленко, О.А. Лузина, Н.Ф. Салахутдинов // Опубликовано: 10.03.2013. Бюл. № 7.
- ²⁶⁷ Erba E., Pocar D., Rossi L.M. New esters of R-(+)-usnic acid // Il Farmaco. - 1998. - V. 53. - P. 718-720.
- ²⁶⁸ Kutney J.P., Leman J.D., Salisbury P.J., Yee T. Studies in the usnic acid series. IX. The biodegradation of (+)-usnic acid by *Mucor Globosus* // Can. J. Chem. - 1984. - V.62. - P. 320-325.
- ²⁶⁹ Bertilsson L., Wachtmeister C. Methylation and Racemisation on usnic acid // Acta Chem. Scand. - 1968. - V. 22. - P. 1791-1800.

- ²⁷⁰ Khan F.A., Satapathy R., Sudheer Sh., Nageswara Rao Ch. A new reaction of diazomethane with norbornyl α -diketones // *Tetrahedron Let.* - 2005. - V. 46. - P. 7193–7196.
- ²⁷¹ Illa O., Rodríguez-García C., Acosta-Silva C., Favier I., Picurelli D., Oliva A., Gómez M., Branchadell V., Ortuño R.M. Cyclopropanation of cyclohexenone by diazomethane catalyzed by palladium diacetate: evidence for the formation of palladium (0) nanoparticles // *Organometallics.* - 2007. - V. 26. - P. 3306-3314.
- ²⁷² *Organofluorine Compounds in Medicinal Chemistry and Biomedical Applications* / Filler, R., Kobayashi, Y., Yagupolskii, L.M., eds. *Studies in Organic Chemistry* 48. Elsevier Science Publishers : Amsterdam. Netherlands B.V. -1993. -386p.
- ²⁷³ Furin G.G., Chi K.-W. *Synthetic Methods for Fluoroorganic Compounds.* - Ulsan (Rorea, South), University of Ulsan Press, 2001. - 400 pp.
- ²⁷⁴ **Фури́н Г.Г., Лузина О.А., Сокуев Р.И., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Толстикова Г.А. Химическая модификация усниновой кислоты. Сообщение 1. Взаимодействие (+)-усниновой кислоты с перфторолефинами // Изв. Акад. наук. Сер. Хим. – 2007. - № 6. – С. 1198-1202.**
- ²⁷⁵ **Соколов Д.Н., Лузина О.А., Корчагина Д.В., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф. Взаимодействие (+)-усниновой кислоты и некоторых ее производных с diazomethane // Химия природных соединений. – 2011. - V. 47. - № 5. – С. 623-627.**
- ²⁷⁶ **Zakharenko A., Sokolov D., Luzina O., Sukhanova M., Khodyreva S., Zakharova O., Salakhutdinov N., Lavrik O. Influence of Usnic Acid and its Derivatives on the Activity of Mammalian Poly(ADP-ribose)polymerase 1 and DNA Polymerase // *Medicinal Chemistry.* - 2012. - V. 8. - P. 883-893.**
- ²⁷⁷ **Патент РФ № 2448464С1. Синергист для повышения эффективности биопрепаратов против колорадского жука. / М.П. Половинка, Н.Ф. Салахутдинов, В.Ю.Крюков, Ярославцева О.Н., Ходырев В.П., В.В.Глулов // опубликовано: 27.04.2012 Бюл. Изобр. 2012 № 12.**
- ²⁷⁸ **Крюков В.Ю., Лузина О.А., Ярославцева О.Н., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Глулов В.В. Скрининг модификантов усниновой кислоты – потенциальных синергистов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* для регуляции численности колорадского жука // АГРОХИМИЯ. - 2012. - № 2. - С. 59–66.**
- ²⁷⁹ Shibata S., Takahashi K., Tanaka Y. Decomposition of usnic acid. VII. Pyrolysis of dihydrousnic acid. Isodihydrousnic acid // *Chem. Pharm. Bull.* - 1956. - V. 23. - P. 623-628.
- ²⁸⁰ Carey F.A. *Organic Chemistry (Fifth Edition).* — The McGraw-Hill Companies, 2004. — 1328 pp.

- ²⁸¹ Кутуля Л.А., Пивненко Н.С., Петренко А.С., Ващенко В.В., Гудби Дж.В. Изучение конфигурационной изомерии и конформационного равновесия методами ЯМР и молекулярной механики на примере хиральных производных циклогексенона // ЖСХ. - 2001. - Т. 42(1). - С. 101-110.
- ²⁸² Brunel J.M., Maffei M., Buono G. Enantioselective reduction of ketones with borane, catalyzed by (S)-(-)-proline or (S)-(+)-prolinol // Tetrahedron: Asymmetry. - 1993. - V. 4. - P. 2255-2260.
- ²⁸³ Wan P., Barker B., Diao L., Fischer M., Shi Y., Yang. 1995 Merck Frosst Award Lecture Quinone methides: relevant intermediates in organic chemistry // Can. J. Chem. - 1996. - V. 74. - P. 465-475
- ²⁸⁴ Venter D.P., Greeff D.F. Mechanism of the etherification of 2-alkylamino-1-phenylethanol derivatives // Tetrahedron. - 1980. - V. 36. - P. 305-307
- ²⁸⁵ Van De Water R.W., Pettus T.R.R. o-Quinone methides: intermediates underdeveloped and underutilized in organic synthesis // Tetrahedron. - 2002. - V. 58. - P. 5367-5405
- ²⁸⁶ Соколов Д.Н., Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф. Восстановление усниновой кислоты и её пиразольного производного боргидридом натрия // Химия природных соединений. – 2011. – Т. 47. № 2. – Р. 188-190.
- ²⁸⁷ Соколов Д.Н., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. Синтез простых эфиров пиразольных производных (+)-усниновой кислоты. // Химия природных соединений. – 2012. - №3. - С. 345-349.
- ²⁸⁸ Kutney J.P., Sanchez I.H. Studies in the usnic acid series. IV. Based catalysed usnic acid - isousnic acid rearrangements. Part III. (-)-Usnic acid isomethoxide monoacetate // Can. J. Chem. - 1977. - V.55. - P. 1079-1084.
- ²⁸⁹ Kutney J.P., Sanchez I.H., Yee T. Studies in the usnic acid series. III. The base catalyzed usnic acid - isousnic acid rearrangement. The synthesis of (+)-isousnic acid // Can. J. Chem. - 1976. - V.54. - P. 3721-3731.
- ²⁹⁰ Takahashi K., Takani M. Usnic acid. XV. Alkaline degradation of usnic acid // Chem. Pharm. Bull. - 1980. - V. 28. - P. 177-180.
- ²⁹¹ Kutney J.P., Leman J.D., Salisbury P.J., Sanchez I.H., Yee T. Studies in the usnic acid series. VII. The biodegradation of (+)-usnic acid by *Pseudomonas* species. Isolation, structure determination, and synthesis of (+)-6-desacetylusnic acid // Can. J. Chem. - 1977. - V.55. - P. 2336-2352.
- ²⁹² Kutney J.P., Leman J.D., Salisbury P.J., Yee T. Studies in the usnic acid series. IX. The biodegradation of (+)-usnic acid by *Mucor globosus* // Can. J. Chem. - 1984. - V. 62. - P. 320-325

- ²⁹³ Norrestam R., von Glehn M., Wachtmeister C.A. Three-dimensional structure of usnic acid // *Acta Chem. Scand. B.* – 1974. – V. 28. – p. 1149-1152.
- ²⁹⁴ F.R. Fronczek, Fischer N.H. [Электронный ресурс] / CCDC Private Communication - 2006. - CCDC refcode USNICA11.
- ²⁹⁵ Adam W., Herrmann W., Saha-Moller C.R., Shimizu M. Oxidation of methoxybenzenes to p-benzoquinones catalyzed by methyltrioxorhenium(VII) // *J. Mol. Cat.* - 1995. - V. 97. - P. 15- 20.
- ²⁹⁶ Соколов Д.Н., Лузина О.А., Половинка М.П., Корчагина Д.В., Гатилов Ю.В., Салахутдинов Н.Ф. Окисление усниновой кислоты. // *Химия природных соединений.* – 2010. – Т. 46. - № 5. – С. 616-618.
- ²⁹⁷ Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Толстикова Г.А. Реакция Шмидта с усниновой кислотой // *Химия природных соединений.* - 2009. - № 2. - С. 215.
- ²⁹⁸ Лузина О.А., Соколов Д.Н., Шернюков А.В., Салахутдинов Н.Ф. Синтез ауранов на основе усниновой кислоты. // *Химия природных соединений.* – 2012. - №3. - С. 350-355.
- ²⁹⁹ Лузина О.А., Соколов Д.Н., Комарова Н.И., Салахутдинов Н.Ф. Синтез сульфидов на основе(+)-усниновой кислоты // *Химия природных соединений.* – 2014. – V. 50. - № 2. – С. 236-240.
- ³⁰⁰ Young-Joon S. Bioactivation of benzylic and allylic alcohols via sulfo-conjugation // *Chemico-Biological Interactions.* – 1998. – V. 109. – P. 221-235.
- ³⁰¹ Loghmani-Khouzani H., Poorheravi M.R., Sadeghi M.M., Caggiano L., Jackson R.F.W. α -Fluorination of β -ketosulfones by Selectfluor® F–TEDA–BF₄ // *Tetrahedron.* – 2008. – V. 64. – P. 7419-7425.
- ³⁰² Cotton H., Elebring T., Larsson M., Li L., Sørensen H., von Unge S. Asymmetric synthesis of esomeprazole // *Tetrahedron:Asymmetry.* -2000. – V. 11. P. 3819-3825.
- ³⁰³ Boyd E., Chavda S., Coulbeck E., Coumbarides G.S., Dingjan M., Eames J., Flinn A., Krishnamurthy A.K., Namutebi M., Northen J., Yohannes Y. Synthesis, characterisation and application of enantiomeric isotopomers of Evans' oxazolidinones // *Tetrahedron:Asymmetry.* - 2006. - V. 17. - P. 3406-3422.
- ³⁰⁴ Jammi S., Saha P., Sanyashi S., Sakthivel S., Punniyamurthy T. Chiral binuclear copper(II) catalyzed nitroaldol reaction: scope and mechanism // *Tetrahedron.* – 2008. – V. 64. – P. 11724-11731.
- ³⁰⁵ Конева Е.А., Волчо К.П., Корчагина Д.В., Комарова Н.И., Кочнев А.И., Салахутдинов Н.Ф., Толстикова А.Г. Синтез новых хиральных оснований Шиффа на основе (+)- и (-)- α -пиненов для использования в асимметрическом металлокомплексном окислении сульфидов. // *Изв. РАН. Сер. Хим.* – 2008. - № 1. – С. 105-113.

- ³⁰⁶ Bellale E., Naik M., Varun V.B., Ambady A., Narayan A., Ravishankar S., Ramachandran V., Kaur P., McLaughlin R., Whiteaker J., Morayya S., Guptha S., Sharma S., Raichurkar A.K., Awasthy D., Achar V., Vachaspati P., Bandodkar B., Panda M., Chatterji M. Diarylthiazole: An Antimycobacterial Scaffold Potentially Targeting PrrB-PrrA Two-Component System. // *J. Med. Chem.* – 2014. – V. 57. - P. 6572–6582.
- ³⁰⁷ Jatav V., Mishra P., Kashaw S., Stables J. P. Synthesis and CNS depressant activity of some novel 3-[5-substituted 1,3,4-thiadiazole-2-yl]-2-styryl quinazoline-4(3H)-ones. // *European Journal of Medicinal Chemistry.* – 2008. V. 43. - № 1. – P. 135-141.
- ³⁰⁸ Ogle C.R.; Main L. Kinetics and mechanism of the intramolecular substitution of acetate in 2'-hydroxyphenacyl acetate: 2'-hydroxyphenacyl as a potential protective group for carboxylic acids // *Journal of Chemical Research, Synopses.* - 2001 - № 11. - P. 472 – 473.
- ³⁰⁹ Robinson J. M., Flynn E.T., McMahan T.L., Simpson S.L. Benzoin Enediol Dianion and Hydroxide Ion in DMSO: A Single Electron Transfer Reduction System Driven by the Irreversible Benzilic Acid Rearrangement // *J. Org. Chem.* – 1991. - V. 56. - № 23. – P. 6709-6712.; Strom E. T., Russell G. A., Schoeb J. H. Semidiones. II. Radical Anions of 2,2'-Furil, 2,2'-Thenil, and 3,3'-Thenil' // *JACS* – 1966. - V. 88. - № 9. – P. 204-207.
- ³¹⁰ Zefirov N.S., Makhon'kov D.I. X-philic reactions // *Chem. Rev.* – 1982. – V.82. – P. 615-624.
- ³¹¹ **Bekker O.B., Sokolov D.N., Luzina O.A., Komarova N.I., Gatilov Y.V., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Maslov D.A., Chernousova L.N., Salakhutdinov N.F., Danilenko V.N. Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (–)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against *Mycobacterium tuberculosis* // *Medicinal Chemistry Research.* – 2015. – V. 24. - № 7. - P. 2926-2938.**
- ³¹² **Рахманова М.Е., Лузина О.А., Покровский М.А., Покровский А.Г., Салахутдинов Н.Ф. Синтез цианэтильных производных усниновой кислоты и их цитотоксическая активность // *Изв. Акад. Наук Серия Химическая.* – 2016. – №2. – С. 566-569.**
- ³¹³ Корулькин Д.Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилова, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстикова. - Новосибирск: «Гео», 2007. - 232 с.
- ³¹⁴ Hergert H.L., Coad P., Logan A.V. The Methylation of Dihydroquercetin // *J. Org. Chem.* - 1956. - V. 21. - № 3. – P. 304-308.
- ³¹⁵ Imafuku K., Honda M., McOmie J.F.W. Cyclodehydrogenation of 2'-hydroxychalcones with DDQ: a simple route for flavones and aurones // *Synthesis.* - 1987. - P. 199-201.
- ³¹⁶ Nadri H., Pirali-Hamedani M., Shekarchi M., Abdollahi M., Sheibani V., Amanlou M., Shafiee A., Foroumadi A. Design, synthesis and anticholinesterase activity of a novel series of 1-benzyl-4-

((6-alkoxy-3-oxobenzofuran-2(3H)-ylidene) methyl) pyridinium derivatives // *Bioorg. Med. Chem.* - 2010. - V. 18. - P. 6360–6366.

³¹⁷ Соколов Д.Н., Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Толстиков Г.А. Синтез халконов на основе (+)- и (-)-усниновой кислоты. // *Изв. Акад. Наук. Сер. Химическая* – 2011. - №11. – P. 2359-2364.

³¹⁸ Соколов Д. Н., Рахманова М. Е., Лузина О. А., Шернюков А. В., Салахутдинов Н. Ф. Синтез новых производных (+)-усниновой кислоты с флавоновым остовом. // *Изв. Акад. наук. Сер. Хим.* – 2013. - № 1. – С. 211.

³¹⁹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012, с.652.

³²⁰ D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva, Poirier G.G. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. // *Biochem. J.* – 1999. – V. 342. – P. 249-268.

³²¹ Ferraris D.V. Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. From concept to clinic. // *J. Med. Chem.* – 2010. – V. 53. – P. 4561-4584.

³²² Schüler H., Ziegler M. Pharmacology of ADP- ribosylation. // *FEBS Journal.* – 2013. – V. 280. – № 15. - P. 3542.

³²³ Dexheimer T.S., Antony S., Marchand C., Pommier Y. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase as a target for anticancer therapy. // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2008. – V. 8. - № 4. – P. 381-389.

³²⁴ Beretta G.L., Cossa G., Gatti L., Zunino F., Perego P. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 targeting for modulation of camptothecin-based treatment. // *Curr. Med. Chem.* – 2010. – V. 17. – P. 1500–1508.

³²⁵ Antony S., Marchand C., Stephen A.G., Thibaut L., Agama K.K., Fisher R.J., Pommier Y. Novel high-throughput electrochemiluminescent assay for identification of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors and characterization of furamidine (NSC 305831) as an inhibitor of Tdp1. // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – P. 4474–4484.

³²⁶ Nguyen T. X., Morrell A., Conda-Sheridan M., MArchand C., Agama K., Bermingam A., Stephen A.G., Chergui A., Naumova A., Fisher R., O'Keefe B.R., Pommier Y., Cushman M. Synthesis and Biological Evaluation of the First Dual Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I (Tdp1)–Topoisomerase I (Top1) Inhibitors. // *J. Med. Chem.* - 2012. – V. 55. – P. 4457–4478.

³²⁷ Ramón-García S., Ng C., Anderson H., Chao J.D., Zheng X., Pfeifer T., Av-Gay Y., Roberge M., Thompson C.J. Synergistic drug combinations for tuberculosis therapy identified by a novel high throughput screen // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2011. – V. 55. - №8. – P. 3861-3869.

- ³²⁸ Sakai J., Rawson R.B. The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport // *Curr. Opin. Lipidol.* - 2001. - V. 12. - P. 261–266.
- ³²⁹ D.N. Sokolov, V.V. Zarubaev, A.A. Shtro, M.P. Polovinka, O.A. Luzina, N.I. Komarova, N.F. Salakhutdinov, O.I. Kiselev **Anti-viral activity of (-)- and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009.** // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2012. – V. 22. – P. 7060-7064.
- ³³⁰ Shtro A.A., Zarubaev V.V., Luzina O.A., Sokolov D.N., Kiselev O.I., Salakhutdinov N.F. **Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus** // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* – 2014. – V. 22. - P. 6826–6836.
- ³³¹ Kryukov V.Yu., Martemyanov V.V., Polovinka M.P., Luzina O.A., Dubovsky I.M., Serebrov V.V., Khodyrev V.P., Malyarchuk A.A., Gerber O.N., Yaroslavtseva O.N., Boyarishcheva E.A., Levchenko M.V., Glupov V.V., Salakhutdinov N.F., Tolstikov G.A. **Usnic Acid Is a Promising Synergist for Biopreparations Based on Entomopathogenic Microorganisms** // *Doklady Biological Sciences.* – 2008. – V. 423. - P. 416–418.
- ³³² Патент РФ № RU 2500675. Средство для ингибирования фермента поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 человека. / Захаренко А.Л., Соколов Д.Н., Лузина О.А., Суханова М.В., Ходырева С.Н., Захарова О.Д., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О.И. // Опубликовано: 10.12.2013. Бюл. № 34
- ³³³ Патент РФ № 2328493С1. Применение усниновой кислоты в качестве синергиста инсектицидов на основе энтомопатогенных микроорганизмов. / М.П. Половинка, Н.Ф. Салахутдинов, В.В.Глупов, В.В.Серебров, И.М.Дубовский, В.В.Мартемьянов, В.Ю.Крюков // опубликовано: 10.07.2008 Бюл. № 19
- ³³⁴ Патент РФ № 2464033С1. Усниновая кислота и её окисленное производное в качестве ингибиторов репродукции вируса гриппа. / Соколов Д.Н., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Киселев О.И., Зарубаев В.В., Штро А.А. // опубликовано: 20.10.2012 Бюл. № 29.
- ³³⁵ Патент РФ № 2483722. Аминотиазольные производные усниновой кислоты как новые противотуберкулезные агенты. / О.Б. Беккер, В.Н. Даниленко, О.А. Лузина, Д.Н. Соколов, Н.Ф. Салахутдинов // Опубликовано: 10.06.2013. Бюл. № 16.
- ³³⁶ Патент РФ № RU 2533707 С1. Фурилиденфураноновые производные усниновой кислоты как новые противотуберкулезные агенты. / Беккер О.Б., Даниленко В.Н., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф., Соколов Д.Н. // Опубликовано: 20.11.2014. Бюл. № 32.

³³⁷ Пат. РФ № 2536873С1. Производные усниновой кислоты как противоопухолевые агенты. / Покровский А.Г., Покровский М.А., Лузина О.А., Соколов Д.Н.,

Салахутдинов Н.Ф. // опубликовано: 27.12.2014 Бюл. № 36

³³⁸ Juaristi E., Quintana D., Lamatsch B., Seebach D. Asymmetric Synthesis of β -Amino Acids. 1. Highly Diastereoselective Addition of a Racemic β -Alanine Enolate Derivative to Electrophiles // J. Org. Chem. – 1991. – V. 56. - №7. – P. 2553–2557.

ПРИЛОЖЕНИЕ. МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ УСНИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

1. Цитотоксическая активность в отношении раковых клеток

1.1 Влияние производных усниновых кислот на жизнеспособность опухолевых клеток человека МТ-4, U-937 и СЕМ-13.

Опухолевые клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку, антибиотики (100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина), в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C. Жизнеспособность клеток после инкубации с соединениями (1-11) определяли с помощью МТТ теста, который основан на способности живых клеток превращать соединения на основе тетразола (МТТ) в ярко окрашенные кристаллы формазана, что позволяет спектрофотометрически оценивать количество живых клеток в препарате. Для этого клетки высаживали в 96-луночные планшеты (100 мкл клеток с концентрацией 500 тыс. клеток/мл). Затем к клеткам добавляли раствор тестируемых соединений в ДМСО до конечной концентрации в среде от 0.25 до 200 мкМ. Клетки инкубировали в присутствии соединений еще в течение 3-х суток в тех же условиях. По окончании инкубации, без смены среды, к клеткам добавляли раствор МТТ (5 мг/мл) в фосфатно-солевом буфере до концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали в течение 3 ч в тех же условиях. Среду удаляли, к клеткам добавляли по 100 мкл ДМСО, в котором происходит растворение образовавшихся в клетках кристаллов формазана, и измеряли оптическую плотность на многоканальном спектрофотометре на длинах волн 570 и 630 нм, где A_{570} – поглощение формазана, а A_{630} – фон клеток. Данные представляли в виде количества живых клеток относительно контроля. За 100% принимали количество клеток в контроле, где клетки инкубировали в отсутствие соединения, но в присутствии растворителя ДМСО.

1.2. Влияние соединений на индукцию апоптоза в опухолевых клетках человека МТ-4.

Для изучения индукции апоптоза использовали концентрацию соединений, вызывающую гибель 50% клеток. В результате активации апоптоза происходит фрагментация ДНК за счет активации эндонуклеаз. Для определения фрагментированной ДНК клетки окрашивают красителем пропидиум иодид и затем определяют процент фрагментированной ДНК, с использованием проточного цитофлуориметра. Фиксируют

клетки в суспензии в 70% этаноле путем добавления 1 мл клеток, суспендированных в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) ($1-5 \times 10^6$ клеток), к 9 мл 70% этанола в пробирке на льду. Далее клетки центрифугируют при 200 g, в течение 3 мин, этанол удаляют, клетки суспендируют в 10 мл PBS и центрифугируют при 300 g, в течение 5 мин. Затем клетки суспендируют в 0,5 мл PBS и инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования при 300 g в течение 5 мин осадок клеток суспендируют в 1 мл в растворе для окрашивания ДНК. Раствор для окрашивания ДНК готовят следующим образом: растворяют 200 мкг пропидиум иодида в 10 мл ФСБ, а затем добавляют 10 мкл Triton X-100 и 2 мг РНКазы. Полученный раствор инкубируют 15 мин при 70 °С. Для окрашивания клетки инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре.

Анализ клеток проводят методом проточной цитометрии на цитофлюориметре Sauto FACS. Для возбуждения флуоресценции используют лазер (длина волны 488 нм), измеряют флуоресценцию при длине 600 нм и светорассеяние. Производят подсчет 10000 клеток. Количество клеток, в которых наблюдается апоптоз, соответствует области SubG1.

2. Исследование ферментингибирующей активности усниновых кислот и их производных

2.1 Исследование влияния соединений на активность ПАРП1

Рекомбинантная поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 человека (КФ 2.4.2.30) была экспрессирована в системе *Escherichia coli* (штамм BL21 DE3 (pLys E)). Синтез ПАРП-1 индуцировали добавлением IPTG до 1 мМ, далее клеточную культуру инкубировали в течение 3 ч при 37°. Затем клетки осаждали центрифугированием и полученный осадок суспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10%-ный глицерин, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ PMSF (фенилметилсульфонил фторид), 1 мМ бензамидин (буфер А), AntPrt-Coctail в количестве, рекомендованном производителем, и 2 М NaCl. Клетки разрушали ультразвуком. Дальнейшая схема очистки включала ряд последовательных хроматографий с использованием никелевой сефарозы (элюция 250 мМ имидазолом в буфере А), гепарин-сефарозы (элюция линейным градиентом NaCl (0,1–0,8 М) в буфере А) и одноцепочечной ДНК-целлюлозы (элюция линейным градиентом NaCl (0,1–1 М) в буфере А). Чистоту полученных препаратов ПАРП-1 контролировали на всех стадиях очистки с помощью электрофореза по методу Лэммли [Laemmli, U.K. Nature, 227, 680–685, 1970]. Диализ конечного препарата проводили против буфера А, содержавшего 0,1М NaCl. Конечный препарат хранили в аликвотах по 20 мкл при –70°.

В качестве тест-системы для определения ингибирующих свойств предлагаемого соединения использована реакция автополи(АДФ-рибозил)ирования, катализируемая ПАРП-1. Условия проведения реакции: 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 20 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl, 7 мМ β-меркаптоэтанол, активированная ДНК 2 A₂₆₀/мл, степень активации 25%, 0,3 мМ [³H] НАД⁺ (изотопное разбавление 1:1000) при температуре 37°C. Концентрация предлагаемого соединения (потенциального ингибитора) варьировалась в пределах от 10 нМ до 1 мМ. Реакцию запускали добавлением ПАРП-1 до конечной концентрации 500 нМ и останавливали нанесением на бумажные фильтры Whatman 1, пропитанные 5% ТХУ, через 30 сек. Фильтры отмывали в 5% ТХУ 4-хкратно, затем удаляли ТХУ 90% этанолом. Фильтры сушили на воздухе.

Обсчет включения радиоактивности в кислотонерастворимый продукт проводили на сцинтилляционном счетчике QuantaSmart в толуольном сцинтилляторе. Детекция радиоактивно меченого продукта проводилась на линейном участке зависимости скорости от времени реакции при концентрации природного субстрата НАД, равной K_m. В качестве показателя эффективности ингибирования использовали значение IC₅₀. Значение IC₅₀ представляет собой концентрацию испытуемого соединения, которая вызывает 50% снижение активности ПАРП-1. Расчет значений IC₅₀ проводили с помощью программы OriginPro 7.0.

2.2. Исследование влияния соединений на активность полимеразы β

Реакция синтеза ДНК, катализируемая полимеразой β проводилась в 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 20 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl, 7 мМ β-меркаптоэтанол, активированная ДНК 2 ОЕ/мл, 30 мкМ dNTP (каждая), α-[³²P]dATP 5 МВq/мл за 1 мин при 37°C. Реакцию запускали добавлением pol β до конечной концентрации 1 мкМ. Активность определялась обсчетом включения радиоактивности в кислотонерастворимый продукт как описано для ПАРП!

2.3. Исследование влияния соединений на активность Tdp1.

Рекомбинантная тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 человека (КФ 3.1.4.) была экспрессирована в системе *Escherichia coli* (плазида pET 16B-Tdp1 предоставлена доктором Кальдекотт К.У., Университет Сассекса, Великобритания) и выделена как описано [Lebedeva N.A. et al., FEBS Lett., 2011, 585, 683-686].

В качестве тест-системы для определения ингибирующих свойств исследуемых соединений использована реакция удаления тушителя флуоресценции Black Hole Quencher 1

(BHQ1) с 3'-конца олигонуклеотида, катализируемая Tdp1. На 5'-конце олигонуклеотида находится (5,6)-FAM – флуорофор, интенсивность флуоресценции которого возрастает при удалении тушителя. Для измерения флуоресценции использовался флуориметр POLARstar OPTIMA производства BMG LABTECH.

Реакционные смеси объемом 200 мкл содержали буфер (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM NaCl; 7 mM меркаптоэтанол), 50 нМ олигонуклеотид и различные концентрации ингибиторов. Реакция запускалась добавлением Tdp1 до конечной концентрации 1,3 нМ. Измерения проводились в линейном диапазоне зависимости скорости реакции от времени (до 8 минут) через каждые 55 секунд. Влияние предлагаемых соединений оценивали по величине IC₅₀ (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижена наполовину). Обсчет значений IC₅₀ проводили с помощью программы MARS Data Analysis 2.0 (BMG LABTECH).

3. Исследование антимикобактериальной активности усниновых кислот и их производных

3.1. Исследование антимикобактериальной активности соединений в тест-системе *M. smegmatis* mc²

Для определения антимикобактериальной активности производных усниновой кислоты использовали метод бумажных дисков. Методика заключается в определении величины зоны подавления роста штамма *M. smegmatis* mc², засеянного газоном на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих антибиотик или антибиотик в сочетании с ингибиторами протеинкиназ. При тестировании исследуемых веществ определяют МИК. Бактерии, выращенные на триптон-соевом агаре, засевают в жидкую среду Lemco-Tw (5 г/л бакто-пептона (Becton Dickinson, США), 5 г/л порошка Lab-Lemco (Oxoid, Великобритания), 5 г/л NaCl, 0.05% Tween-80) и выращивают в термостатируемом шейкере при 37⁰С при 100 об/мин до оптической плотности OD₆₀₀=1,2 (~2*10⁹ клеток в 1 мл). Затем бактериальную суспензию смешивают с расплавленным триптон-соевым агаром и водой, в соотношении 1:10:9 (v/v) и заливают полученной смесью чашки Петри с триптон-соевым агаром. После застывания на поверхность агара накладывают бумажные диски, содержащие исследуемые вещества в разных концентрациях. Культуру инкубируют в течение 18 часов при +37⁰С. Измеряют диаметр зоны ингибирования роста культуры и определяют МИК.

3.2. Определение острой токсичности вещества (+)-66.

Определение полуметальной дозы вещества (ЛД₅₀) проводилось при помощи уравнения линейной регрессии. Вещество, растворенное в ДМСО в различных концентрациях, вводилось инбредным мышам линии Balb/C по 0,3 мл перорально через зонд. В течении 30 дней наблюдалась динамика гибели животных. На основании полученных данных было построено уравнение линейной регрессии и определена полуметальная доза вещества.

3.3 Определение минимальной бактерицидной концентрации (МБК) соединения 261 путем пересева отмытой от соединения микобактериальной суспензии на свежую среду Middlebrook 7H9.

Бактерицидная концентрация соединения определяется путем пересева на свежую питательную среду осадков клеток из пробирок с отсутствием признаков роста культуры (при проведении этапов работы по определению МИК) и инкубирования в течение 42 дней. Наименьшая концентрация соединения, под действием которой в условиях *in vitro* число микроорганизмов в среде снижается на 99,9% (на 3 порядка), считается минимальной бактерицидной. Для отмытки осадка клеток от присутствующего в среде соединения пробирки центрифугируют при 3000 об/мин 15 минут при комнатной температуре и удаляют супернатант. В каждую пробирку к осадку добавляют 7 мл стерильного физиологического раствора и ресуспендируют осадок. Затем пробирки с содержимым центрифугируют при 3000 об/мин 15 минут и снова удаляют супернатант. Процедуру отмытки стерильным физиологическим раствором повторяют 2 раза. Отмытый таким образом от соединения осадок (весь объем микобактерий) из каждой пробирки засевают в пробирки со свежей средой Middlebrook 7H9, обогащенной ростовыми добавками (Becton Dickinson). В системе Bactec MGIT 960 начало роста культуры зависит от содержания живых микобактерий в инокуляте и снижение КОЕ на порядок вызывает задержку начала роста на 2 дня. Поэтому задержка роста культуры после пересева по сравнению с началом роста исходной как минимум на 6 дней свидетельствует о наличии бактерицидной активности соединения. Все выросшие культуры подвергаются контролю на видовую специфичность (принадлежность к микобактериям туберкулеза). Для определения кислотоустойчивости выросшей культуры проводится микроскопия мазков по Цилю-Нильсену. Наличие кислотоустойчивых палочек в мазке свидетельствует о принадлежности выросшей культуры к микобактериям.

Контроль специфичности выросших культур проводится методом ПЦР для детекции специфичного для микобактерий туберкулезного комплекса фрагмента ДНК IS6110 с использованием набора для выделения ДНК «Проба-рапида» («ДНК- технология») и набора для амплификации «Амплитуб РВ-скрин, ЗАО «Синтол») по инструкции фирмы-производителя.

Для исключения роста в системе Bactec MGIT 960 неспецифической флоры проводится посев культуры на кровяной агар, согласно рекомендациям Becton Dickinson, USA. Отсутствие роста на кровяном агаре свидетельствует об отсутствии контаминации выросшей культуры неспецифической микрофлорой.

Для оценки бактерицидной активности были отобраны пробирки, содержащие тестируемое соединение в концентрациях, при которых не наблюдался рост чувствительного лабораторного штамма *M.tuberculosis H37Rv* на протяжении всего эксперимента по определению бактериостатической активности.

3.4 Изучение способности соединения (+)-**261** вызывать гибель клеток *M. smegmatis* в комбинации с противотуберкулезными препаратами.

Для исследования взаимодействия соединения (+)-**261** с противотуберкулезными антибиотиками в тест-системе *Mycobacterium smegmatis* mc²155 использовался метод бумажных дисков. Методика заключалась в определении величины зоны подавления роста штамма, засеянного газонем на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих антибиотик или антибиотик совместно с (+)-**261**. Бактерии, выращенные на чашках Петри в течение ночи на агаризованной среде триптон-соевый агар (№36 (Himedia)), смывали дистиллированной водой. Бактериальную суспензию смешивали с расплавленной агаризованной средой №36, в соотношении 1:1 и заливали полученной смесью чашки Петри с агаризованной средой №36. На поверхность агара накладывали стандартные бумажные диски (Bioanalyse-R), содержащие антибиотики и (+)-**261**. Культуру инкубировали в течение 20-22 часов при +37°C.

3.5 Активность соединений как потенциальных ингибиторов бактериальных серин-треониновых протеинкиназ в тест-системе *S. lividans* APHVIII+.

Ингибирующая активность соединений была исследована методом дисков. Методика заключалась в определении величины зоны подавления роста штамма, засеянного газонем на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих антибиотик или антибиотик в

сочетании с ингибиторами серин-треониновых протеинкиназ. Бумажные диски (d=7мм.), пропитанные канамицином (4 мкг/диск) и веществами в субингибирующих концентрациях были наложены на агаризованную среду МГ следующего состава: 0,5% мальтэкстракта (Sigma), 0,4% дрожжевого экстракта (Difco), 0,05% NaCl, 0,05% MgSO₄, 0,05% K₂HPO₄, 0,0001% FeSO₄, 0,1% KNO₃, 2% глюкозы, pH 7,5, содержащую споровую суспензию штамма *S. lividans* APHVIII+. Чашки инкубировались 20 часов при 28°C. Оценивали изменение диаметра зоны подавления роста культуры под действием канамицина в сочетании с тестируемым веществом и действием канамицина. В качестве контроля использовали стандартный ингибитор протеинкиназ бисиндолилмалеимид-1 (Bis-1 (Sigma)).

3.6 Изучение токсичности препаратов.

Токсичность продуктов была предварительно изучена в отношении клеток MDCK. Клетки MDCK сеяли в 96-луночные планшеты и культивировали при 37°C в среде MEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота в атмосфере 5% CO₂ (в газопотоочном инкубаторе Sanyo-175) до состояния монослоя. Из исследуемых препаратов готовили маточный раствор концентрации 10 мг/мл в диметилсульфоксиде, после чего готовили серию двукратных разведений препаратов в среде MEM от 1000 до 3.75 мкг/мл. Растворенные препараты вносили в лунки планшетов и инкубировали 2 суток при 37°C. По истечении этого срока клетки промывали 2 раза по 5 минут фосфатно-солевым буфером, и количество живых клеток оценивали при помощи микротетразолиевого теста (МТТ). С этой целью в лунки планшетов добавляли по 100 мкл раствора (5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазолил-2) 2,5-дифенилтетразолия бромид (ICN Biochemicals Inc., Aurora, Ohio) на физиологическом растворе. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 часов и промывали 5 минут фосфатно-солевым буфером. Осадок растворяли в 100 мкл на лунку ДМСО, после чего оптическую плотность в лунках планшетов измеряли на многофункциональном ридере Victor 1420 (Perkin Elmer, Finland) при длине волны 535 нм. По результатам теста для каждого продукта определяли 50% цитотоксическую дозу (CTD₅₀), т.е. концентрацию препарата, вызывающую гибель 50% клеток в культуре.

4. Определение противовирусной активности соединений.

4.1 Исследование противовирусной активности соединений *in vitro*

Вирусы гриппа культивировали в 10-11 дневных куриных эмбрионах, вводя в аллантоисную полость 1-10 ЭИД₅₀/0,2 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) и инкубировали 48 часов при +37°C.

Определение противовирусной активности препаратов проводили на клетках MDCK в 96-луночных планшетах для клеточных культур. Соединения растворяли в поддерживающей среде для клеток, вносили в лунки панелей с клеточным монослоем и инкубировали в течение 1 часа при 36°C в атмосфере 5% CO₂.

Из вирусосодержащей жидкости (штамм A/California/07/09 (H1N1)v) готовили серию десятикратных разведений от 10⁻¹ до 10⁻⁷, добавляли в лунки с препаратами и инкубировали при 36°C в течение 48 часов в атмосфере 5% CO₂. По окончании срока инкубации аликвоту культуральной жидкости смешивали с равным объемом 1% куриных эритроцитов в отдельных планшетах с круглым дном. Учет результатов проводили через 60 минут инкубации при 20°C. За титр вируса в контроле и опыте принимали величину, обратную десятичному логарифму наибольшего разведения исходного вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации в лунке и выражали в количестве 50% инфекционных доз (ID₅₀). Вирусингибирующее действие исследуемых соединений оценивали по снижению титра вируса в опыте по сравнению с контролем. На основании полученных данных рассчитывали 50 % ингибирующую дозу ED₅₀, т.е. концентрацию препарата, снижающую уровень вирусной репликации вдвое (на 0,3 lg ID₅₀), и индекс селективности, или химиотерапевтический индекс (SI), представляющий собой отношение CTD₅₀ к ED₅₀.

4.2 Исследование противовирусной активности препаратов *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей.

Опыты проводили на белых беспородных мышах, полученных из питомника (Рапполово, Россия). Использовали адаптированный к белым мышам вирус A/Aichi/2/68 (H3N2). Пассирование вируса осуществляли по следующей методике: лиофильно высушенный вирус разводили в 2 мл физиологического раствора и вводили интраназально под эфирным наркозом в объеме 50 мкл/мышь. Спустя 3-ое суток зараженных мышей вскрывали, и из пораженных участков легких приготавливали гомогенат. Для титрования гомогената мышей (5 шт. в группе) заражали интраназально под эфирным наркозом серийными десятикратными разведениями полученного гомогената от 10⁻¹ по 10⁻⁴ в объеме 50 мкл/мышь. Смертность животных учитывалась спустя 2 недели после заражения. На основании полученных результатов рассчитывали 50% летальную дозу вируса LD₅₀ (Reed,

Muench, 1938). Мышей заражали дозами LD50 и 10 LD50 в объеме 50 мкл/мышь. Препараты вводили внутривенно. Вначале исследовали серию двукратных разведений для определения 50% летальной дозы препарата. Далее препараты вводили в дозе 1/5 LD50 за 1 час до заражения и через 1, 2 и 3 суток после заражения (лечебно-профилактическая схема).

Противовирусную активность препаратов учитывали по снижению смертности мышей в опытных образцах (вирус + препарат) по сравнению с контролем (вирус), а также по разнице в снижении веса у животных между контролем и опытом. Дополнительно изучали снижение титра вируса и гистологические изменения в легких под воздействием препаратов. В экспериментах по изучению снижения смертности в каждой группе было по 10 мышей, в экспериментах по изучению гистологических изменений и титра вируса в легких в каждой группе было по 3 мыши.

5. Исследование гипополидемии активности усниновых кислот и их производных

5.1 Культивирование клеток

Клетки линии HepG2 культивировали при 37°C в атмосфере воздуха (5% CO₂) в 25-миллилитровых флаконах в среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS, 0.03% глутамина и канамицина в концентрации 100 мкг/мл. За 24 ч до эксперимента клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, высевали в лунки 24-луночного планшета и культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% LPDS (lipoprotein-deficient serum, Sigma) и 0.03% глутамина до 80% плотности монослоя. Затем культуральную среду заменяли на DMEM/F12 без сыворотки с добавлением соединений **1–4** в концентрации 10, 20 или 30 мкг/мл. В контрольном образце среду заменяли на DMEM/F12 без сыворотки. Клетки инкубировали с препаратом 12 ч, после чего культуральную среду удаляли, а клетки лизировали реагентом Trizol (фирма “Invitrogen”) для последующего выделения мРНК.

5.2 Определение количества мРНК гена ЛПНП методом ОТ/ПЦР в режиме реального времени

Выделение суммарной клеточной РНК проводили согласно рекомендации производителя. кДНК синтезировали по реакции обратной транскрипции (ОТ) при 42°C в течение 45 мин в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 mM Tris_HCl (pH 8.5), 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 mM KCl, 0.2 mM dNTP, Stat_9 праймер (10 нг/мкл), 200U РНК полимеразы (MoMLV) и 200 нг – 1 мкг суммарной РНК. Методом ПЦР в режиме реального

времени в каждом из полученных образцов кДНК определяли относительное количество кДНК гена ЛПНП. Для амплификации использовали праймеры F:

5'-ACTGCAAGGACAAATCTGACGA-5'

и R: 5'-CCTCGCAGAGTGTCACATTAAC-5'.

Амплификацию образцов кДНК проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 mM Tris-HCl (pH 8.9), 2.5 mM MgCl₂, 55 mM KCl, 0.2 mM dNTP, 0.5 U Taq полимеразы и SybrGreen I (в разведении 1 : 25000, "Invitrogen"), а также соответствующую пару F- и R-праймеров (каждый 300 нМ) и образец кДНК. Нормировку полученных значений осуществляли относительно нормировочного коэффициента, рассчитанного как среднее геометрическое количества мРНК генов POLR2A, GAPDH, RPL32 и ACTB.

6. Исследование инсектицидной активности усниновых кислот и их производных

6.1 Культивирование грибов

В работе использован изолят энтомопатогенного гриба *B. bassiana* (Sar-31), из коллекции института Систематики и экологии животных СО РАН. Штамм выделен из кубышек итальянского пруса (Orthoptera) в Новосибирской области в 2001 г. Конидиальную массу гриба нарабатывали на дважды автоклавированном пшене, с последующей сушкой и перемалыванием. Титр конидий определяли методом серийных разведений и посевом на агаризованную среду Чапека.

6.2 Лабораторные биотесты

В работе использованы личинки колорадского жука собранные на полях Юго-Восточного Казахстана (Алматинская область). Биотестирование производных УК проводилось на личинках 2-3 возрастов колорадского жука. Для приготовления тестируемых образцов навески соединений растворяли в 1 мл ацетона, затем добавляли в 19 мл воды и резко встряхивали. В контрольных вариантах (обработка водой) добавляли соответствующее количество ацетона. Тестируемых личинок и листья картофеля погружали в суспензии на 5-10 секунд и затем просушивали в течение 15 минут при 27-30°C. Личинок содержали в пластиковых контейнерах объемом 700 мл, накрытых сверху сеткой. Смену корма проводили на второй день после обработки и далее каждые сутки. С целью предотвращения высыхания листьев, их черешки помещали в пробирки Эппендорф (1.5 мл), тампонируемые влажной

ватой. Каждый вариант опыта ставился в 3-4 повторностях по 10-15 личинок на 1 повторность.

Для изучения репеллентных и антифидантных свойств производных УК листья картофеля обрабатывали их раствором (0,03%) либо водой с ацетоном. Листья, обработанные и не обработанные соединениями, располагали с двух сторон чашек Петри. Личинок помещали в центр чашки и ставили в термостат для исключения влияния фототаксиса. Через сутки подсчитывали количество личинок, питающихся на обработанных и необработанных листьях, а также процент прогрызов на листьях картофеля. Процент прогрызов устанавливали визуально по 10-бальной шкале. Эксперименты ставились в 5 повторностях по 6 личинок на каждую.

Совместное действие производных УК и *B. bassiana* оценивалось на личинках 2, 3 и 4 возрастов. Приготовление рабочих смесей, обработка листьев и насекомых, их содержание осуществлялось так же как указывалось выше. Смертность и массу насекомых учитывали каждые вторые сутки на протяжении 12 суток.

6.3 Полевые садковые биотесты

Полевой эксперимент проведен на картофельном поле в окр. г. Алматы. Растения и насекомых обрабатывали рабочими растворами с помощью ручного пульверизатора до появления стекающих капель (20 мл на одно растение высотой 30-35 см). Титр *B. bassiana* в рабочем растворе составлял 3×10^7 конидий/мл, а концентрация производных УК – 0,03%. Личинок по 15 экз. содержали в садках из сетки, надетых на побеги картофеля. Учет смертности проводили каждые вторые сутки на протяжении 15 дней.

6.4 Статистический анализ

Для сравнения динамики смертности был использован критерий Каплана-Мейера (Log-Rank test). Для расчетов ЛД₅₀ использовался пробит анализ. При оценке выбора личинками листьев обработанных и не обработанных соединениями использован критерий χ^2 , а для оценки разницы в их поврежденности – t-test. Результаты по изменению массы личинок представлены в виде средних арифметических и их ошибок (SE). Расчеты выполнены с помощью программ SigmaStat 3.1, Microsoft Excel 2003, Statistica 6.

Биотестирование проводили на личинках 3-го возраста колорадского жука. Для приготовления тестируемых образцов 10 мг соединения растворяли в 1 мл ацетона, затем добавляли в 19 мл суспензии конидий гриба или воды и резко встряхивали. В контрольные

варианты (обработка водой, суспензиями конидий) добавляли соответствующее количество ацетона. Тестируемых личинок и листья картофеля погружали в суспензии на 10 сек и затем просушивали в течение 15 мин при 27–30°C. Личинок содержали в пластиковых контейнерах объемом 700 мл, накрытых сверху сеткой. Смену корма проводили на 2-е сут после обработки и далее каждые сутки. С целью предотвращения высыхания листьев, их черешки помещали в пробирки Эппендорф (1.5 мл), тампонированные влажной ватой. В полевом эксперименте растения и насекомых обрабатывали ручным пульверизатором до появления стекающих капель. Для точного учета смертности личинок по 15 экз. содержали в садках из сетки, надетых на побеги картофеля. Первичный скрининг соединений проводили, используя следующие варианты эксперимента: *B. bassiana*, *B. bassiana* + производные УК, контроль (обработка водой с ацетоном). Титр гриба составлял 1×10^7 конидий/мл, концентрация соединений –

0.05%. В каждом варианте было 3 повторности по 10 личинок в каждой. Показавшее высокую эффективность соединение тестировали по схеме “*B. bassiana*, тестируемое вещество, *B. bassiana* + тестируемое вещество, контроль”, при этом титры конидий и концентрацию тестируемого вещества изменяли в зависимости от уровня смертности в предыдущих экспериментах и условий опыта (лабораторный или полевой). Повторность опыта – четырехкратная, по 10–15 личинок в каждой. При изучении репеллентных и антифидантных свойств тестируемых веществ листья картофеля обрабатывали их раствором (0.03%) либо водой с ацетоном. Листья, обработанные и не обработанные тестируемыми веществами, располагали с 2-х сторон чашек Петри. Личинок помещали в центр чашки и ставили в термостат для исключения влияния фототаксиса. Через 1 сут подсчитывали количество личинок, питающихся на обработанных и необработанных МУК листьях, а также площадь прогрызов на листьях картофеля. Соотношение прогрызов и общей площади листовой поверхности устанавливали с помощью миллиметровой палетки и выражали в процентах. Повторность опытов четырехкратная, по 10 личинок в каждой.