



УДК 547-314:547-305.1:615.277.3

СИНТЕЗ И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ТИОФЕНОЛА К СЕСКВИТЕРПЕНОВЫМ ЛАКТОНАМ

© 2021 г. А. В. Семаков*, #, Л. В. Аникина*, С. Г. Клочков*

* ФГБУН “Институт физиологически активных веществ” РАН, Россия, 142432 Черноголовка, Северный проезд, 1

Поступила в редакцию 04.08.2020 г.

После доработки 18.09.2020 г.

Принята к публикации 21.09.2020 г.

Получены производные сесквитерпеновых лактонов, модифицированные по лактонному циклу остатком тиофенола. Полученные конъюгаты с тиофенолом способны к реакции окисления-элиминирования при действии АФК опухолевой клетки с высвобождением исходных цитотоксичных лактонов. Предлагается использовать полученные серосодержащие конъюгаты в качестве АФК-активируемых пролекарств сесквитерпеновых лактонов. Антипролиферативные свойства полученных конъюгатов были изучены на опухолевых и псевдонормальной клеточных линиях. Цитотоксичность конъюгатов меньше, чем у исходных лактонов, однако иногда, как в случае конъюгатов алантолактона и артемизитена, остается умеренной на всех протестированных опухолевых линиях.

Ключевые слова: тиофенол, пролекарства, активные формы кислорода, сесквитерпеновые лактоны, цитотоксичность *in vitro*, МТТ-тест

DOI: 10.31857/S0132342321040187

ВВЕДЕНИЕ

Сесквитерпеновые лактоны (СЛ) – обширный класс веществ преимущественно растительного происхождения. Для его представителей часто характерна выраженная цитотоксическая активность по отношению к опухолевым клеткам [1, 2]. Цитотоксической активностью обладают в основном те лактоны, которые несут сопряженную двойную связь при лактонном цикле и способны вступать в реакцию присоединения по Михаэлю с нуклеофилами. В живой клетке в избытке встречаются молекулы с аминными и тиольными нуклеофильными группами, которые служат мишенями для атаки СЛ с образованием новой ковалентной связи. Однако активирующее влияние на двойную связь карбоксильной группы лактонного цикла невелико, в результате чего СЛ обладают умеренной способностью к присоединению в реакции Михаэля. Это позволяет СЛ химически связываться только в сайтах белков с большим сродством к конкретной молекуле СЛ. Часто такими сайтами выступают активные центры ферментов с гидрофобными карманами с тиольными группами цистеинов. Разные СЛ ингибируют разный набор ферментов. Способность к ингибированию ферментов делает СЛ перспективными

агентами для противоопухолевой терапии. Среди мишеней СЛ как наиболее значимые следует выделить транскрипционный фактор NF-κB [3], фарнезилтрансферазу и ферменты основного метаболизма, в том числе гликолиза [4]. В то же время СЛ свойственны некоторые недостатки, ограничивающие их применение в качестве противоопухолевых агентов: 1) СЛ также действуют на другие ткани, что приводит к токсическим эффектам в терапевтических дозах; 2) ферменты печени со временем восстанавливают ненасыщенную связь при лактонном цикле СЛ, что ведет к утрате активности; 3) СЛ часто – гидрофобные вещества со слабой биодоступностью. В качестве возможного решения для устранения этих недостатков нами предложено использовать СЛ в виде их конъюгатов с тиофенолами.

Из химии карбониллов, в частности лактонов, известна реакция окисления–элиминирования карбониллов с заместителями в виде тиофенольной группы в α- [5, 6] или β-положении [7] с образованием енонов при действии разных окислителей, в том числе перекиси водорода. СЛ охотно реагируют с тиофенолом в реакции присоединения Михаэля. Образующиеся сульфиды также способны при действии перекиси водорода вступать в реакции окисления–элиминирования, при этом продукт реакции – исходный лактон с экзотетиленовой группой при лактонном цикле.

С другой стороны, в клетке в процессе метаболизма образуются активные формы кислорода (АФК), главные из которых – супероксид анион и перекись водорода. Причем установлено, что в опухолевых клетках содержание АФК выше, чем

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПЭ – петролейный эфир; СЛ – сесквитерпеновые лактоны; ХФ – хлороформ; ЭА – этилацетат; ДСС – дициклогексилкарбодимид; IC₅₀ – значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток.

Автор для связи: (тел.: +7 (919) 96-49-347; эл. почта: L_vok@list.ru).

в клетках соответствующей им нормальной ткани. Это связано как с большей скоростью образования АФК из-за несбалансированной работы электрон-транспортной цепи митохондрий, так и с меньшей способностью опухолевых клеток к детоксикации АФК за счет пониженной активности ферментов антиоксидантной защиты клетки [8]. Поскольку неважно, происходит реакция окисления—элиминирования конъюгатов СЛ с тиофенолом под действием внутриклеточной перекиси водорода или в процессе химического синтеза, данную особенность опухолевых клеток можно использовать для создания из СЛ пролекарств-конъюгатов с большей избирательностью цитотоксического действия. Более того, данный подход позволяет использовать замещенные тиофенолы, что дает возможность создавать из СЛ конъюгаты-пролекарства с требуемой полярностью. Ранее сообщалось о получении АФК-активируемых пролекарств лактона гроссгемина (I) путем синтеза его конъюгатов с тиофенолами [9]. Мы предлагаем использовать этот подход для получения АФК-активируемых пролекарств на основе и других СЛ. Из литературных источников также известно о синтезе как промежуточных веществ конъюгатов алантолактона (II) [10] и изоалантолактона (III) [11] с тиофенолом, однако об их цитотоксических свойствах ничего не сообщалось. И наконец, из литературных данных также известно о синтезе конъюгата СЛ артемизитена (IV) с тиофенолом [12] в рамках поиска новых антималярийных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве субстратов для получения конъюгатов СЛ с тиофенолом мы использовали СЛ (I–XV), выделенные нами из растительных источников, а также СЛ, полученные из природных СЛ с помощью химической модификации. В настоящий

момент описано большое число СЛ [13, 14], однако подавляющее их количество содержится в растениях в исчезающее малых концентрациях либо само растительное сырье малодоступно. Поэтому мы опирались на те растительные источники с высоким содержанием СЛ в сухом сырье, которые либо доступны коммерчески (корни девясила высокого *Inula helenium* L., экстракт корней горькуши лопуховидной *Saussurea lappa* (Desne.), полученный путем свежкритической CO_2 -экстракции), либо были выращены собственными силами (соцветия пижмы девичьей *Tanacetum parthenium* L., листья василька крупноголовчатого *Centaurea mac-rocephala* (Muss.-Puschk. ex Willd.)). Другие использованные лактоны получены из стартовых лактонов полусинтетически (схемы 1–4).

Лактоны корней девясила высокого, алантолактон (II) и изоалантолактон (III), обладают схожими свойствами, что затрудняет их разделение. Эти два лактона хотя и могут быть выделены одновременно путем разделения их смеси через хроматографирование на колонке с силикагелем, импрегнированным нитратом серебра [15, 16], но практичнее получать каждый из них из очищенного экстракта [17] по отдельности. Так, алантолактон (II) был получен из смеси аланто- и изоалантолактона путем селективного окисления изоалантолактона при действии диоксида селена в другой СЛ – изотелекин (V). Последний легко отделяется хроматографически. Также при окислении смеси соединений (II) и (III) диоксидом селена в меньших количествах получают СЛ телекин (VI) и лактон-диол (VII). Изоалантолактон (III) частично отделяется из смеси лактонов девясила четырехкратной перекристаллизацией из горячего 75%-ного водного метанола. Более подробно способы препаративного разделения лактонов девясила описаны в недавней статье [17].

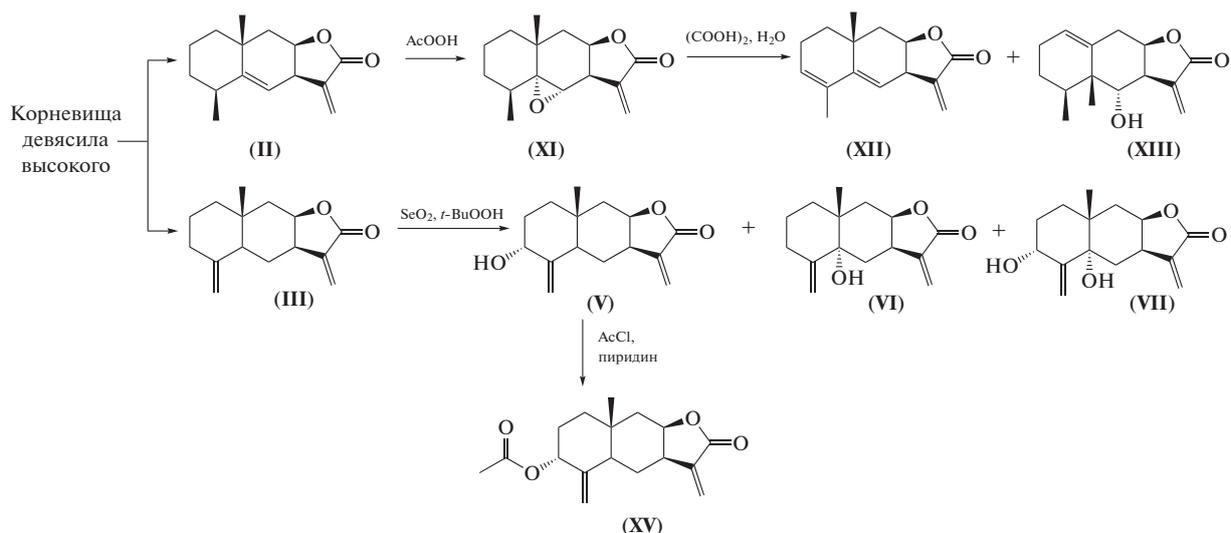


Схема 1. Синтез сесквитерпеновых лактонов из лактонов девясила (*Inula helenium* L.).

Основные лактоны корней горькуши лопуховидной — костунолид и дегидрокостус-лактон (VIII). В качестве источника для выделения лактонов костунолида (XVI) и лактона (VIII) использовали экстракт корней костуса, полученный путем сверхкритической CO₂-экстракции (Guangzhou Endless Biotech Co., Китай). Использованный сверхкритический CO₂-экстракт примерно на 25% состоял из смеси СЛ и на 75% — из триглицеридов. Для удаления последних из экстракта несколько

раз извлекали СЛ горячим водным ацетонитрилом и очищали фильтрованием через силикагель. Дегидрокостус-лактон (VIII) и костунолид (XVI) разделяли на колонке с импрегнированным нитратом серебра. В меньших количествах из экстракта были выделены минорные лактоны горькуши лопуховидной — сантамарин (IX) и рейнозин (XVII), которые также отделяли друг от друга на колонке с импрегнированным нитратом серебра (схема 2).

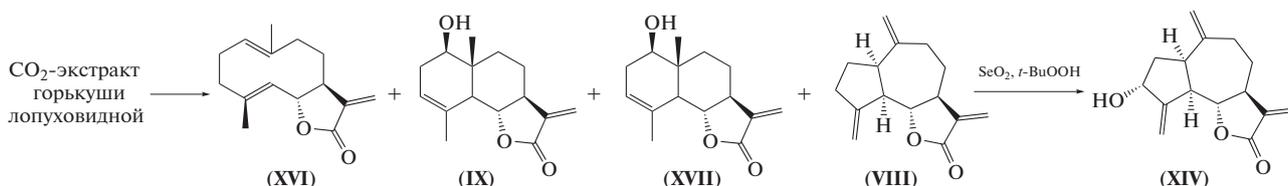


Схема 2. Сесквитерпеновые лактоны горькуши лопуховидной (костуса, *Saussurea lappa* (Decne.)).

Прочие использованные природные СЛ были выделены из сухого растительного сырья. Для этого на основе известных методик нами был найден оптимальный способ получения лактонной фракции. Он состоит в следующем: высушенные измельченные части растения экстрагировали хлороформом, упаривали, растворяли в горячем метаноле и небольшими порциями при взбалтывании добавляли насыщенный раствор ацетата свинца (20% по объему), оставляли остывать в течение ночи. Жидкую часть декантировали с осадка пигментов, кислот и полифенольных соединений, промывали петролейным эфиром от

высоколипофильных примесей, отгоняли метанол из водно-метанольной части при пониженном давлении, разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Из обогащенной лактонной фракции индивидуальные лактоны выделяли препаративной колоночной хроматографией. Таким способом из соцветий пижмы девичьей был выделен гермакрановый СЛ партенолид (X) с выходом 0.78%, из листьев василька крупноголовчатого — гваянолиды гроссгемин (I) с выходом 0.63% и цинаропикрин (XVIII) с выходом 1.18% (схема 3).

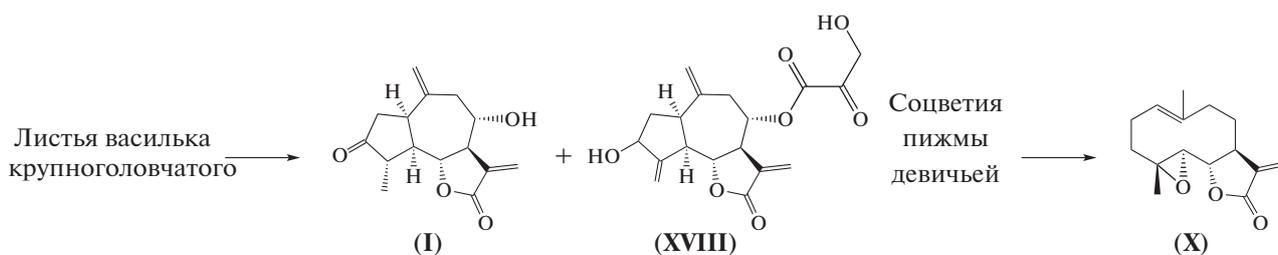


Схема 3. Выделенные из растений сесквитерпеновые лактоны гроссгемин (I), цинаропикрин (XVIII) и партенолид (X).

Артемизинин (XIX) — коммерчески доступный СЛ. Однако он не имеет экзометиленовой группы при лактонном цикле и не способен вступать в реакции присоединения по Михаэлю. СЛ артемизитен (IV) (также известный как артемизининен) с экзометиленовой группой при лактонном цикле синтезирован из дигидроартемизинина (XX), полученного из коммерческих источников,

а также при восстановлении артемизинина (XIX) боргидридом натрия [18]. За основу взята известная методика синтеза артемизитена (IV) [19]. Она заключается в дегидрировании дигидроартемизинина (XX) с образованием ангидродигидроартемизинина (XXI), который при действии синглетного кислорода дает гидропероксид (XXII). Последний при действии уксусного ангидрида в

пиридине образует лактон (IV). В оригинале синтез промежуточного продукта (XXI) из дигидроартемизинина (XX) предполагает использование в качестве дегидрирующего агента DCC и сопровождается количественным выходом. Однако воспроизведение синтеза соединения (XXI) по методике El-Feraly et al. [19] дало требуемый продукт лишь с выходом 63.7% от теоретического. Дициклогексилмочевина и побочный продукт реакции затрудняют дальнейшую обработку реакци-

онной смеси. Практичнее на этом этапе оказалось заменить DCC в качестве дегидрирующего агента на трехфтористый бор [20], что повышает выход до количественного и упрощает очистку продукта. На следующей стадии реакцию с синглетным кислородом проводили с присутствием в реакционной среде фотосенсибилизатора бенгальского розового. Выход на этой стадии невелик даже при большом времени облучения, что делает ее узким местом в схеме получения артемизитена (IV) (схема 4).

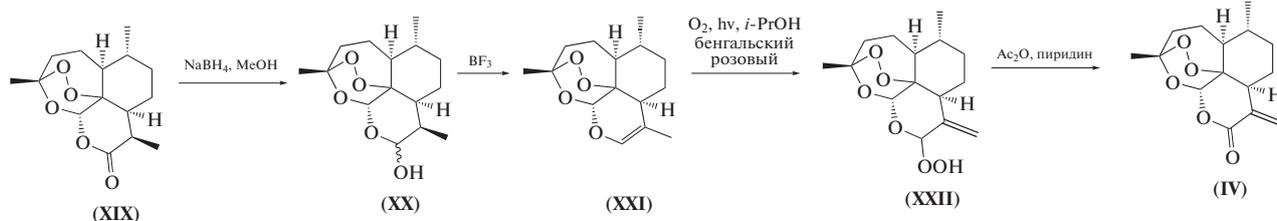


Схема 4. Синтез артемизитена (IV).

Часть использованных лактонов была получена полусинтетически из природных лактонов, выделенных из растительных источников. Так, эпоксиалантолактон (XI) получен эпоксицированием алантолактона (II) при действии надуксусной кислоты по известной методике [21] с количественным выходом. Далее синтезом из эпоксиалантолактона (XI) при действии щавелевой кислоты в водной среде были получены алантодиен (XII) и эремофилановый лактон (XIII) [21]. Изозаллузарин-С (XIV) получен как основной продукт аллильного окисления дегидрокостулактона (VIII) при реакции с диоксидом селена. Ацилированный по спиртовой группе изотелекин (XV) получен обычным способом реакцией лактона (V) с ацилхлоридом в пиридине (схема 1).

Как известно, СЛ охотно вступают в реакции присоединения по Михаэлю тиолов по лактонному циклу [22, 23], в том числе с тиофенолом [9]. Реакция присоединения по Михаэлю с тиофенолом не идет в чистом метаноле в отсутствие катализа даже при длительной инкубации, но быстро проходит при добавлении основания триэтиламина, что согласуется с литературными данными [9, 24]. Используя эту реакцию, из полученных нами ранее СЛ (I–XV) были получены конъюгаты с тиофенолом (Ia–XVa) (схема 5). Выходы продуктов реакций приведены в табл. 1. Получение конъюгатов лактонов девясила (II) и (III) с тиофенолом и селенофенолом было описано нами в недавнем сообщении [25]. Стандартный способ выделения (метод А) продукта реакции заключа-

ется в упаривании реакционной смеси, промывании в воронке остатка раствором карбоната от следов тиофенола и кристаллизации на холоде из минимального количества метанола. Конъюгаты лактонов, которые выпадают в осадок из метанола, могут быть очищены простой отгонкой растворителя и дополнительной промывкой метанолом (способ Б). В случае, если в реакционной смеси кроме основного продукта по данным ТСХ обнаруживались примеси, продукты выделяли колоночной хроматографией (методы В и Г). В случае, если продукт кристаллизовался из реакционной смеси, но лишь частично, маточный раствор также упаривали и проводили обработку реакционной смеси стандартным методом (метод Д). При длительном времени реакции алантолактона (II) с тиофенолом продукт (IIa) выделялся как неделимая смесь изомеров по положению С-11. При проведении реакции в течение нескольких минут с незамедлительной последующей обработкой реакционной смеси продукт реакции представляет собой только один чистый изомер. Для всех прочих лактонов аддукты выделялись в виде единственного изомера независимо от времени реакции. В целом, реакция присоединения тиофенола к СЛ полностью проходит за несколько минут и нет необходимости проводить ее в течение нескольких дней, однако длительное время реакции иногда позволяет кристаллизоваться продуктам напрямую из реакционной смеси, что позволяет проводить очистку продуктов реакции простым фильтрованием.

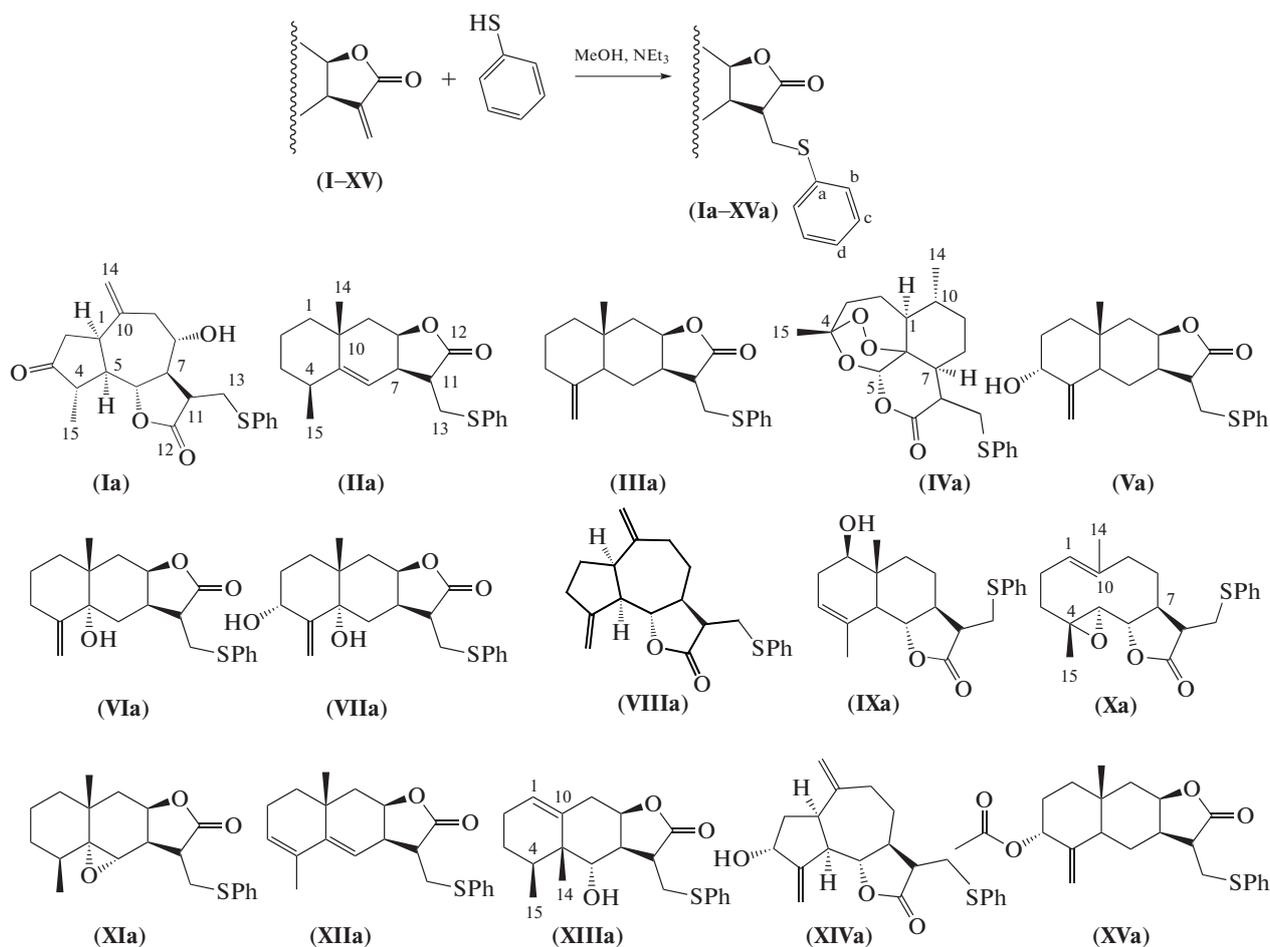


Схема 5. Конъюгаты сесквитерпеновых лактонов с тиофенолом (Ia–XVa).

СЛ проявляют свое цитотоксическое действие благодаря наличию электрон-дефицитной двойной связи при лактонном цикле. Конъюгаты СЛ с тиофенолом лишены этой группы, однако они выступают в виде пролекарств соответствующих им исходных лактонов. При действии внутриклеточных АФК происходит окисление сульфидной группы аддуктов тиофенола (Ia–XVa) до сульфоксида или сульфона, что ведет к последующему постепенному элиминированию с образованием исходного активного СЛ и сульфеновой или сульфоновой кислоты. Таким образом, для проявления цитотоксического действия тиофенольных аддуктов СЛ решающее значение имеет концентрация АФК внутри клетки, которая может различаться в разных опухолевых линиях.

Цитотоксическая активность полученных нами конъюгатов СЛ с тиофенолом была протестирована на четырех опухолевых (RD, НСТ116, HeLa, A549) и одной псевдонормальной (НЕК293) клеточных линиях (табл. 2). Вполне ожидаемо, что цитотоксичность серосодержащих конъюгатов-пролекарств (Ia–XVa) меньше, чем у чистых СЛ (I–XV) практически во всех случаях. Однако па-

дение цитотоксичности (IC_{50}) неодинаково как для разных лактонов, так и для разных клеточных линий. Для части конъюгатов, таких как конъюгаты сантамарина (IXa), телекина (VIa), изозаллузарина-С (XIVa) и гроссгемина (Ia), цитотоксическая активность невелика ($IC_{50} > 100$ мкМ) на всех протестированных опухолевых линиях. Частично это связано с меньшей цитотоксичностью самих лактонов. С другой стороны, из литературных данных [9] известно, что один из полученных нами конъюгатов – аддукт гроссгемина с тиофенолом (Ia) – обладает умеренной цитотоксичностью ($IC_{50} = 11.2$ мкМ) на опухолевой линии KB, что может быть следствием повышенной чувствительности этой клеточной линии к действию лактона (I). Другие полученные нами пролекарства-конъюгаты сохраняют умеренную цитотоксичность ($IC_{50} = 5.8–38.4$ мкМ) на всех протестированных линиях. Среди них стоит отметить как наиболее активные конъюгаты алантолактона (IIa) и артемизитена (IVa). В первом случае удовлетворительная цитотоксическая активность конъюгата-пролекарства (IIa) достигается за счет высокой активности исходного лактона (II). Во

Таблица 1. Выходы продуктов реакции присоединения тиофенола и лактонов

Исходный лактон	Метод	Выход, %	Время реакции
(I)	Д	100	3 сут
(II)	А	89.0*	3 сут
	Б	100	10 мин
(III)	А	100	3 сут
(IV)	Г	60.3	3 сут
(V)	А	38.5	3 сут
	Б	81.5	3 сут
(VI)	Д	67.1	3 сут
(VII)	В	56.6	1 ч
(VIII)	А	100	3 сут
	Б	92.0	14 сут
(IX)	В	38.5	3 сут
(X)	Г	76.4	1 сут
(XI)	Б	93.4	3 сут
(XII)	А	98.6	3 сут
(XIII)	А	92.2	7 сут
(XIV)	В	91.4	18 ч
(XV)	А	81.6	3 сут

* Продукт реакции в виде смеси изомеров.

втором случае активность конъюгата (IVa) практически не отличается от активности исходного лактона (IV), что означает быстрый распад конъюгата (IVa) при попадании в клетку. Эти два вещества – конъюгаты алантолактона (IIa) и артемизитена (IVa) – подходят для дальнейшей оптимизации структуры путем введения заместителей в тиофенольную часть.

Недостаток данного рода конъюгатов – высокая гидрофобность, еще большая, чем у исходных СЛ. Однако она может быть устранена в перспективе при использовании для синтеза пролекарств замещенных тиофенолов. В данной работе была проверена и подтверждена жизнеспособность самого подхода к синтезу АФК-активируемых серосодержащих пролекарств из СЛ с различными углеродными скелетами и цитотоксической активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) были получены в CDCl_3 (где не указано особо) на приборе Spectrospin (200 МГц для ^1H и 50 МГц для ^{13}C) (Bruker, США) с использованием остаточного сигнала растворителя CHCl_3 ($\delta = 7.27$) в качестве внутреннего стандарта, в расшивке спектра символы “a” и “b” обозначают

неэквивалентные протоны при одном атоме углерода. Отнесения сигналов ЯМР осуществляли сравнением с данными 1D- и 2D-спектров ЯМР лактонов, полученных нами ранее, и со спектрами ЯМР лактонов из литературных источников. Нумерация атомов в спектрах – как на схеме 5. Корни девясилы – производства ПКФ “Фитофарм” (Анапа, Россия).

ТСХ выполняли на пластинках Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Для обнаружения веществ на пластинки выливали раствор 4%-ной фосфорномолибденовой кислоты в этаноле, после чего пластинки сразу нагревали феном с температурой 250°C до проявления темных пятен. Также для обнаружения пятен ТСХ использовали опрыскивание раствором анисальдегида (75 мл этанола, 1 мл уксусной кислоты, 2.5 мл серной кислоты, 2 мл анисальдегида) и нагревали феном (250°C) до проявления разноцветных пятен.

Выделение лактонов гроссгемина (I) и цинаропикрина (XVIII) из листьев василька крупноголовчатого. Василек крупноголовчатый (гроссгемия крупноголовчатая, *Centaurea macrocephala* (Muss.-Puschk. ex Willd.)) был посеян и выращен на территории д. Останкино, Борский р-н, Нижегородская область. Сбор и сушку листьев производили в течение лета 2017 г., начиная с начала периода цветения. Высушенные листья (442.5 г) измельчали вручную и экстрагировали 2 × 5 л хлороформа в течение нескольких суток. Хлороформные вытяжки упаривали при пониженном давлении и получали экстракт массой 24.0 г. Экстракт растворяли в 200 мл метанола и на водяной бане (70°C) постепенно, при покачивании колбы, добавляли 50 мл насыщенного раствора ацетата свинца и давали медленно остывать до комнатной температуры. Спустя ночь декантировали с осадка, промывали в воронке 3 × 50 мл петролейным эфиром, водно-метанольную часть упаривали при пониженном давлении до удаления легколетучего метанола, остаток разбавляли 150 мл воды и 2 × 150 мл этилацетата, органические слои упаривали и вакуумировали, получили 9.31 г вещества в виде пены. Экстракт хроматографировали на колонке с силикагелем в системе ХФ/ЭА 9 : 1, затем ХФ/ацетон 9 : 1, ХФ/ацетон 4 : 1, ХФ/ацетон 7 : 3, ХФ/MeOH 9 : 1, смешанные фракции рехроматографировали. Состав фракций контролировали в системе ХФ/ацетон 2 : 1. Получили в сумме 2.768 г гроссгемина (I) в виде крупных, почти кубических кристаллов и 5.243 г цинаропикрина (XVIII) в виде аморфной твердой пены. ЯМР-спектры лактонов гроссгемина (I) [9, 26] и цинаропикрина (XVIII) [26] аналогичны описанным ранее.

Получение алантолактона (II) и продуктов аллильного окисления изоалантолактона. В колбе растворяли в 350 мл CH_2Cl_2 при перемешивании

Таблица 2. Цитотоксическая активность лактонов и их конъюгатов

Соединение	IC ₅₀ , мкМ				
	RD	HCT116	HeLa	A549	HEK293
(I)	38.35 ± 3.31	17.80 ± 2.16	31.07 ± 1.79	44.06 ± 0.68	46.86 ± 5.10
(Ia)	256.66 ± 9.71	160.43 ± 25.94	458.79 ± 42.86	557.26 ± 38.62	—*
(II)	6.23 ± 0.11	5.73 ± 0.08	5.38 ± 0.04	2.71 ± 0.07	15.44 ± 1.27
(IIa)	18.42 ± 0.94	31.68 ± 2.45	34.33 ± 0.02	38.37 ± 1.49	34.24 ± 0.18
(III)	10.30 ± 0.01	8.09 ± 0.97	5.94 ± 0.06	18.55 ± 0.21	35.68 ± 1.52
(IIIa)	99.62 ± 7.42	124.77 ± 3.48	156.65 ± 2.22	74.66 ± 6.95	78.80 ± 7.69
(IV)	8.23 ± 0.01	33.97 ± 4.51	2.95 ± 0.04	38.37 ± 0.66	7.98 ± 0.11
(IVa)	14.93 ± 0.38	33.94 ± 0.34	5.82 ± 0.01	34.14 ± 0.44	11.80 ± 1.49
(V)	34.50 ± 4.97	47.55 ± 3.38	33.05 ± 0.44	43.27 ± 1.29	36.35 ± 0.33
(Va)	76.94 ± 8.99	79.84 ± 3.28	100.80 ± 1.16	102.38 ± 5.71	67.10 ± 5.85
(VI)	63.58 ± 1.12	22.15 ± 0.02	28.97 ± 2.91	46.30 ± 5.39	22.17 ± 0.63
(VIa)	130.54 ± 1.88	139.10 ± 5.10	202.17 ± 3.83	638.91 ± 10.54	153.85 ± 9.29
(VII)	20.30 ± 0.56	34.76 ± 5.66	24.47 ± 0.96	79.87 ± 10.10	17.52 ± 2.91
(VIIa)	104.36 ± 2.95	127.87 ± 3.49	78.20 ± 6.91	185.29 ± 8.98	69.23 ± 4.70
(VIII)	61.89 ± 2.96	37.48 ± 2.51	10.11 ± 0.13	34.22 ± 1.62	20.92 ± 0.69
(VIIIa)	36.86 ± 0.57	54.48 ± 9.09	60.51 ± 4.48	66.69 ± 3.82	57.72 ± 0.06
(IX)	88.27 ± 5.68	99.67 ± 8.35	77.71 ± 4.73	155.05 ± 6.14	66.08 ± 2.89
(IXa)	231.90 ± 7.99	—*	—*	686.75 ± 40.24	124.57 ± 3.35
(X)	15.69 ± 3.45	34.01 ± 2.32	15.58 ± 0.43	64.31 ± 2.85	67.29 ± 4.58
(Xa)	61.89 ± 2.96	74.45 ± 3.17	81.45 ± 5.96	185.00 ± 11.02	100.41 ± 1.38
(XI)	13.27 ± 0.20	30.56 ± 0.94	6.23 ± 0.73	31.54 ± 2.44	8.60 ± 0.22
(XIa)	46.31 ± 3.76	155.20 ± 2.14	196.41 ± 8.73	146.48 ± 15.65	57.45 ± 3.03
(XII)	3.60 ± 0.25	6.99 ± 0.46	41.03 ± 3.13	74.68 ± 7.54	29.64 ± 3.88
(XIIa)	18.22 ± 1.44	44.93 ± 3.24	18.33 ± 0.76	48.84 ± 0.92	32.66 ± 3.11
(XIII)	17.47 ± 0.15	21.54 ± 3.59	20.39 ± 0.79	91.56 ± 3.13	34.05 ± 2.23
(XIIIa)	24.15 ± 0.27	36.48 ± 1.57	31.46 ± 1.82	88.78 ± 1.54	28.46 ± 1.49
(XIV)	100.04 ± 2.72	137.75 ± 10.20	190.56 ± 2.38	347.17 ± 11.65	—*
(XIVa)	123.84 ± 3.87	143.47 ± 16.75	173.44 ± 21.76	238.36 ± 19.88	112.72 ± 5.80
(XV)	70.27 ± 2.01	33.06 ± 3.00	21.04 ± 0.48	74.29 ± 0.13	29.86 ± 0.63
(XVa)	237.99 ± 7.20	191.08 ± 22.78	334.83 ± 19.13	581.64 ± 7.71	165.32 ± 19.38

* Прочерк — отсутствие цитотоксичности в МТТ-тесте (IC₅₀ > 600 мкМ).

78.9 г предварительно очищенной [17] смеси лактонов корней девясила высокого (*Inula helenium* L.), вносили 2 г диоксида селена и 40 мл 70%-ного *t*-BuOOH. Перемешивали 5 ч при комнатной температуре и оставляли на ночь при 4°C. Отгоняли растворитель при пониженном давлении, тщательно вакуумировали. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали бензолом, затем бензол/ЭА 19 : 1, бензол/ЭА 9 : 1, бензол/ЭА 8 : 2, бензол/ацетон 8 : 2, бензол/изопропанол 1 : 1. С колонки последовательно элюировали фракции, содержащие чистый алантолактон (II), 33.9 г, желтое масло, быстро застывающее в белое твердое вещество ($R_f = 0.71$ на ТСХ в

системе бензол/ЭА 9 : 1), затем телекин (VI) 7.4 г ($R_f = 0.32$ на ТСХ в системе бензол/ЭА 9 : 1), изотелекин (V) 31.6 г ($R_f = 0.16$ на ТСХ в системе бензол/ЭА 9 : 1) и лактон (VII) 3.29 г ($R_f = 0.26$ на ТСХ в системе бензол/ацетон 9 : 1). ЯМР-спектры алантолактона (II) [21], телекина (VI) [27], изотелекина (V) [27] и лактона (VII) [27] аналогичны описанным ранее.

Синтез артемизитена (IV). Дегидратация дигидроартемизинина (XX). В 2-л колбу вносили 1 л диэтилового эфира и суспендировали в нем 20 г коммерчески доступного дигидроартемизинина (XX, 70.3 ммоль). Охлаждали колбу до 0°C в бане

со льдом и при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке по каплям вносили 30 мл эфирата трехфтористого бора, закрывали пробкой, оставляли перемешиваться еще 24 ч при охлаждении. Полностью прозрачную реакционную смесь порциями промывали насыщенным раствором NaHCO_3 , органические слои объединяли, отгоняли эфир, остаток быстро хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью бензол/ЭА 10 : 1. Получили ангидродигидроартемизинин (XXI) с количественным выходом в виде белого твердого вещества.

Реакция ангидродигидроартемизинина (XXI) с синглетным кислородом. В 500-мл колбу, снабженную магнитной мешалкой, вносили 250 мл изопропанола, 5 г ангидродигидроартемизинина (XXI, 18.8 ммоль) и 100 мг бенгальского розового. В колбу вставляли барботер со стеклянным фильтром от склянки Дрекслея. На барботер подавали ток осушенного воздуха, пропущенного через колонку со щелочью. Скорость потока регулировали установкой капилляра на входе насоса. На расстоянии 10 см от колбы устанавливали ртутную лампу высокого давления ДРЛ-125, которую подключали в сеть через дроссель ПРА-125. Оставляли смесь в колбе интенсивно перемешиваться при одновременном пропускании тока воздуха и освещении. Периодически к реакционной массе подливали испарившийся изопропанол. Через 1 сут реакции отгоняли растворитель при пониженном давлении, остаток растворяли в хлороформе, наносили на колонку с силикагелем и элюировали смесью бензол/ЭА 9 : 1. Получили 2.879 г гидропероксида (XXII), 9.7 ммоль, выход 51.6%.

Конверсия гидропероксида (XXII) в лактон (IV). Полученные на предыдущем этапе 2.879 г гидропероксида (XXII) растворяли в смеси 20 мл уксусного ангидрида и 1 мл пиридина, перемешивали 2 ч на магнитной мешалке. Выливали в насыщенный водный раствор NaHCO_3 и оставляли перемешиваться до растворения слоя уксусного ангидрида. Добавляли в колбу хлороформ и после разделения в делительной воронке органический слой сушили над Na_2SO_4 в течение ночи. После отгонки растворителя получили 2.641 г артемизитена (IV, 9.4 ммоль, 97%) в виде белого твердого вещества. Спектр ЯМР артемизитена (IV) аналогичен описанному ранее [28].

Выделение лактонов костуса. Сверхкритический CO_2 -экстракт корней костуса (горькуша лопуховидная, *Saussurea lappa* (Desne.)) был получен из коммерческого источника (Guangzhou Endless Biotech Co., Китай). В 2-л делительной воронке порциями разбавляли 400 мл CO_2 -экстракта водой и хлороформом, органические слои отделяли, сушили Na_2SO_4 , фильтровали через бумажные фильтры, растворитель отгоняли при понижен-

ном давлении. В 2-л колбе к очищенному от механических и полярных примесей CO_2 -экстракту прибавляли 600 мл ацетонитрила, доводили до кипения на водяной бане при перемешивании, еще горячий MeCN -слой декантировали с бесцветного масла, целиком состоящего из триглицеридов. К ацетонитрильному экстракту прибавляли 60 мл воды (10% от объема MeCN), также нагревали на водяной бане до кипения и декантировали с масла на дне, отгоняли растворитель. Получили 114 г экстракта, состоящего преимущественно из СЛ. Полученный MeCN -экстракт фракционировали на колонке с силикагелем, состав фракций контролировали по ТСХ в системе ПЭ/ Et_2O 15 : 5. Фракции, содержащие смесь костунолида (XVI) и дегидрокостус-лактона (VIII), объединяли, упаривали и разделяли в воронке между MeCN и ПЭ, MeCN -слой отделяли и упаривали. Избавлялись от части костунолида путем кристаллизации из ПЭ при -20°C , супернатант упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем, импрегнированным 5%-ным нитратом серебра. Собирали фракции, содержащие чистый дегидрокостус-лактон (VIII), масло, застывающее в длинные бесцветные призмы, с выходом 48.4 г, затем собирали фракции, дающие 7.71 г костунолида (XVI), который быстро изомеризуется в другие лактоны в присутствии следов AgNO_3 .

Более полярные фракции MeCN -экстракта объединяли и хроматографировали на силикагеле, элюируя смесью ПЭ/ЭА 2 : 1. Собирали 7.9 г фракций, богатых сантамарином (IX) и рейнозином (XVII), которые после хроматографии на силикагеле с импрегнированным нитратом серебра дают небольшое количество чистых лактонов (IX) и рейнозина (XVII). Очищенные на колонке с серебром лактоны после этого фильтровали через слой окиси алюминия для удаления остатков нитрата серебра. Спектры ЯМР дегидрокостус-лактона (VIII) [29], костунолида (XVI) [29], сантамарина (IX) [30, 31] и рейнозина (XVII) [30, 31] аналогичны описанным ранее.

Выделение партенолида (X). Несортовая форма пижмы девичьей (*Tanacetum parthenium* L.) была посеяна и выращена на территории ИФАВ РАН (г. Черноголовка, Московская область), в течение июля–августа 2018 г. происходил сбор соцветий с интервалом в 2 недели. Высушенные соцветия пижмы девичьей массой 356.5 г измельчали на лабораторной мельнице и экстрагировали дважды смесью 5 л бензола с этилацетатом при комнатной температуре. После отгонки растворителя экстракт массой 36.03 г разбавляли 450 мл метанола, добавляли 50 мл насыщенного водного раствора ацетата свинца при нагревании на водяной бане (50°C), после чего водяную баню оставляли постепенно остывать. Спустя ночь водно-мета-

нольную часть декантировали, промывали в воронке гексаном. Гексановая часть массой 2.6 г содержала камфору и жиры. Из водно-метанольной оставшейся части при пониженном давлении отгоняли метанол, к остатку прибавляли хлороформ и воду, хлороформную часть массой 16.56 г отделяли и промывали раствором NaHCO_3 и насыщенным раствором NaCl , сушили над Na_2SO_4 , обогащенный экстракт хроматографировали на колонке с силикагелем в бензоле с возрастающим градиентом ЭА. Фракции, содержащие партенолид (X) ($R_f = 0.24$ в системе бензол/ЭА 9 : 1 на ТСХ-пластинках Merck, $R_f = 0.49$ – на пластинках Силуфол), собирали, отгоняли растворитель и вакуумировали, дополнительно кристаллизовали из холодного эфира. Выход 2.77 г, бесцветный, слегка желтый порошок. Спектр ЯМР партенолида (X) аналогичен описанному ранее [31].

Синтез изозаллузарина-С (XIV) из дегидрокостус-лактона (VIII). В 500-мл колбе растворяли 8.0 г дегидрокостус-лактона (X) (34.7 ммоль, $R_f = 0.76$ в системе бензол/ЭА 10 : 1, $R_f = 0.9$ в системе бензол/ЭА 2 : 1) в 250 мл хлороформа, добавляли 1 г диоксида селена, интенсивно перемешивали 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 10 мл 70%-ного *t*-BuOOH порциями по 1 мл раз в 1 мин и перемешивали еще 2.5 ч, контролируя протекание реакции по ТСХ. Затем к реакционной смеси добавляли безводный Na_2SO_4 , упаривали растворитель при пониженном давлении без нагрева, несколько раз промывали оставшийся Na_2SO_4 этилацетатом и также упаривали, вакуумировали и наносили на колонку с силикагелем, элюировали возрастающим градиентом бензол/ЭА, затем ацетоном, собирали фракции, содержащие лактон (XIV) ($R_f = 0.11$ в системе бензол/ЭА 10 : 1, $R_f = 0.43$ в системе бензол/ЭА 2 : 1), при необходимости дополнительно очищали рехроматографией для выделения из смешанных фракций, а также удаления примеси окиси селена. Выход 4.76 г, белое твердое вещество, ^1H -ЯМР-спектр соответствует описанному ранее [32].

Ацилирование изотелекина (V). В колбе растворяли 4 г (16.1 ммоль) изотелекина (V) в 40 мл пиридина. Затем по каплям добавляли 1.77 г ацилхлорида при перемешивании, закрывали пробкой и оставляли реакцию идти в течение ночи при комнатной температуре. После этого при пониженном давлении отгоняли основную часть пиридина, добавляли к остатку воду и эфир, держали на ультразвуковой бане до растворения смолы. Водный слой трижды экстрагировали эфиром, после чего сумму органических частей промывали раствором винной кислоты и упаривали, получили 5.05 г остатка неочищенного лактона (XV). Очищали колоночной хроматографией на силикагеле, собирая фракции с $R_f = 0.77$ на ТСХ в си-

стеме ХФ/ацетон 20 : 1 (подвижность изотелекина $R_f = 0.39$). Выход чистого ацилированного продукта (XV) составил 3.55 г (12.2 ммоль, 76.0%), ^1H -ЯМР-спектр соответствует литературному [33].

Общий метод присоединения тиофенола к сесквитерпеновым лактонам. Способ А (стандартный): в виале при комнатной температуре растворяли 1 ммоль лактона в 10 мл метанола, туда же добавляли 232 мкл (2.1 ммоль) тиофенола и 100 мкл триэтиламина. После перемешивания виалу закрывали, изолировали слоем парафила и оставляли на 3 сут. Ход реакции контролировали по ТСХ. При пониженном давлении на водяной бане (40°C) отгоняли растворитель, растворяли в хлороформе и промывали в воронке последовательно раствором Na_2CO_3 , водой и слабым раствором NaCl , каждый раз дополнительно экстрагировали еще одной порцией хлороформа. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , отгоняли растворитель, вакуумировали, кристаллизовали остаток с 2 мл метанола при -10°C , убирали с помощью пипетки метанол и снова вакуумировали. Получили продукт в виде светлого порошка.

Способ Б: в виале при комнатной температуре растворяли 1 ммоль лактона в 10 мл метанола, прибавляли 232 мкл (2.1 ммоль) тиофенола и 100 мкл триэтиламина и перемешивали. К быстро закристаллизовавшейся реакционной смеси добавляли 5 мл хлороформа и выдерживали еще 10 мин, после чего отгоняли растворитель при пониженном давлении. Остаток вакуумировали и кристаллизовали из 5 мл холодного метанола (-10°C). Выпавшие кристаллы быстро отфильтровывали на стеклянном фильтре при пониженном давлении и сушили в вакууме.

Способ В: реакционную смесь упаривали при пониженном давлении, остаток сразу хроматографировали на колонке с силикагелем.

Способ Г: реакционную смесь обрабатывали как в способе А, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем.

Способ Д: выпавшие из реакционной смеси кристаллы отфильтровывали на стеклянном фильтре, оставшийся в маточном растворе продукт извлекали, как в способе А.

(3*S*,3*aR*,4*S*,6*aR*,9*S*,9*aR*,9*bR*)-4-Гидрокси-9-метил-6-метилен-3-((фенилтио)метил)октагидрофурано[4,5-*b*]фуран-2,8(3*H*,4*H*)-дион (Ia). Крупные бесцветные прямоугольные кристаллы, ТСХ $R_f = 0.51$ в системе хлороформ/ацетон 20 : 2.

Спектр ^1H -ЯМР (200 МГц, CDCl_3): 1.23 (3H, д, J 6.7, H15), 2.05 (1H, дд, J_1 12.1, J_2 10.2, H9a), 2.25 (2H, м, H4 + H5), 2.50 (1H, с, H2a), 2.51 (1H, д, J 10.7, H2b), 2.73 (2H, м, H9b + H7), 2.99 (2H, м, H1 + H11), 3.42 (1H, дд, J_1 13.8, J_2 4.2, H13a), 3.66 (1H, дд, J_1 14.3, J_2 4.9, H13b), 3.70 (1H, м, H8), 3.93

(1H, т, J 9.0, H6), 4.74 (1H, с, H14a), 5.04 (1H, с, H14b), 7.20–7.51 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): 14.4 (C15), 34.2 (C13), 39.6 (C4), 43.5 (C9), 46.9 (C5), 47.2 (C1), 48.5 (C2), 49.7 (C7), 51.2 (C11), 75.1 (C8), 83.2 (C6), 115.1 (C14), 126.9 (Cd), 129.2 (Cc), 130.2 (Cb), 135.5 (Ca), 143.6 (C10), 175.8 (C12), 218.8 (C3).

(3S,5aS,6R,8aS,12S)-3,6-Диметил-9-((фенилтио)метил)октагидро-12H-3,12-эпокси[1,2]диоксипино[4,3-*i*]изохромен-10(3H)-он (IVa). Аморфный, ТСХ в системе бензол/ЭА 2 : 1 R_f = 0.62.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.96 (3H, д, J 5.5, H14), 1.46 (3H, с, H15), 3.17 (1H, дд, J_1 13.7, J_2 11.8, H13a), 3.91 (1H, дд, J_1 13.8, J_2 3.3, H13b), 5.93 (1H, с, H5), 7.20–7.42 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 19.8 (C14), 24.7 (C8), 25.4 (C2), 31.3 (C15), 33.8 (C9), 35.8 (C3), 37.6 (C10), 38.0 (C13), 41.1 (C11), 43.4 (C7), 50.3 (C1), 80.7 (C6), 94.0 (C5), 105.4 (C4), 126.5 (Cd), 129.2 (Cc), 129.4 (Cb), 134.5 (Ca), 170.5 (C12).

(3R,3aR,6R,8aR,9aR)-6-Гидрокси-8a-метил-5-метилен-3-((фенилтио)метил)декагидронафто[2,3-*b*]фуран-2(3H)-он (Va). Серые кристаллы, ТСХ в системе бензол/ЭА 9 : 1 для продукта, R_f = 0.19 для изотелекина.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.80 (1H, с, H15), 1.53 (1H, дд, J_1 15.5, J_2 4.5, H9a), 2.17 (1H, д, J 15.1, H9b), 2.39 (1H, уш.д, J 11.8, H5), 2.63 (1H, м, H7), 2.92 (1H, д, J 7.1, H11), 3.51 (2H, м, H13a + H13b), 4.33 (1H, уш.с, H3), 4.46 (1H, уш.с, H8), 4.61 (1H, с, H15a), 5.03 (1H, с, H15b), 7.20–7.54 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 17.0 (C14), 20.1 (C6), 29.0 (C13 + C2), 34.7 (C10), 35.8 (C1), 38.5 (C7), 40.4 (C5), 41.1 (C9), 48.6 (C11), 73.3 (C3), 78.2 (C8), 109.9 (C15), 126.8 (Cd), 127.4 (Cc), 129.0 (Cb), 129.9 (Ca), 150.3 (C4), 176.9 (C12).

(3R,3aR,4aR,8aR,9aR)-4a-Гидрокси-8a-метил-5-метилен-3-((фенилтио)метил)декагидронафто[2,3-*b*]фуран-2(3H)-он (VIa). Выход 481 мг (67.1%) в сумме при расчете реакции на 2 ммоль лактона (20). Крупные кристаллы.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.93 (3H, с, H14), 1.14 (1H, уш.с, H1a), 1.60 (2H, м, H2a + H2b), 1.86 (1H, дд, J_1 15.4, J_2 2.4, H6a), 2.15 (1H, дт, J_1 13.7, J_2 3.5, H3a), 2.56 (2H, м, H3b + H7), 2.92 (2H, м, H13a + H11), 3.52 (1H, д, J 9.7, H13b), 4.51 (1H, уш.с, H8), 4.68 (1H, с, H15a), 4.87 (1H, с, H15b), 7.20–7.44 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 21.5 (C2), 21.6 (C14), 26.7 (C6), 29.3 (C13), 31.6 (C3), 35.2 (C7), 35.3 (C1), 35.7 (C9), 36.9 (C10), 46.3 (C11), 74.2 (C5), 78.3 (C8), 108.8 (C15), 126.9 (Cd), 129.2 (Cc), 130.3 (Cb), 135.6 (Ca), 150.5 (C4), 177.0 (C12).

(3R,3aR,4aS,6R,8aR,9aR)-4a,6-Дигидрокси-8a-метил-5-метилен-3-((фенилтио)метил)декагидронафто[2,3-*b*]фуран-2(3H)-он (VIIa). Белое аморф-

ное твердое вещество, ТСХ в системе бензол/ЭА 2 : 1 R_f = 0.67.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.82 (3H, с, H14), 1.04 (1H, дд, J_1 13.2, J_2 4.1, H1a), 2.90 (1H, дд, J_1 6.1, J_2 2.3, H11), 3.11 (1H, дд, J_1 12.3, J_2 2.4, H13a), 3.43 (1H, дд, J_1 12.3, J_2 4.9, H13b), 4.32 (1H, уш.с, H3), 4.43 (1H, т, J 4.2, H8), 4.83 (1H, с, H15a), 5.04 (1H, с, H15b), 7.14–7.31 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 21.4 (C14), 26.0 (C1), 28.4 (C2), 29.4 (C13), 30.1 (C6), 34.8 (C10), 35.6 (C9), 37.2 (C7), 46.0 (C11), 74.9 (C3), 75.5 (C5), 78.3 (C8), 112.9 (C15), 126.9 (Cd), 129.3 (Cc), 129.7 (Cb), 130.8 (Ca), 148.3 (C4), 176.9 (C12).

(3S,3aS,6aR,9aR,9bS)-6,9-Диметил-3-((фенилтио)метил)декагидроазулено[4,5-*b*]фуран-2(3H)-он (VIIIa). Иглы из метанола или твердое белое вещество.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 2.83 (1H, м, H5), 3.15 (1H, дд, J_1 13.8, J_2 6.8, H13a), 3.55 (1H, дд, J_1 13.6, J_2 4.1, H13b), 3.92 (1H, т, J 8.8, H6), 4.76 (1H, с, H14a), 4.84 (1H, с, H14b), 5.06 (1H, уш.с, H15a), 5.20 (1H, уш.с, H15b), 7.20–7.54 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 30.1 (C2), 32.5 (C8), 32.9 (C9), 33.4 (C3), 37.2 (C13), 46.8 (C1), 46.9 (C7), 47.1 (C11), 52.0 (C5), 85.2 (C6), 109.3 (C14), 112.0 (C15), 126.6 (Cd), 127.5 (Cc), 129.0 (Cb), 135.6 (Ca), 137.0 (C10), 149.6 (C4), 176.3 (C12).

(3S,3aS,5aR,6R,9bS)-6-Гидрокси-5a,9-диметил-3-((фенилтио)метил)-3a,4,5,5a,6,7,9a,9b-октагидронафто[1,2-*b*]фуран-2(3H)-он (IXa). Масло. ТСХ в системе бензол/ЭА 10 : 1 R_f = 0.23.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.86 (3H, с, H14), 1.17 (1H, м, H9a), 1.80 (3H, с, H15), 2.07 (1H, м, H8a), 2.43 (1H, м, H7), 2.58 (1H, ддд, J_1 12.6, J_2 8.1, J_3 3.7, H11), 3.03 (1H, дд, J_1 13.7, J_2 8.1, H13a), 3.57 (1H, дд, J_1 13.6, J_2 3.7, H13b), 3.67 (1H, дд, J_1 10.0, J_2 6.7, H1), 3.93 (1H, дд, J_1 11.4, J_2 10.0, H6), 5.34 (1H, уш.с., H3), 7.20–7.45 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 11.0 (C14), 23.3 (C8), 23.6 (C15), 32.7 (C2), 33.0 (C13), 34.5 (C9), 40.5 (C10), 45.4 (C7), 50.5 (C11), 52.0 (C5), 75.2 (C1), 81.1 (C6), 121.3 (C3), 126.6 (Cd), 129.1 (Cc), 129.6 (Cb), 133.4 (C4), 135.6 (Ca), 176.96 (C12).

(3S,3aS,9aR,10aR,10bS,Z)-6,9a-Диметил-3-((фенилтио)метил)-3a,4,5,8,9,9a,10a,10b-октагидрооксирено[2',3':9,10]циклодека[1,2-*b*]фуран-2(3H)-он (Xa). Выход 411 мг (76.4%) при расчете реакции на 1.5 ммоль лактона (X). Медленно кристаллизующееся масло, ТСХ в системе бензол/ЭА 9 : 1 R_f = 0.36.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 1.31 (3H, с, H15), 1.69 (3H, с, H14), 2.36 (1H, ддд, J_1 12.1, J_2 6.8, J_3 4.3, H11), 2.72 (1H, д, J 9.0, H5), 3.32 (1H, дд, J_1 14.1, J_2 5.4, H13a), 3.51 (1H, дд, J_1 14.2, J_2 4.2,

H13b), 3.84 (1H, т, J 9.0, H6), 5.08 (1H, дд, J_1 12.0, J_2 2.1, H2), 7.23–7.52 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 16.9 (C14), 17.1 (C15), 24.0 (C2), 30.1 (C8), 32.9 (C13), 36.5 (C3), 40.5 (C9), 47.7 (C7), 47.9 (C-11), 61.5 (C4), 66.4 (C5), 82.3 (C6), 124.9 (Cd), 128.8 (C1), 129.2 (Cc), 130.0 (Cb), 134.4 (C10), 135.8 (Ca), 175.1 (C12).

(1aR,2S,5aR,6aR,9R,9aR,9bS)-2,5a-Диметил-9-((фенилтио)метил)октагидро-2H-оксирено[2',3':4,4a]нафто[2,3-b]фуран-8(9H)-он (XIa). Белый порошок. ТСХ в системе бензол/ЭА 9 : 1 R_f = 0.67.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 1.10 (3H, д, J 7.6, H15), 1.21 (3H, с, H14), 1.41–1.58 (5H, м, H3 + H4 + H2b + H9b), 1.60 (1H, дд, J_1 14.8, J_2 2.8, H1a), 1.83 (3H, м, H2a + H1b + H9b), 2.92 (1H, т, J 12.2, H11), 3.07 (1H, дд, J_1 10.0, J_2 2.8, H7), 3.16 (1H, с, H6), 3.20 (1H, м, H13a), 3.69 (1H, дд, J_1 12.9, J_2 2.6, H13b), 4.58 (1H, дт, J_1 6.2, J_2 2.9, H8), 7.23–7.46 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 16.5 (C2), 17.8 (C15), 24.1 (C14), 29.6 (C3), 30.8 (C13), 32.1 (C10), 35.3 (C9), 37.8 (C4 + C7), 38.7 (C1), 41.8 (C11), 56.8 (C6), 68.4 (C5), 75.9 (C8), 127.2 (Cd), 129.3 (Cc), 130.3 (Cb), 134.1 (Ca), 176.1 (C12).

(3R,3aR,8aR,9aR)-5,8a-Диметил-3-((фенилтио)метил)-3a,7,8,8a,9,9a-гексагидронафто[2,3-b]фуран-2(3H)-он (XIIa). Светлый порошок, ТСХ R_f = 0.86 в системе бензол/ЭА 9 : 1.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 1.08 (3H, с, H14), 1.40 (1H, м, H1a), 1.52 (1H, д, J 3.4, H1b), 1.59 (1H, д, J 2.4, H9a), 1.75 (3H, с, H15), 2.09 (1H, м, H2a), 2.22 (2H, дд, J_1 14.9, J_2 3.0, H2b + H9b), 2.91 (1H, т, J 12.2, H11), 3.06 (1H, дд, J_1 14.6, J_2 9.0, J_3 4.8, H7), 3.38 (1H, м, H13a), 3.58 (1H, дд, J_1 12.5, J_2 2.6, H13b), 4.78 (1H, дт, J_1 5.5, J_2 2.7, H8), 5.47 (1H, д, J 3.2, H6), 5.63 (1H, уш.с, H3), 7.21–7.53 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 20.1 (C15), 22.2 (C2), 24.7 (C14), 30.6 (C13), 30.8 (C10), 37.2 (C7), 37.7 (C1), 39.5 (C9), 45.4 (C11), 69.1 (C8), 112.6 (C6), 124.6 (Cd), 126.9 (C3), 129.2 (Cc), 130.2 (Cb), 130.5 (C4), 137.0 (Ca), 145.2 (C5), 176.4 (C12).

(3R,3aS,4S,4aR,5S,9aR)-4-Гидрокси-4a,5-диметил-3-((фенилтио)метил)-3a,4,4a,5,6,7,9,9a-октагидронафто[2,3-b]фуран-2(3H)-он (XIIIa). Твердое белое вещество, ТСХ R_f = 0.34 в системе бензол/ЭА 9 : 1.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.84 (3H, с, H-14), 0.89 (3H, д, J 6.8, H-15), 1.38–1.48 (2H, м, H3), 1.93–2.06 (3H, м, H2 + H4), 2.24 (1H, уш.т, J 12.2, H9a), 2.60 (1H, дд, J_1 14.0, J_2 7.2, H9b), 2.71 (1H, м, H7), 3.02 (1H, т, J 9.0, H11), 3.21 (1H, м, H13a), 3.68 (1H, дд, J_1 12.5, J_2 2.4 H13b), 4.08 (1H, дд, J_1 6.0, J_2 4.4, H6), 4.68 (1H, дт, J_1 10.7, J_2 7.4, H8), 5.66 (1H, дт, J_1 4.7, J_2 2.3, H1), 7.23–7.52 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 16.0 (C15), 18.8 (C14), 25.6 (C2), 26.6 (C3), 32.6 (C4), 34.9 (C13), 35.3 (C9), 41.7 (C7), 41.9 (C5), 48.0 (C11), 73.7 (C6), 76.4 (C8), 127.1 (Cd), 128.0 (C1), 129.2 (Cc), 129.3 (Cb), 134.6 (Ca), 135.0 (C10), 176.9 (C12).

(3S,3aS,6aR,8R,9aR,9bS)-8-Гидрокси-6,9-диметил-3-((фенилтио)метил)декаазулено[4,5-b]фуран-2(3H)-он (XIVa). Бесцветное масло. ТСХ R_f = 0.58 в системе бензол/ЭА 2 : 1.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 3.03 (2H, м, H1 + H5), 3.15 (1H, дд, J_1 13.8, J_2 6.8, H13a), 3.52 (1H, дд, J_1 13.8, J_2 4.0, H13b), 3.87 (1H, т, J 9.2, H6), 4.67 (1H, уш.с, H3), 4.74 (1H, с, H14a), 4.88 (1H, с, H14b), 5.35 (1H, с, H15a), 5.44 (1H, с, H15b), 7.22–7.43 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 32.9 (C8), 33.3 (C9), 37.5 (C13), 39.7 (C2), 43.8 (C1), 46.7 (C7), 47.3 (C11), 49.5 (C5), 74.5 (C3), 84.8 (C6), 112.6 (C14), 112.9 (C15), 126.7 (Cd), 129.2 (Cc), 129.7 (Cb), 135.5 (Ca), 148.9 (C10), 154.3 (C4), 176.1 (C12).

(3R,3aR,6R,8aR,9aR)-8a-Метил-5-метил-2-окси-3-((фенилтио)метил)додеканафто[2,3-b]фуран-6-ил ацетат (XVa). Легкоплавкое белое вещество.

Спектр ¹H-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.82 (3H, с, H14), 1.14 (1H, д, J 12.6, H1a), 1.39 (1H, дт, J_1 12.7, J_2 3.5, H1b), 1.53 (1H, дд, J_1 10.4, J_2 4.5, H6a), 1.59 (1H, уш.с, H9a), 1.68 (1H, дд, J_1 10.6, J_2 5.0, H6b), 1.81 (2H, м, H5 + H2a), 2.08 (3H, с, MeCOO₃), 2.20 (2H, м, H9b + H2b), 2.65 (1H, дд, J_1 11.6, J_2 5.6, H11), 2.91 (2H, м, H7 + H13a), 3.52 (1H, м, H13b), 4.47 (1H, дд, J_1 5.5, J_2 3.6, H8), 4.74 (1H, уш.с, H15a), 5.15 (1H, уш.с, H15b), 5.37 (1H, т, J 2.8, H3), 7.20–7.40 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³C-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 17.2 (C14), 20.0 (C6), 21.52 (MeCOO₃), 27.0 (C2), 29.0 (C13), 34.4 (C10), 36.4 (C1), 38.5 (C7), 41.1 (C9), 41.7 (C5), 46.6 (C11), 75.2 (C3), 78.0 (C8), 112.5 (C15), 126.84 (Cd), 127.1 (Cc), 127.5 (Cc'), 129.0 (Cb), 129.2 (Cb'), 129.9 (Ca), 145.65 (C4), 170.0 (MeCOO₃), 176.67 (C12).

Культуры клеток. Культуры клеток человека RD (рабдомиосаркома, ATCC® CCL-136™), HCT116 (карцинома кишечника, ATCC® CCL-247™), HeLa (аденокарцинома шейки матки, ATCC® CCL-2™), A549 (карцинома легкого, ATCC® CCL-185™) и HEK293 (ATCC® CCL-1573™) выращивали в среде DMEM (для A549, HCT116 и RD) и EMEM (для HeLa) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина и 1% гентамицина в качестве антибиотика при 37°C и 5% CO₂ во влажной атмосфере. Исходные культуры клеток получены из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия).

Цитотоксичность *in vitro*. Цитотоксичность синтезированных соединений определяли с помощью МТТ-теста. Клетки сеяли в концентрации 1×10^4 клеток на 200 мкл в 96-луночный планшет и культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. После 24 ч инкубации к культурам клеток добавляли различные концентрации тестируемых соединений (100–1.56 мкМ), далее клетки культивировали в тех же условиях в течение 72 ч. Эксперимент проводили в трех повторностях для каждой концентрации. Все вещества растворяли в ДМСО, конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 0.1% и не была токсична для клеток. Контрольными выступали лунки, в которые добавляли растворитель в конечной концентрации не более 0.1%. После инкубации в каждую лунку добавляли 20 мкл МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид, 5 мг/мл), планшеты инкубировали еще 2 ч. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора (Victor³, PerkinElmer, США) определяли оптическую плотность при 530 нм за вычетом измеренного фоновое поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0 (PerkinElmer, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие представители веществ из класса сесквитерпеновых лактонов проявляют выраженную цитотоксическую активность и выступают перспективными противоопухолевыми агентами. В то же время стоит задача повысить селективность их действия по отношению к опухолевым клеткам. С этой целью нами синтезирована серия конъюгатов СЛ с тиофенолом по реакции Михаэля. Такого рода конъюгаты способны к окислению по атому серы под действием внутриклеточных АФК с последующим ретрораспадом продукта присоединения по Михаэлю, что ведет к высвобождению активного СЛ. Цитотоксическая активность полученных пролекарств-конъюгатов показывает, что они, как правило, вполне ожидаемо обладают в несколько раз меньшей активностью, чем исходный лактон, но, что более важно, все еще демонстрируют цитотоксичность по отношению к протестированным опухолевым линиям. Это говорит о целесообразности применения такого подхода для создания пролекарств СЛ. Можно было предположить, что уменьшение цитотоксичности конъюгатов будет пропорциональным для всех СЛ и будет зависеть только от типа клеточной линии, однако это не так, разные лактоны показывают разное падение цитотоксичности. Из протестированных веществ стоит

выделить конъюгаты лактонов алантолактона (**IIa**) и артемизитена (**IVa**) как перспективные для дальнейшей оптимизации.

Данный подход к созданию пролекарств сесквитерпеновых лактонов в перспективе также позволяет использовать замещенные тиофенолы для придания молекуле конъюгата как целому нужной липофильности без вмешательства в структуру СЛ или для прикрепления остатка СЛ к молекулам-векторам для более избирательной доставки в ткань опухоли.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-33-00567 мол_а).

Анализ ЯМР-спектров выполнен в рамках Госзадания 0090_2019_0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang S., Won Y.-K., Ong C.-N., Shen H.-M. // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*. 2005. V. 5. P. 239–249. <https://doi.org/10.2174/1568011053765976>
2. Pickman A.K. // *Biochem. System. Ecol.* 1986. V. 14. P. 255–281. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(86\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0305-1978(86)90101-8)
3. Siedle B., Garcia-Pineros A.J., Murillo R., Schulte-Monting J., Castro V., Rungeler P., Klaas C.A., Da Costa F.B., Kisiel W., Merfort I. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. P. 6042–6054. <https://doi.org/10.1021/jm049937r>
4. Gaspar A.R., Potgieter D.J., Vermeulen N.M. // *Biochem. Pharmacol.* 1986. V. 35. P. 493–497. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90225-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90225-X)
5. Iwai K., Kosugi H., Uda H. // *Chem. Lett.* 1974. V. 3. P. 1237–1240. <https://doi.org/10.1246/cl.1974.1237>
6. Trost B.M., Salzman T.N., Hiroi K. // *J. Am. Chem. Soc.* 1976. V. 98. P. 4887–4902. <https://doi.org/10.1021/ja00432a034>
7. Brownbridge P., Warren S. // *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1977. V. 13. P. 465–466. <https://doi.org/10.1039/C39770000465>
8. Doskey C.M., Buranasudja V., Wagner B.A., Wilkes J.G., Du J., Cullen J.J., Buettner G.R. // *Redox Biol.* 2016. V. 10. P. 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.010>

9. Fardella G., Barbetty P., Grandolini G., Chiappini I., Ambrogi V., Scarcia V., Candiani A.F. // *Eur. J. Med. Chem.* 1999. V. 34. P. 515–523.
[https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(99\)80100-7](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(99)80100-7)
10. Schaeffer M., Stampf J.-L., Benzra C. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. P. 6106–6113.
<https://doi.org/10.1021/jo00287a024>
11. Corbet J.-P., Benzra C. // *Can. J. Chem.* 1979. V. 57. P. 213–217.
<https://doi.org/10.1139/v79-034>
12. Paitayatat S., Tarnchompoo B., Thebtaranonth Y., Yuthavong Y. // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 633–638.
<https://doi.org/10.1021/jm960767v>
13. Fischer N.H., Olivier E.J., Fischer H.D. // In: *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* / Eds. Herz W., Grisebach H., Kirby G.W. Vienna: Springer, 1979. V. 38. P. 47–320.
https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8548-3_2
14. Buděšinsky M., Šaman D. // *Ann. Rep. NMR Spect.* 1995. V. 30. P. 231–475.
[https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(08\)60027-7](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(08)60027-7)
15. Клочков С.Г., Афанасьева С.В., Зефиоров Н.С. // *Техн. живых сист.* 2008. Т. 5. С. 31–39.
16. Rekha R. // *Chemical Transformations of Sesquiterpene Lactones by Conventional and Non-Conventional Methodologies and Their Evaluation as Agrochemicals* / Thesis, Ludhiana: Punjab Agricultural University, 2006. 248 p.
<https://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/5810015724>
17. Семаков А.В., Клочков С.Г. // *XPC.* 2020. № 3. С. 145–154.
<https://doi.org/10.14258/jcprm.2020034681>
18. Brossi A., Venugopalan B., Gerpe L.D., Yeh H.J.C., Flippen-Anderson J.L., Buchs P., Luo X.D., Milhous W., Peters W. // *J. Med. Chem.* 1988. V. 31. P. 645–650.
<https://doi.org/10.1021/jm00398a026>
19. El-Ferally F.S., Ayalp A., Al-Yahya M.A., McPhail D.R., McPhail A.T. // *J. Nat. Prod.* 1990. V. 53. P. 66–71.
<https://doi.org/10.1021/np50067a008>
20. Zuma N.H., Smit F.J., de Kock C., Combrinck J., Smith P.J., N'Da D.D. // *Eur. J. Med. Chem.* 2016. V. 122. P. 635–646.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.027>
21. Klochkov S.G., Afanas'eva S.V., Pushin A.N. // *Chem. Nat. Comp.* 2006. V. 42. P. 400–406.
<https://doi.org/10.1007/s10600-006-0166-7>
22. Artemova N.P., Nikitina L.E., Yushkov D.A., Shigabudinova O.G., Plemenkov V.V., Klochkov V.V., Khairutdinov B.I. // *Chem. Nat. Comp.* 2005. V. 41. P. 45–47.
<https://doi.org/10.1007/s10600-005-0071-5>
23. Ginanneschi M., Chelli M., Papini A.M., Pinzani D., Rapi G. // *Magn. Res. Chem.* 1996. V. 34. P. 95–99.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-458X\(199602\)34:2<95::AID-OMR855>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(199602)34:2<95::AID-OMR855>3.0.CO;2-V)
24. Bakuzis P., Bakuzis M.L.F. // *J. Org. Chem.* 1981. V. 46. P. 235–239.
<https://doi.org/10.1021/jo00315a002>
25. Semakov A.V., Klochkov S.G. // *Chem. Nat. Comp.* 2020. V. 56. P. 254–256.
<https://doi.org/10.1007/s10600-020-03000-7>
26. Adekenova A.S., Sakenova P.Y., Ivasenko S.A., Khabarov I.A., Adekenov S.M., Berthod A. // *Chromatographia.* 2016. V. 79. P. 37–43.
<https://doi.org/10.1007/s10337-015-3000-1>
27. Hussain S., Sharma M. // *J. Phys. Sci.* 2010. V. 21. P. 99–107.
28. Acton N., Klayman D.L. // *Planta Med.* 1985. V. 51. P. 441–442.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-969543>
29. Li A., Sun A., Liu R. // *J. Chromatography A.* 2005. V. 1076. P. 193–197.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.042>
30. Coronado-Aceves E.W., Velazquez C., Robles-Zepeda R.E., Jimenez-Estrada M., Hernandez-Martinez J., Galvez-Ruiz J.C., Garibay-Escobar A. // *Pharm. Biol.* 2016. V. 54. P. 2623–2628.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1173067>
31. El-Ferally F.S., Chan Y.-M. // *J. Pharm. Sci.* 1978. V. 67. P. 347–350.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600670319>
32. Macias F.A., Galindo J.C.G., Massanet G.M. // *Phytochemistry.* 1992. V. 31. P. 1969–1977.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80343-D](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80343-D)
33. Kalsi P.S., Kaur B., Talwar K.K. // *Ind. J. Chem.* 1985. V. 24B. P. 835–839.

Synthesis and Cytotoxic Activity of Adducts of Thiophenol to Sesquiterpene Lactones

A. V. Semakov*^{#,}, L. V. Anikina*, and S. G. Klochkov*

[#]Phone: +7 (919) 96-49-347; e-mail: L_vok@list.ru

*Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences, Severnyi proezd 1, Chernogolovka, 142432 Russia

Derivatives of sesquiterpene lactones modified by the lactone cycle with a thiophenol residue were obtained. The resulting conjugates are capable of oxidation-elimination reaction under the action of tumor cell ROS with the release of the original cytotoxic lactones. It is proposed to use the obtained sulfur-containing conjugates as ROS-activated prodrugs of sesquiterpene lactones. The antiproliferative properties of the resulting conjugates were studied on four tumor and one pseudonormal cell lines. The cytotoxicity of the conjugates is less than that of the parent lactones, but sometimes, as in the case of the conjugates of alantolactone and artemisitene, it remains moderate in all tested tumor lines.

Keywords: thiophenol, prodrugs, reactive oxygen species, sesquiterpene lactones, cytotoxicity in vitro, MTT-test