



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07C 215/50 (2024.01); A61K 31/575 (2024.01); A61K 31/58 (2024.01); A61P 35/00 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023116449, 22.06.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.06.2023

Дата регистрации:
16.05.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.06.2023

(45) Опубликовано: 16.05.2024 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

450054, Республика Башкортостан, г. Уфа,
Проспект Октября, 71, УФИЦ РАН,
патентный отдел, Шангараев Камилль
Раилевич

(72) Автор(ы):

Салимова Елена Викторовна (RU),
Парфенова Людмила Вячеславовна (RU),
Ишметова Диана Валиевна (RU),
Зайнуллина Лиана Фанзилевна (RU),
Вахитова Юлия Венеровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

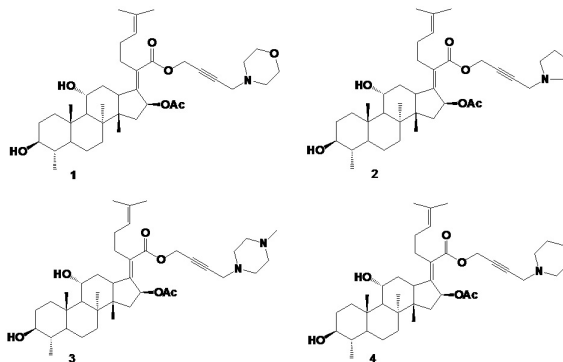
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ УФИМСКИЙ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2735665 C1, 05.11.2020. RU
2780014 C1, 19.09.2022. RU 2784215 C1,
23.11.2022. ELENA V. TRET'YAKOVA, et al.
Synthesis, modification, and biological activity of
propargylated methyl dihydroquinopimarates,
Natural Product Research, 2020. NI J, et al.
Discovery, synthesis of novel fusidic acid
derivatives possessed amino-terminal groups at
the (см. прод.)

(54) Применение оснований Манниха на основе фузидовой кислоты в качестве соединений с
противоопухолевой активностью

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины,
и раскрывает применение оснований Манниха на
основе фузидовой кислоты формулы (1) - (4) в
качестве соединений, проявляющих высокую
противоопухолевую активность *in vitro* в
отношении пяти линий раковых клеток человека
HepG2, HCT-116, SH-SY5Y, MCF-7 и A549.
Техническим результатом изобретения является
обеспечение высокой противоопухолевой
активности *in vitro* в отношении пяти линий
раковых клеток человека: HepG2, HCT-116, SH-
SY5Y, MCF-7 и A549. 1 табл., 2 пр.



(56) (продолжение):

3-hydroxyl position with anticancer activity. Eur J Med Chem. 2019, 162, 122-131.

R U 2 8 1 9 2 9 3 C 1

R U 2 8 1 9 2 9 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07C 215/50 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07C 215/50 (2024.01); A61K 31/575 (2024.01); A61K 31/58 (2024.01); A61P 35/00 (2024.01)

(21)(22) Application: 2023116449, 22.06.2023

(24) Effective date for property rights:
22.06.2023Registration date:
16.05.2024

Priority:

(22) Date of filing: 22.06.2023

(45) Date of publication: 16.05.2024 Bull. № 14

Mail address:

450054, Respublika Bashkortostan, g. Ufa,
Prospekt Oktyabrya, 71, UFITS RAN, patentnyj
otdel, Shangaraev Kamil Railevich

(72) Inventor(s):

Salimova Elena Viktorovna (RU),
Parfenova Liudmila Viacheslavovna (RU),
Ishmetova Diana Valievna (RU),
Zainullina Liana Fanzilevna (RU),
Vakhitova Iuliia Venerovna (RU)

(73) Proprietor(s):

FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE
BIUDZHETNOE NAUCHNOE
UCHREZHDENIE UFIMSKII FEDERALNYI
ISSLEDOVATELSKII TSENTR ROSSIYSKOI
AKADEMII NAUK (RU)

(54) USE OF MANNICH BASES BASED ON FUSIDIC ACID AS COMPOUNDS WITH ANTI-TUMOUR ACTIVITY

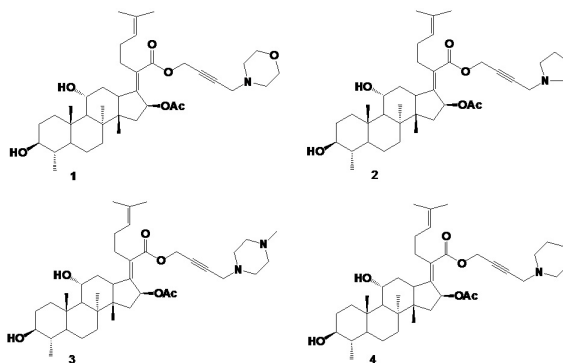
(57) Abstract:

FIELD: medicine.

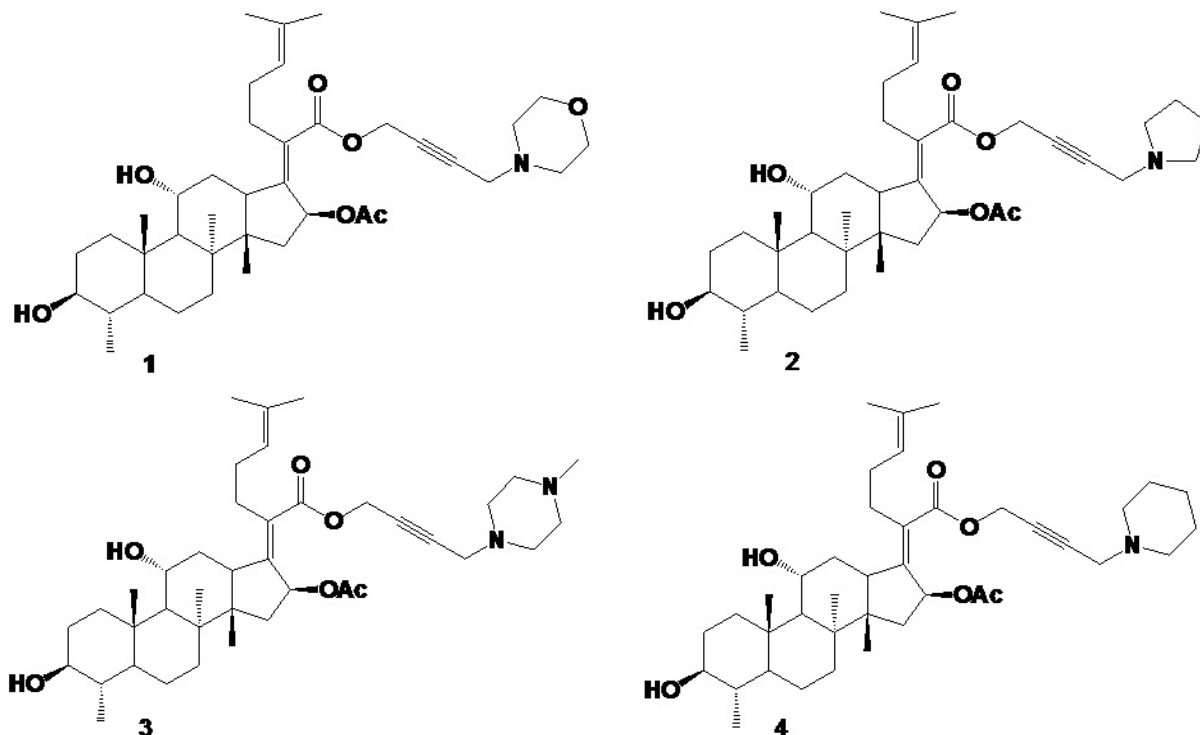
SUBSTANCE: invention relates to medicine, and discloses the use of Mannich bases based on fusidic acid of formula (1) – (4) as compounds exhibiting high anti-tumour activity *in vitro* with respect to five human cancer cell lines HepG2, HCT-116, SH-SY5Y, MCF-7 and A549.

EFFECT: providing high anti-tumour activity *in vitro* with respect to five human cancer cell lines: HepG2, HCT-116, SH-SY5Y, MCF-7 and A549.

1 cl, 1 tbl, 2 ex

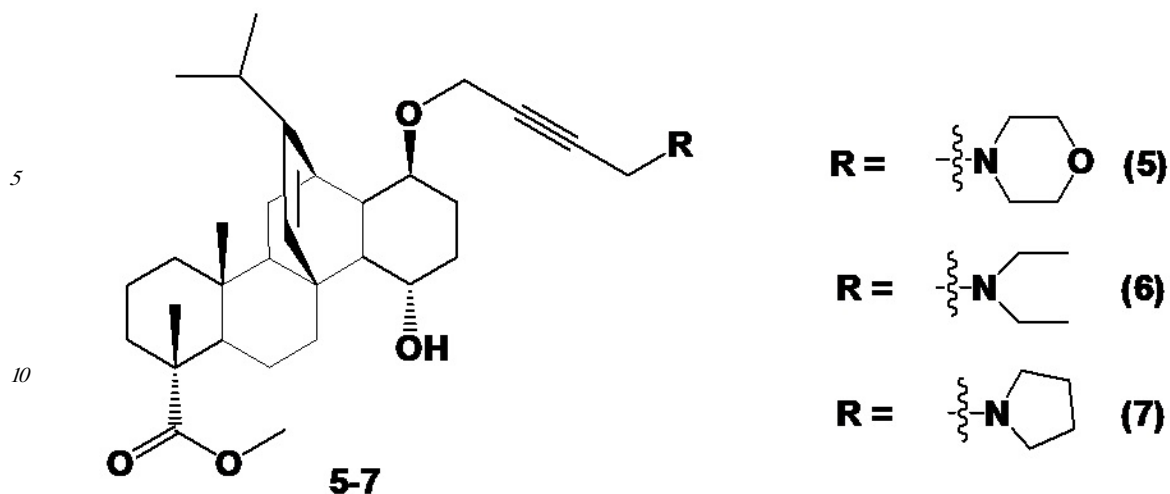


Изобретение относится к области медицинской химии, а именно к гетероциклическим производным фузидовой кислоты - основаниям Манниха - формулы (1) - (4), представляющим собой: 4-морфолинобут-2-ин-1-ил-(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17H-циклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноат (1), 4-(пирролидин-1-ил)бут-2-ин-1-ил-(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17H-циклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноат (2), 4-(4-метилпиперазин-1-ил)бут-2-ин-1-ил-(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17H-циклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноат (3) и 4-(пиперидин-1-ил)бут-2-ин-1-ил-(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17H-циклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноат (4), проявляющим высокую противоопухолевую активность *in vitro* в отношении раковых клеточных линий человека HepG2, HCT-116, SH-SY5Y, MCF-7 и A-549.



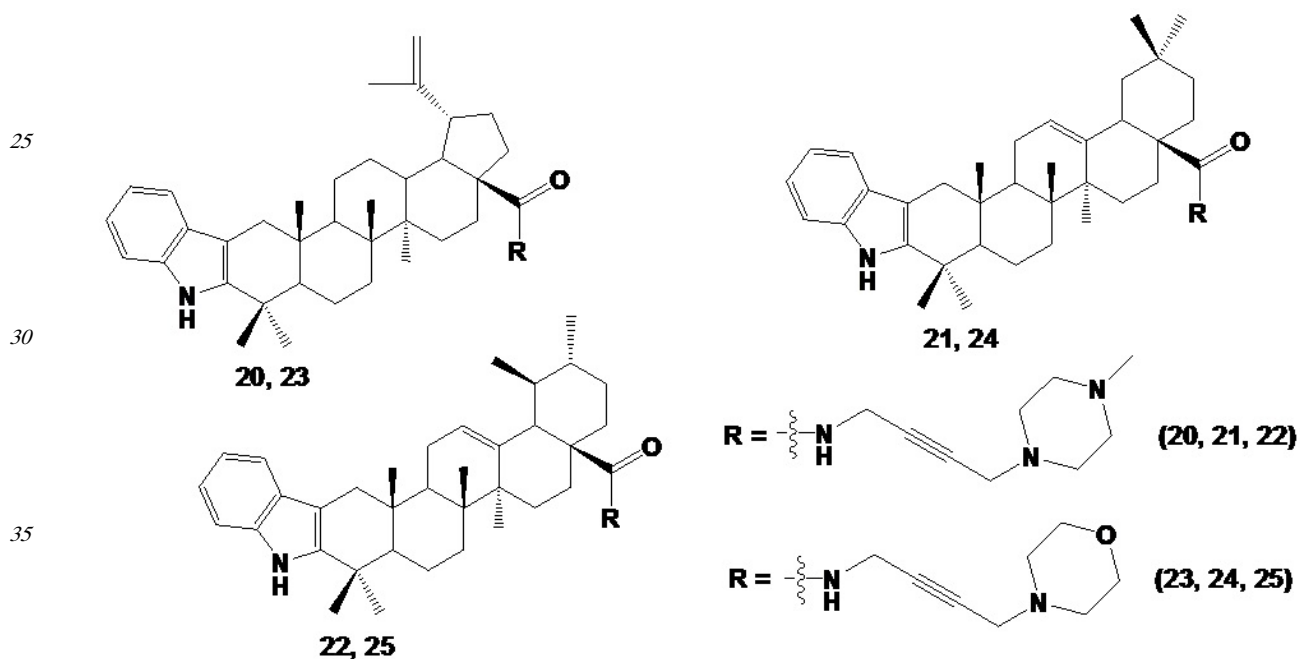
Известны основания Манниха абиетановых дитерпеноидов, содержащие в своей структуре фрагменты морфолина (5), диэтиламина (6) или пирролидина (7) (схема 1). Изучение противоопухолевой активности полученных соединений в отношении 60 клеточных линий девяти различных типов рака человека (легкие, толстая кишка, центральная нервная система, яичники, почки, предстательная железа, опухоли молочной железы, лейкемия и меланома) показало, что данные производные не проявляют цитотоксического действия в отношении протестированных линий раковых клеток [Tret'yakova E.V., Salimova E.V., Parfenova L.V. Nat. Prod. Res. 2022, 36, 79-86].

Схема 1.



Известны основания Манниха 2,3-индолтритерпеновых кислот, содержащие N-метилпиперазиновый (20-22) или морфолиновый (23-25) фрагменты в молекуле (схема 2). Изучение цитотоксичности полученных соединений в отношении 60 клеточных линий девяти различных типов опухолей человека показало, что производные (20-22) были активны в отношении лейкемии, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легкого и клеток меланомы с процентом роста от -25,3% до 29,8% [Khusnutdinova E.F., Petrova A.V., Kukovinets O.S., Kazakova O.B. Nat. Prod. Commun. 2018, 13, 665-668].

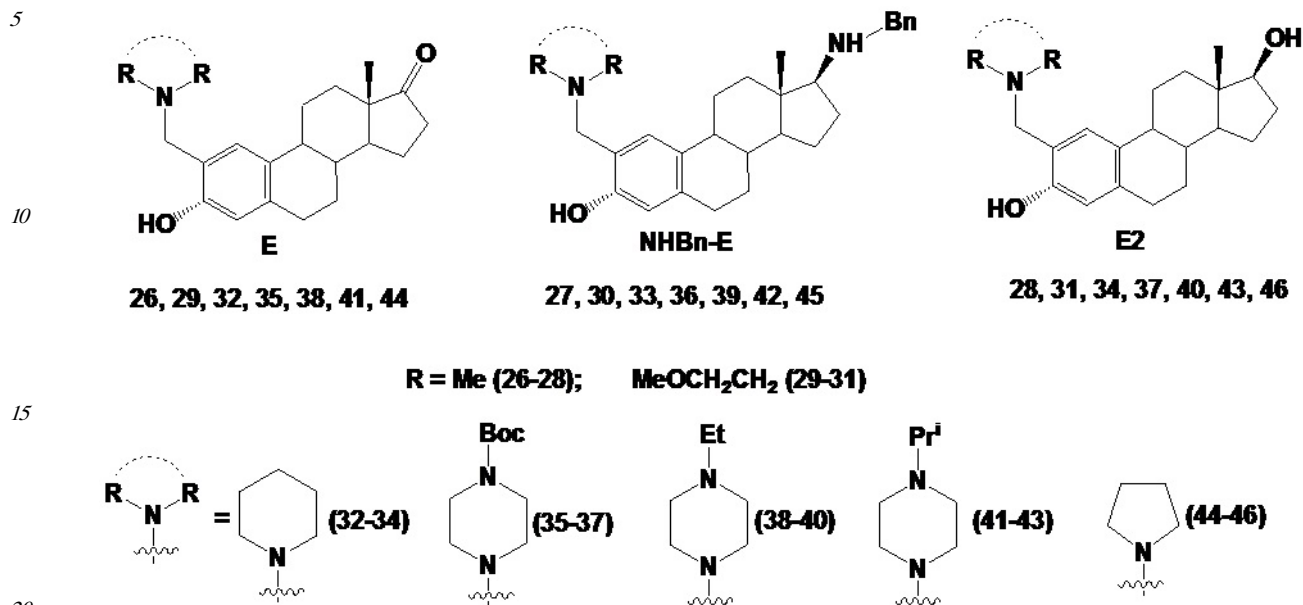
Схема 2.



Известны основания Манниха природных стероидов - эстрона (E), 17 β -аминопроизводного эстрона (NHBn-E) и эстрадиола (E2), содержащие в качестве заместителей аминотетраметиленовые фрагменты с линейными и циклическими аминами (схема 3). Изучение противоопухолевого действия полученных соединений в отношении клеточных линий карциномы шейки матки, рака яичников и молочной железы показало, что производные NHBn-E (27, 30, 33, 36, 39, 42 и 45) проявляли высокую антипролиферативную активность в отношении всех исследованных линий раковых клеток (IC₅₀ 5,27-5,94 мкМ). Аналоги E2 (28, 31, 37 и 46) ингибировали пролиферацию клеток карциномы шейки матки (IC₅₀ = 5.09 - 5.34 мкМ), в то время как производные эстрона (26, 29, 32, 35 и 44) проявляли антипролиферативное действие (IC₅₀ 4,49-4,98

мкМ) в отношении клеточных линий рака шейки матки и яичников [Molnar B., Kinyua N.I., Motyan G., Leits P., Zupko I., Minorics R., Balogh G.T., Frank E. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2022, 219, 106064-106076].

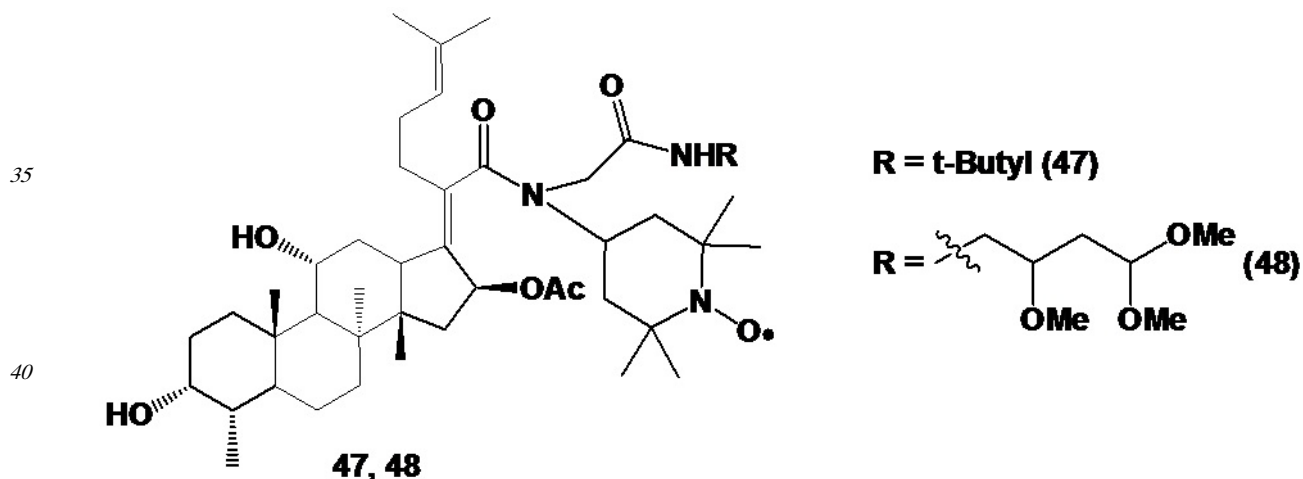
Схема 3.



Известны гетероциклические производные фузидовой кислоты (ФК) (47, 48), содержащие в качестве заместителя радикал ТЕМПО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил) в линейной части молекулы (схема 4). Изучение цитотоксического действия синтезированных соединений на клеточные линии рака предстательной железы и рака толстой кишки показало, что производные (47, 48) проявляют высокую

25 противоопухолевую активность в отношении обеих протестированных клеточных линий с IC₅₀ 6.00 мкМ и 6.98 мкМ, соответственно [Sultani H.N., Morgan I., Hussain H., Roos A.H., Haeri H.H., Kaluderovic' G.N., Hinderberger D., Westermann B. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 7125-7142].

Схема 4.



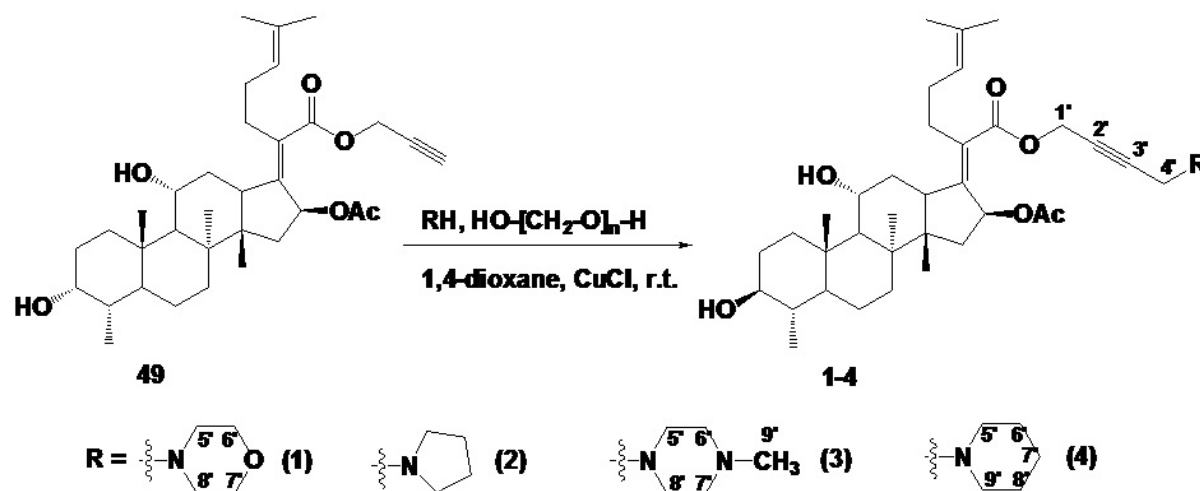
Таким образом, противоопухолевая активность гетероциклических производных фузидовой кислоты - оснований Манниха (1) - (4) в литературе не описана.

Задачей предлагаемого изобретения является изучение противоопухолевой активности in vitro 4-морфолинобут-2-ин-1-ил-(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17Н-циклопента[а]фенантрин-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноата (1), 4-(пирролидин-1-ил)бут-2-ин-1-ил-(Z)-2-(

(3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17Н-циклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноата (2), 4-(4-метилпиперазин-1-ил)бут-2-ин-1-ил-(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17Н-циклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноата (3) и 4-(пиперидин-1-ил)бут-2-ин-1-ил-(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17Н-циклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноата (4) в отношении пяти линий раковых клеток человека: гепатоцеллюлярная карцинома (HepG2), рак толстой кишки (HCT-116), нейробластома (SH-SY5Y), аденокарцинома молочной железы (MCF-7) и карцинома легких (A549).

Синтез указанных соединений осуществляли по реакции аминометилирования, описанной в [Tret'yakova E.V., Salimova E.V., Parfenova L.V. Nat. Prod. Res. 2022, 36, 79-86]. Алкин (49) вовлекали во взаимодействие с вторичными аминами (морфолином, пирролидином, N-метилпиперазином, пиперидином) и формальдегидом в среде диоксана, в присутствии CuCl в качестве катализатора. В результате аминометилирования были выделены основания Манниха (1) - (4) с выходами 75-85% (схема 5). Структуры полученных соединений установлены с помощью 1D и 2D спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C и масс-спектрометрии. Анализ спектров NOESY показал, что в условиях реакции конфигурация атома C3 кольца А изменяется с α на β .

Схема 5.



Сущность изобретения поясняется следующими примерами.

Пример 1. Смесь 1.0 ммоль (0.03 г) параформальдегида и 1.0 ммоль вторичного амина в 3 мл сухого 1,4-диоксана перемешивали 2 ч при 75°C. Затем добавляли 0.54 ммоль (0.3 г) соединения (49) и 0,1 ммоль (0,009 г) хлорида меди (I) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции (по данным ТСХ) к реакционной смеси добавляли хлороформ, а затем водный раствор аммиака. Смесь переносили в делительную воронку, разделяли, органический слой промывали водой до нейтральной реакции, сушили CaCl_2 . Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, используя в качестве элюента смесь растворителей, хлороформ: метанол (40:1).

4-Морфолинобут-2-ин-1-ил(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17Н-циклопента [а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноат (1). Белый порошок, выход 0.28 г (78%); т.пл. 85-87°C; $[\alpha]_D^{20} -1.5^\circ$ (с 0.53, CHCl_3). Спектр ЯМР ^1H (500.17 MHz, CDCl_3): 0.83 (с, 3H, CH_3 , H-18),

0.84 (д, 3H, CH₃, J 7.1 Hz, H-28), 0.90 (с, 3H, CH₃, H-19), 0.92-1.07 (м, 1H, CH₂, H-6), 0.94-1.08 (м, 1H, CH₂, H-7), 1.20 (д, 1H, CH₂, J 14.2 Hz, H-15), 1.31 (с, 3H, CH₃, H-30), 1.38-1.46 (м, 1H, CH₂, H-1), 1.40-1.51 (м, 1H, CH, H-5), 1.45-1.54 (м, 1H, CH, H-9), 1.49-1.63 (м, 1H, CH₂, H-6), 1.53 (с, 3H, CH₃, H-27), 1.56-1.71 (м, 1H, CH₂, H-7), 1.58-1.80 (м, 2H, CH₂, H-2), 1.61 (с, 3H, CH₃, H-26), 1.69-1.79 (м, 1H, CH₂, H-12), 1.71-1.80 (м, 1H, CH₂, H-1), 1.89 (с, 3H, OC(O)CH₃), 1.95-2.19 (м, 3H, CH₂, CH, H-23, H-4), 2.03-2.16 (м, 1H, CH₂, H-15), 2.23 (д, 1H, CH₂, J 10.5 Hz, H-12), 2.31-2.56 (м, 2H, CH₂, H-22), 2.45-2.56 (м, 4H, CH₂, H-5', H-8'), 2.99 (д, 1H, CH, J 11.0 Hz, H-13), 3.22-3.28 (м, 2H, CH₂, H-4'), 3.55-3.69 (м, 4H, CH₂, H-6', H-7'), 3.58-3.68 (м, 1H, CH, H-3), 4.20-4.30 (м, 1H, CH, H-11), 4.56 (д, 1H, CH₂, J 15.0 Hz, H-1'), 4.65 (д, 1H, CH₂, J 15.0 Hz, H-1'), 5.02 (т, 1H, CH, J 6.5 Hz, H-24), 5.74 (д, 1H, CH, J 7.0 Hz, H-16). Спектр ЯМР ¹³C (125.78 MHz, CDCl₃): 16.00 (C-28), 17.53 (C-18), 17.71 (C-27), 20.92 (OC(O)CH₃), 21.10 (C-6), 23.32 (C-30), 23.57 (C-19), 25.70 (C-26), 28.37 (C-23), 28.89 (C-22), 29.82 (C-1, C-2), 31.39 (C-7), 35.27 (C-4), 35.54 (C-12), 36.53 (C-10), 36.82 (C-5), 38.89 (C-15), 39.41 (C-8), 44.12 (C-13), 47.37 (C-4'), 48.56 (C-14), 49.40 (C-9), 52.04 (C-1'), 52.22 (C-5', C-8'), 66.68 (C-6', C-7'), 67.90 (C-11), 71.27 (C-3), 74.38 (C-16), 79.29 (C-2'), 81.51 (C-3'), 123.04 (C-24), 129.38 (C-20), 132.44 (C-25), 149.55 (C-17), 169.18 (C-21), 170.21 (OC(O)CH₃). Масс-спектр: m/z (I_{rel}, %): 654.440 [M+H]⁺ (100); 676.422 [M+Na]⁺ (55); 692.396 [M+K]⁺ (47).

4-(Пирролидин-1-ил)бут-2-ин-1-ил(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17H-цтклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноат (2). Светло-желтый порошок, выход 0.28 г (80%); т.пл. 93-95°C; [α]_D²⁰ -2.1° (с 1.12, CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (500.17 MHz, CDCl₃): 0.85 (д, 3H, CH₃, J 6.5 Hz, H-28), 0.86 (с, 3H, CH₃, H-18), 0.93 (с, 3H, CH₃, H-19), 0.95-1.05 (м, 1H, CH₂, H-6), 1.00-1.09 (м, 1H, CH₂, H-7), 1.23 (д, 1H, CH₂, J 14.0 Hz, H-15), 1.34 (с, 3H, CH₃, H-30), 1.39-1.47 (м, 1H, CH₂, H-1), 1.43-1.52 (м, 1H, CH, H-5), 1.46-1.54 (м, 1H, CH, H-9), 1.50-1.59 (м, 1H, CH₂, H-6), 1.56 (с, 3H, CH₃, H-27), 1.58-1.67 (м, 1H, CH₂, H-7), 1.60-1.71 (м, 1H, CH₂, H-2), 1.63 (с, 3H, CH₃, H-26), 1.70-1.79 (м, 1H, CH₂, H-12), 1.71-1.86 (м, 4H, CH₂, H-6', H-7'), 1.73-1.80 (м, 1H, CH₂, H-2), 1.92 (с, 3H, OC(O)CH₃), 1.97-2.05 (м, 1H, CH₂, H-23), 1.99-2.12 (м, 1H, CH, H-4), 2.05-2.17 (м, 1H, CH₂, H-15), 2.06-2.15 (м, 1H, CH₂, H-1), 2.07-2.18 (м, 1H, CH₂, H-23), 2.26 (д, 1H, CH₂, J 10.5 Hz, H-12), 2.33-2.51 (м, 2H, CH₂, H-22), 2.51-2.63 (м, 4H, CH₂, H-5', H-8'), 3.01 (д, 1H, CH, J 11.0 Hz, H-13), 3.37-3.44 (м, 2H, CH₂, H-4'), 3.58-3.69 (м, 1H, CH, H-3), 4.20-4.32 (м, 1H, CH, H-11), 4.57 (д, 1H, CH₂, J 15.3 Hz, H-1'), 4.69 (д, 1H, CH₂, J 15.3 Hz, H-1'), 5.04 (т, 1H, CH, J 6.5 Hz, H-24), 5.78 (д, 1H, CH, J 6.5 Hz, H-16). Спектр ЯМР ¹³C (125.78 MHz, CDCl₃): 15.99 (C-28), 17.57 (C-18), 17.71 (C-27), 20.91 (OC(O)CH₃), 21.07 (C-6), 23.41 (C-30), 23.48 (C-19), 23.72 (C-6', 7'), 25.70 (C-26), 28.38 (C-23), 28.90 (C-22), 29.87 (C-1, C-2), 31.51 (C-7), 35.37 (C-4), 35.55 (C-12), 36.59 (C-10), 36.77 (C-5), 38.91 (C-15), 39.42 (C-8), 43.10 (C-4'), 44.10 (C-13), 48.58 (C-14), 49.39 (C-9), 52.14 (C-1'), 52.43 (C-5', 8'), 67.94 (C-11), 71.28 (C-3), 74.38 (C-16), 78.25 (C-2'), 82.52 (C-3'), 123.06 (C-24), 129.49 (C-20), 132.45 (C-25), 149.44 (C-17), 169.21 (C-21), 170.22 (OC(O)CH₃). Масс-спектр: m/z (I_{rel}, %): 638.445 [M+H]⁺ (100); 660.427 [M+Na]⁺ (27); 676.402 [M+K]⁺ (27).

4-(4-Метилпиперазин-1-ил)бут-2-ин-1-ил(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17H-циклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноат (3). Светло-желтый порошок, выход 0.31 г (85%); т.пл.

108-110°C; $[\alpha]_D^{20}$ -1.8° (с 0.95, CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (500.17 MHz, CDCl₃): 0.86 (т, 3H, CH₃, J 7.3 Hz, H-28), 0.86 (с, 3H, CH₃, H-18), 0.93 (с, 3H, CH₃, H-19), 0.94-1.09 (м, 1H, CH₂, H-6), 1.02-1.10 (м, 1H, CH₂, H-7), 1.23 (д, 1H, CH₂, J 14.0 Hz, H-15), 1.33 (с, 3H, CH₃, H-30), 1.35-1.48 (м, 1H, CH₂, H-1), 1.43-1.52 (м, 1H, CH, H-5), 1.46-1.53 (м, 1H, CH, H-9), 1.48-1.64 (м, 1H, CH₂, H-6), 1.56 (с, 3H, CH₃, H-27), 1.58-1.71 (м, 1H, CH₂, H-2), 1.60-1.72 (м, 1H, CH₂, H-7), 1.63 (с, 3H, CH₃, H-26), 1.71-1.81 (м, 1H, CH₂, H-12), 1.72-1.83 (м, 1H, CH₂, H-1), 1.73-1.83 (м, 1H, CH₂, H-2), 1.92 (с, 3H, OC(O)CH₃), 1.95-2.20 (м, 2H, CH₂, H-23), 2.01-2.11 (м, 1H, CH, H-4), 2.07-2.17 (м, 1H, CH₂, H-15), 2.19-2.29 (м, 1H, CH₂, H-12), 2.26 (с, 3H, CH₃, H-9'), 2.31-2.58 (м, 2H, CH₂, H-22), 2.33-2.49 (м, 4H, CH₂, H-6', H-7'), 2.46-2.72 (м, 4H, CH₂, H-5', H-8'), 3.01 (д, 1H, CH, J 10.5 Hz, H-13), 3.24-3.35 (м, 2H, CH₂, H-4'), 3.61-3.69 (м, 1H, CH, H-3), 4.20-4.31 (м, 1H, CH, H-11), 4.57 (д, 1H, CH₂, J 14.3 Hz, H-1'), 4.67 (д, 1H, CH₂, J 14.3 Hz, H-1'), 5.05 (т, 1H, CH, J 6.5 Hz, H-24), 5.78 (д, 1H, CH, J 8.5 Hz, H-16). Спектр ЯМР ¹³C (125.78 MHz, CDCl₃): 15.99 (C-28), 17.66 (C-18), 17.74 (C-27), 20.94 (OC(O)CH₃), 20.97 (C-6), 23.28 (C-19), 23.63 (C-30), 25.71 (C-26), 28.35 (C-23), 28.90 (C-22), 29.90 (C-2), 29.98 (C-1), 31.77 (C-7), 35.56 (C-12), 35.61 (C-4), 36.61 (C-5), 36.72 (C-10), 38.92 (C-15), 39.42 (C-8), 44.09 (C-13), 45.86 (C-9'), 47.02 (C-4'), 48.60 (C-14), 49.33 (C-9), 51.79 (C-5', 8'), 52.13 (C-1'), 54.83 (C-6', 7'), 68.01 (C-11), 71.25 (C-3), 74.38 (C-16), 79.01 (C-2'), 81.92 (C-3'), 123.07 (C-24), 129.53 (C-20), 132.47 (C-25), 149.44 (C-17), 169.19 (C-21), 170.23 (OC(O)CH₃). Масс-спектр: m/z (I_{rel}, %): 667.472 [M+H]⁺ (100); 689.454 [M+Na]⁺ (11); 705.429 [M+K]⁺ (18).

4-(Пиперидин-1-ил)бут-2-ин-1-ил(Z)-2-((3S,4S,8S,10S,11R,14S,16S)-16-ацетокси-3,11-дигидрокси-4,8,10,14-тетраметилгексадекагидро-17H-циклопента[а]фенантрен-17-илиден)-6-метилгепт-5-еноат (4). Светло-желтый порошок, выход 0.26 г (75%); т.пл. 97-99°C; $[\alpha]_D^{20}$ -2.5° (с 1.21, CHCl₃). Спектр ЯМР ¹H (500.17 MHz, CDCl₃): 0.85 (т, 3H, CH₃, J 6.5 Hz, H-28), 0.85 (с, 3H, CH₃, H-18), 0.92 (с, 3H, CH₃, H-19), 0.99-1.09 (м, 1H, CH₂, H-6), 1.02-1.11 (м, 1H, CH₂, H-7), 1.18-1.26 (м, 1H, CH₂, H-15), 1.32 (с, 3H, CH₃, H-30), 1.35-1.40 (м, 2H, CH₂, H-7'), 1.39-1.47 (м, 1H, CH₂, H-1), 1.42-1.52 (м, 1H, CH, H-5), 1.50-1.55 (м, 1H, CH, H-9), 1.52-1.61 (м, 1H, CH₂, H-6), 1.53-1.59 (м, 4H, CH₂, H-6', H-8'), 1.55 (с, 3H, CH₃, H-27), 1.59-1.69 (м, 1H, CH₂, H-7), 1.62 (с, 3H, CH₃, H-26), 1.63-1.82 (м, 2H, CH₂, H-2), 1.71-1.82 (м, 1H, CH₂, H-1), 1.76 (т, 1H, CH₂, J 12.4 Hz, H-12), 1.91 (с, 3H, OC(O)CH₃), 1.93-2.16 (м, 2H, CH₂, H-23), 2.01-2.12 (м, 1H, CH, H-4), 2.07-2.17 (м, 1H, CH₂, H-15), 2.25 (д, 1H, CH₂, J 12.4 Hz, H-12), 2.32-2.47 (м, 2H, CH₂, H-22), 2.40-2.48 (м, 4H, CH₂, H-5', H-9'), 3.00 (д, 1H, CH, J 11.6 Hz, H-13), 3.21-3.28 (м, 2H, CH₂, H-4'), 3.63-3.68 (м, 1H, CH, H-3), 4.26-4.31 (м, 1H, CH, H-11), 4.57 (д, 1H, CH₂, J 15.2 Hz, H-1'), 4.68 (д, 1H, CH₂, J 15.2 Hz, H-1'), 5.04 (т, 1H, CH, J 6.4 Hz, H-24), 5.77 (д, 1H, CH, J 8.1 Hz, H-16). Спектр ЯМР ¹³C (125.78 MHz, CDCl₃): 16.00 (C-28), 17.57 (C-18), 17.72 (C-27), 20.93 (OC(O)CH₃), 21.06 (C-6), 23.46 (C-19), 23.47 (C-30), 23.68 (C-7'), 25.70 (C-26), 25.72 (C-6', 8'), 28.38 (C-23), 28.90 (C-22),

29.84 (C-1, C-2), 31.52 (C-7), 35.39 (C-4), 35.53 (C-12), 36.60 (C-10), 36.75 (C-5), 38.90 (C-15), 39.42 (C-8), 44.10 (C-13), 47.75 (C-4'), 48.58 (C-14), 49.38 (C-9), 52.16 (C-1'), 53.17 (C-5', 9'), 67.97 (C-11), 71.30 (C-3), 74.37 (C-16), 78.92 (C-2'), 82.09 (C-3'), 123.05 (C-24), 129.50 (C-20), 132.47 (C-25), 149.45 (C-17), 169.22 (C-21), 170.24 (OC(O)CH₃). Масс-спектр: m/z

(I_{rel}, %): 652.461 [M+H]⁺ (100); 674.443 [M+Na]⁺ (22); 690.418 [M+K]⁺ (32).

Контроль реакции осуществляли методом ТСХ на пластинах Sorbfil (Сорбполимер, Краснодар, Россия), проявляли 10% раствором серной кислоты. Для колоночной хроматографии использовали силикагель L (50-160 мкм) марки КСКГ. Температура

плавления определена на приборе РНМК 80/2617. Спектры ЯМР 1D (¹H, ¹³C) и 2D (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) сняты на спектрометре Bruker Avance 500 (125.78 МГц для ¹³C и 500.17 МГц для ¹H) с использованием стандартных импульсных последовательностей фирмы Bruker, внутренний стандарт Me₄Si, растворитель - CDCl₃.

Оптические углы измерены на поляриметре Perkin-Elmer 341. Масс-спектры получены на спектрометре Bruker Autoflex TM III Smartbeam с использованием матрицы 3-(4-гидрокси-3,5-диметоксифенил)проп-2-еновой кислоты (синапиновая кислота).

Пример 2. Изучение противоопухолевой активности. Клеточные линии A549 (карцинома легкого человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), SH-SY5Y (нейробластома человека), HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) и HCT116 (рак толстой кишки человека) были приобретены в Российской коллекции клеточных культур в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки A-549, MCF-7, HepG2, HCT116 и SH-SY5Y культивировали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM) (Invitrogen, США) с добавлением 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, Великобритания), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; Invitrogen, США), 50 мкг/мл сульфата гентамицина (Invitrogen, США) при 37°C в 5% CO₂ и 95% влажности. Соединения растворяли в 100% ДМСО (Sigma-Aldrich, Великобритания), получая рабочие растворы тестируемых веществ одинаковой концентрации - 100 мМ, которые разбавляли в заполненных DMEM планшетах непосредственно перед анализом. ДМСО поддерживали в конечной концентрации 0.1%.

Для анализа жизнеспособности клеток их культивировали при соответствующей плотности в 96-луночных планшетах (1.2×10⁴ клеток/лунку для A-549; 1.2×10⁴ клеток/лунку для MCF-7; 3×10⁴ клеток/лунку для SH-SY5Y; 1.5×10⁴ клеток/лунку для HepG2; 1×10⁴ клеток/лунку для HCT116) и оставляли для роста на 24 часа. После этого клетки обрабатывали соединениями (1) - (4) в конечных концентрациях 1, 10, 100 мкМ в течение 48 ч и определяли жизнеспособность клеток с помощью стандартного МТТ-анализа по инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific) измерением поглощения при 590 нм с использованием микропланшетного ридера «2300 EnSpire® Multimode Plate Reader» (Perkin-Elmer). Концентрацию соединений, подавляющих на 50% жизнеспособность клеток (значение IC₅₀), рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа (GraphPad Prism v.5.02; GraphPad Software Inc.). Жизнеспособность контрольной группы (клетки, обработанные 0.1% ДМСО) принимали за 100%, а жизнеспособность обработанных групп определяли путем сравнения ее оптической плотности с контролем. Данные были выражены как среднее ± S.E.M., рассчитанное на основе двух независимых экспериментов, проведенных в трех повторах. В аналогичных условиях обрабатывали клетки фторурацила в качестве положительного контроля для анализа МТТ. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Таблица 1. Цитотоксическая активность соединений (1)-(4) и фузидовой кислоты.

Comp.	IC ₅₀ , мкМ				
	HepG2	SH-SY5Y	MCF-7	A549	HCT-116
1	12.66±0.34	19.01±0.69	16.08±0.41	12.97±0.75	9.98±0.49
2	4.27±0.72	11.62±0.25	12.32±0.04	4.47±0.25	6.74±0.07
3	5.85±0.53	11.46±0.01	8.85±0.24	8.44±0.07	6.35±0.30
4	11.28±0.29	13.33±0.19	15.28±0.58	9.40±1.29	9.47±0.08
Fusidic acid	>100	>100	>100	>100	>100
Fluorouracil	4.31±0.3	2.56±0.46	3.32±0.28	2.29±0.08	3.48±0.76

Анализ результатов противоопухолевого скрининга показал, что производные фузидовой кислоты (1) - (4) обладали выраженной цитотоксической активностью в отношении тестируемых клеточных линий со значениями IC₅₀ в пределах 4,2 - 19 мкМ, в то время как у самой ФК такая активность отсутствовала. Как следует из табл. 1, соединения по способности ингибировать выживание клеток можно расположить в следующем порядке: (2) × (3) × (4) × (1). Среди синтезированных производных аналог ФК с пирролидинметиленовым заместителем (2) проявлял выраженную цитотоксичность по отношению к клеткам HepG2, HCT-116 и A549 со средними значениями IC₅₀ ниже 7 мкМ и близкими к значениям эталонного соединения фторурацила. Основания Манниха с фрагментами морфолина (1), N-метилпиперазина (3) и пиперидина (4) были менее эффективны, хотя все еще активны, со значениями IC₅₀ в диапазоне 5.8-19 мкМ, в зависимости от клеточной линии.

Таким образом, основания Манниха (1) - (4) продемонстрировали высокую противоопухолевую активность *in vitro* в отношении пяти линий раковых клеток человека: HepG2, HCT-116, SH-SY5Y, MCF-7 и A549.

(57) Формула изобретения

Применение оснований Манниха на основе фузидовой кислоты формулы (1) - (4) в качестве соединений, проявляющих высокую противоопухолевую активность *in vitro* в отношении пяти линий раковых клеток человека HepG2, HCT-116, SH-SY5Y, MCF-7 и A549.

