



УДК 539.26:541.632:541.69

РЕГИОСЕЛЕКТИВНЫЙ СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И ХЕМОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩАЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИКЛИЧЕСКОЙ ГИДРОКСАМОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ DL-ВАЛИНА

© 2021 г. И. В. Выстороп*, Г. В. Шилов*, А. В. Черняк*, Е. Н. Климанова*, Т. Е. Сашенкова*, С. Г. Клочков**, М. Е. Неганова**, #, Ю. Р. Александрова**, У. Ю. Аллаярова*, Д. В. Мищенко*, ***

*ФГБУН “Институт проблем химической физики” РАН,
Россия, 142432 Черноголовка, просп. академика Семенова, 1

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

*** Научно-образовательный центр “Медицинская химия” Московского государственного областного университета в г. Черноголовка, Россия, 141014 Мытищи, ул. Веры Волошиной, 24

Поступила в редакцию 10.07.2020 г.

После доработки 22.07.2020 г.

Принята к публикации 26.07.2020 г.

Реакция DL-валин-гидроксиаминовой кислоты с триацетонамином проходит как *N,N'*-региоселективная циклоконденсация с образованием (\pm)-1-гидрокси-3-изопропил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро[4,5]декан-2-она. Исследование антиметастатической и противоопухолевой активности полученной гидроксиаминовой кислоты *in vivo* методом комбинированной терапии с цитостатиком алкилирующего типа на модели экспериментальной перевиваемой меланомы В16 мышей показало способность данного соединения повышать чувствительность опухоли к действию известного противоопухолевого препарата циклофосфида, примененного в субтерапевтической дозе. Хемосенсибилизирующая активность гидроксиаминовой кислоты в комбинации с циклофосфидом привела к повышению противоопухолевого действия цитостатика почти в 2 раза, а также заметному снижению количества метастазов, что выражалось в увеличении индекса ингибирования метастазирования до 74%.

Ключевые слова: гидроксиаминовые кислоты, циклоконденсация, меланома В16, цитостатик, хемосенсибилизатор

DOI: 10.31857/S0132342321030179

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания — глобальная проблема современного общества, затрагивающая миллионы пациентов [1, 2]. На сегодняшний день злокачественные новообразования занимают второе место среди причин смертности, уступая лидирующую позицию лишь сердечно-сосудистым патологиям [3]. Так, согласно данным Всемирной организации здравоохранения, еже-

годный темп прироста онкозаболеваний составляет ~1.5%, при этом в 2018 г. было зарегистрировано более 9.6 млн смертельных случаев от онкопатологий.

Используемые в настоящее время противоопухолевые агенты характеризуются низким терапевтическим индексом и, как следствие, высоким токсическим действием не только на неопластические клетки, но и на здоровые клетки организма, что может быть связано с разнообразием патогенеза и этиологии опухолей, их развитием, симптоматикой и феноменом резистентности. Поэтому не вызывает сомнения актуальность поиска высокоэффективных малотоксичных онкопрепаратов с целью получения лекарственных средств нового поколения с различными механизмами действия.

Сокращения: ГК — гидроксиаминовая кислота; ИИМ — индекс ингибирования метастазирования; НЭП — неподеленная электронная пара; УПЖ — увеличение продолжительности жизни; DL-AlaГК — DL-аланин-гидроксиаминовая кислота; DL-ValГК — DL-валин-гидроксиаминовая кислота; GlyГК — глицин-гидроксиаминовая кислота; HDACs — гистоновые деацетилазы; LD — летальная доза; ТАА — триацетонамин.

Автор для связи: (тел.: +7 (962) 937-68-69; эл. почта: neganova83@mail.ru).

Одним из перспективных классов химических соединений с подтвержденным противоопухолевым потенциалом выступают гидроксамовые кислоты (ГК), которые обладают широким спектром биологической активности [4–6]. На сегодняшний день FDA одобрено использование трех представителей данного класса для лечения кожной и периферической Т-клеточной лимфомы и множественной миеломы [7]: вориностат (САНА, Золинза) [8], панобиностат (Фаридак) [9] и белиностат (Белеодаг) [10], что наглядно подтверждает перспективность поиска антинеопластических агентов среди гидроксамовых кислот. Анализ современных тенденций в исследованиях противоопухолевых свойств соединений этого класса при терапии онкологических заболеваний показывает, что антинеопластический потенциал гидроксамовых кислот может реализовываться по нескольким направлениям: 1) использование монотерапии, нацеленной на эффективное ингибирование гистоновых деацетилаз (HDACs) [5, 11]; 2) создание на основе ГК полифункциональных препаратов с разными фармакофорными фрагментами, воздействующими одновременно на несколько различных звеньев патологии [12, 13]; 3) применение ГК в качестве хемосенсибилизаторов при комбинированной терапии с цитостатиками [14].

Ранее было показано, что реакции глицингидроксамовой (GlyГК) и ряда других DL- α -аминогидроксамовых кислот с ацетоном в избытке кетона осуществляются как региоселективные циклоконденсации *N,N'*-типа с образованием 2,2-диметил-3-гидроксиимидазолидин-4-она (**Ia**) и его 5-замещенных производных (**Ib–e**) соответственно с умеренными выходами 55–83% [15–17].

Аналогичным способом образуются спироциклические ГК (**II**) и (**III**) на основе реакции GlyГК и DL-аланингидроксамовой кислоты (DL-AlaГК) соответственно с триацетонамином (ТАА) в этаноле с высокими выходами (70–80%) [18].

Исследование хемосенсибилизирующей противолейкозной активности циклических ГК (**II**) и

(**III**) в комбинации с цитостатиками алкилирующего типа на модели лейкоза Р388 показало способность кислот (**II**) и (**III**) усиливать действие цитостатиков, что привело к увеличению продолжительности жизни (УПЖ) животных экспериментальных групп на 30–50% [18].

В настоящей работе изучена возможность осуществления региоселективной реакции циклоконденсации пространственно затрудненной гидрофобной DL-валингидроксамовой кислоты (DL-ValГК) с ТАА с целью получения гомолога кислот (**II**) и (**III**). Для изучения взаимозависимости “структура–активность” в ряду производных 1-гидрокси-1,4,8-триазаспиро[4,5]декан-2-она проанализированы структурные особенности полученной спироциклической ГК (**IV**), а также исследованы ее спектральные данные, хемосенсибилизирующая и антиметастатическая активности в терапии экспериментальной перевиваемой меланомы В16 мышей *in vivo* с цитостатиком алкилирующего типа – циклофосфамидом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез и спектральные данные гидроксамовой кислоты (IV). Исследование реакции DL-ValГК с ТАА (схема 1) в мягких условиях (соотношение реагентов 1 : 1.3, кипячение в этаноле в течение 2 ч), аналогичных проведению реакции GlyГК и DL-AlaГК с ТАА, показало, что хотя реакция и приводит к образованию спироциклической гидроксамовой кислоты (**IV**), но исходная кислота DL-ValГК вступает в реакцию не полностью (<40%). Попытка изменения условий реакции путем увеличения продолжительности проведения реакции до 5 ч и применения 2-кратного избытка кетона приводит к почти полному расходованию DL-ValГК (до 95%). Однако реакция осложняется образованием олигомерных продуктов, что снижает выход целевого продукта (**IV**) (<45%).

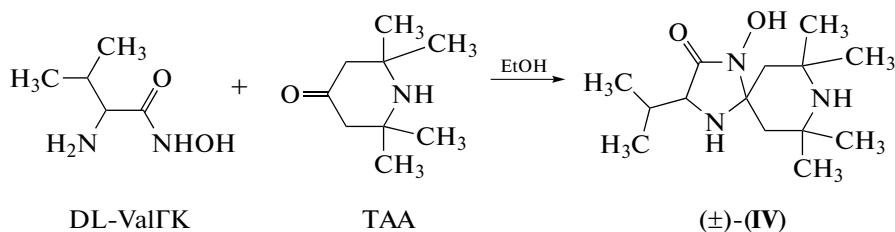


Схема 1. Синтез спироциклической гидроксамовой кислоты (IV).

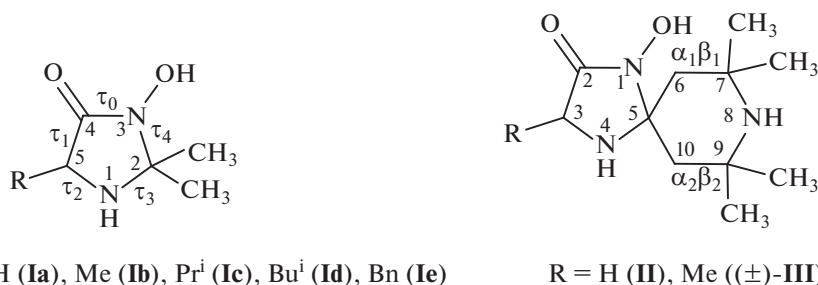


Рис. 1. 2,2-Диметил-3-гидроксиимидазолидин-4-он (**Ia**) и его 5-замещенные производные (**Ib–e**), спироциклические гидроксамовые кислоты (**II**) и (**III**).

Вероятно, причиной пониженной реакционной способности DL-ValГК служит увеличение пространственной затрудненности и понижение растворимости DL-ValГК по сравнению с GlyГК и DL-AlaГК. В условиях накопления в реакционной смеси побочного продукта – воды и отсутствия выпадения в виде осадка кислоты (**IV**) из реакционной среды это способствует смещению равновесия реакции в обратном направлении.

Поэтому были предложены более эффективные способы проведения реакции DL-ValГК с ТАА: 1) поэтапный способ – с добавлением новых порций ТАА к непрореагировавшей DL-ValГК (3–4 этапа); 2) способ дробной отгонки реакционной воды в виде тройной азеотропной смеси EtOH–бензол–H₂O с периодическим добавлением в реакционную среду абсолютированного бензола. В обоих случаях реакция проводится в мягких условиях и позволяет достичь приемлемого выхода продукта (**IV**) (64–70%).

Строение кислоты (**IV**) доказано методами масс-спектрологии высокого разрешения, ИК-, 1D- (¹H, ¹³C (с подавлением или без подавления ¹H-¹³C ССВ)) и 2D-спектрологии ЯМР (COSY ¹H-¹H и HSQC ¹H-¹³C) в растворах CDCl₃ и DMSO-*d*₆.

Уширенные полосы в области 2700–2200 см⁻¹ (ν_{max} = 2616 и 2490 см⁻¹) в ИК-спектрах (KBr) и положительные тест-реакции с FeCl₃ в MeOH подтверждают наличие OH-группы в кислоте (**IV**). Это исключает образование циклического гидроксамата (–CO–NH–OR) посредством возможной альтернативной циклоконденсации *N,O*-типа.

Согласно данным спектров ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР, кислота (**IV**) образует кристаллосольваты двух видов: 1) с MeCN и H₂O в мольном соотношении 2 : 1 : 1 соответственно (т. пл. 152–153°C (из MeCN), (**IVa**)); 2) с диоксаном в эквимольном соотношении (т. пл. 158–159°C (из диоксана), (**IVb**)), аналогично гомологам (**II**) (с MeCN в

соотношении 1 : 1) и (**III**) (с диоксаном в соотношении 2 : 1) [18].

Спектры ¹H-ЯМР обеих форм (**IVa, b**) в CDCl₃ в концентрации 10 мкМ почти идентичны и несут отличия, обусловленные присутствием сигналов сольватных растворителей δ_H 2.03 (MeCN) или δ_H 3.73 м.д. (диоксан).

Отнесение сигналов углеродов кислоты (**IV**) проведено анализом спектров HSQC ¹H-¹³C форм (**IVa**) в DMSO-*d*₆ и (**IVb**) в CDCl₃ (рис. 1). Отсутствии кросс-пиков сигналов углеродов групп NCN, β-CMe₂ и C=O с сигналами каких-либо протонов в спектрах HSQC ¹H-¹³C форм (**IVa, b**) подтверждает апротонный характер этих углеродов.

Химические сдвиги сигнала углерода NCN в спектрах ¹³C-ЯМР (δ_C 77.5 (DMSO-*d*₆, (**IVa**), 78.3 м.д. (CDCl₃, (**IVb**)), отвечающие тетраэдрическому характеру атома углерода, подтверждают спироциклическую структуру кислоты (**IV**), аналогично данным спектров для кислот (**II**) (δ_C 79.6, DMSO-*d*₆) и (**III**) (80.3, CD₃OD) [18]. С другой стороны, отсутствие сигналов тригонального углерода группы C=N в спектрах ¹³C-ЯМР (δ_C > 150 м.д.) [19] и наличие сигнала протона NH-группы имидазолидинового цикла в спектрах ¹H-ЯМР (δ_H 2.32 (DMSO-*d*₆, *c* 0.4 М, (**IVa**), 1.55 (CDCl₃, *c* 0.05 М, (**IVa, b**), 1.48 м.д. (CDCl₃, 0.25 М, (**IVb**)), аналогично данным спектров для гомологов кислот (**II**) (δ_H 3.10) и (**III**) (2.61 м.д., DMSO-*d*₆) [18], исключает структуру соответствующей ациклической азометиновой формы кислоты (**IV**) (HONH(C=O)CH(CHMe₂)N=R, где R – тетраметилпиперидиновый цикл.

Отсутствие сигналов азометиновой формы в спектрах ¹H- и ¹³C-ЯМР указывает на отсутствие медленной в шкале времени ЯМР кольчато-цепной таутомерии ГК (**IV**) в CDCl₃ и DMSO-*d*₆.

Отнесение сигнала протона NH-группы имидазолидинового цикла кислоты (**IV**) основано на сопоставлении данных спектров COSY ¹H-¹H

(наблюдаются кросс-пики и вицинальные КССВ протонов NH- и CHCO-групп) и HSQC ^1H - ^{13}C (отсутствуют кросс-пики сигнала протона NH-группы с сигналом какого-либо углерода) в растворах CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$. В спектре ^1H -ЯМР кислоты (IV) в $\text{DMSO}-d_6$ наблюдается дезэкранирующий эффект для NH-группы по сравнению со спектром в CDCl_3 .

Сигналы протонов метильных групп кислоты (IV) в спектрах ^1H -ЯМР в CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$ отнесены в соответствии со следующей зависимостью их химических сдвигов: $\delta_{\text{H}}(\text{Me}_A < \text{Me}_B < \text{Me}_C < \text{Me}_D)$. При этом наблюдается обратная последовательность величин химических сдвигов протонов ($\delta_{\text{H}}(\text{Me}_A, \text{Me}_B, 1.0\text{--}1.2) < \delta_{\text{H}}(\text{Me}_C, \text{Me}_D, 1.3\text{--}1.5 \text{ м.д.})$) и углеродов Me-групп ($\delta_{\text{C}}(\text{Me}_A, \text{Me}_B, \sim 35) > \delta_{\text{C}}(\text{Me}_C, \text{Me}_D, \sim 29 \text{ м.д.})$) пиперидинового цикла.

Известно, что сигналы ^{13}C аксиальных Me-групп резонируют в более сильном поле по сравнению с сигналами экваториальных Me-групп циклогексана (в конформации “кресло” на $\sim 4.5 \text{ м.д.}$) [20]. Это позволяет предположить для групп Me_C, Me_D и Me_A, Me_B кислоты (IV), соответственно, *a*- и *e*-ориентации при пиперидиновом цикле.

Отнесение сигналов углеродов α^1 - и α^2 -метиленовых групп пиперидинового цикла кислоты (IV) в растворах CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$ основано на следующей зависимости химических сдвигов этих сигналов: $\delta_{\alpha^2\text{-C}}(\sim 45 \text{ м.д.}) > \delta_{\alpha^1\text{-C}}(\sim 40 \text{ м.д.})$, аналогично сигналам кислоты (III) ($\delta_{\alpha^2\text{-C}} \sim 45.3 \text{ м.д.}, \delta_{\alpha^1\text{-C}} \sim 40.8 \text{ м.д.}$) в CD_3OD [18]. Для ахиральной кислоты (II) наблюдается изохронность сигналов углеродов метиленовых групп ($\delta_{\alpha^1\text{-C}}, \delta_{\alpha^2\text{-C}} 41.3 \text{ м.д.}, \text{DMSO}-d_6$) [18].

Углерод α_1 - CH_2 -группы пиперидинового цикла, вероятно, экранируется неподеленной электронной парой (НЭП) атома N1. Углероды метиленовых групп C6 и C7 находятся, соответственно, в *транс*- и *цис*-положениях к псевдо-*a*-ориентации N1N, а значит, соответственно, в *цис*- и *транс*-положениях к псевдо-*e* НЭП при атоме N1, т.е. атомы псевдо-*a*-C6 и псевдо-*e*-C7 соответствуют, вероятно, углеродам α_1 - CH_2 - и α_2 - CH_2 -групп.

Сигналы протонов АВ-систем α_1 - и α_2 -метиленовых групп пиперидинового цикла отнесены сопоставлением данных спектров COSY ^1H - ^1H и HSQC ^1H - ^{13}C . Наблюдается существенно большая разница относительного химического сдвига α_2 - CH_2 -группы ($\Delta\delta_{\text{AB}} 0.53\text{--}0.58 (\text{CDCl}_3), 0.17\text{--}0.20 \text{ м.д.} (\text{DMSO}-d_6)$) по сравнению с α_1 - CH_2 -группой ($\Delta\delta_{\text{AB}} 0.16\text{--}0.2 (\text{CDCl}_3), 0.05 \text{ м.д.} (\text{DMSO}-d_6)$) кислоты (IV). Аналогичное соотно-

шение $\Delta\delta_{\text{AB}}$ отмечается и для гомологов (II) (0.05) и (III) (0.25 и 0.07 м.д.) в $\text{DMSO}-d_6$ [18]. В растворе CDCl_3 кислоты (IV) это происходит в основном за счет дезэкранирования слабополюного протона α_2 - H_B по сравнению с протоном α_1 - H_B ($\Delta\delta(\alpha_1, \alpha_2\text{-H}_B) 0.28 \text{ м.д.}$). В то же время сильнополюные протоны α_2 - H_A и α_1 - H_B метиленовых групп показывают меньшее различие химических сдвигов их сигналов ($\Delta\delta(\alpha_1, \alpha_2\text{-H}_A) 0.09 \text{ м.д.}$). В растворе $\text{DMSO}-d_6$ наблюдается изохронность сигналов протонов α_1 - H_A и α_2 - H_A метиленовых групп кислоты (IV).

Сравнение величин $\Delta\delta_{\text{AB}}$ метиленовых групп кислоты (IV) указывает на большую конформационную подвижность α_1 - CH_2 -группы в процессе интерконверсии пиперидинового цикла, которая осуществляется, вероятно, по механизму осциллирующего псевдоповорота [19].

Интересно, что конформационная подвижность пиперидинового цикла в кислоте (IV), как и в кислотах (II) и (III) [18], выше в биполярном апротонном растворителе $\text{DMSO}-d_6$, склонном к образованию ассоциатов с молекулами растворенного в нем вещества, по сравнению с малополярным CDCl_3 .

В спектрах ^1H -ЯМР обеих форм (IVa, b) в CDCl_3 наблюдается дальняя КССВ $^4J_{\text{H,H}} 1.6 \text{ Гц}$ (*c* 0.25 М), 2.0 Гц (*c* 0.05 М) между сильнополюными протонами α_1 - H_A и α_2 - H_A метиленовых групп. Это возможно при экваториальной ориентации этих протонов в конформации “кресло” пиперидинового цикла, поскольку реализуется *транс*-W-конфигурация разделяющих их связей, тогда как для слабополюных протонов α_1 - H_B и α_2 - H_B этих групп аксиальной ориентации реализуется *цис*-конфигурация разделяющих их связей, при которой не должно наблюдаться заметной $^4J_{\text{H,H}}$.

Приписывание сильнополюным (H_A) и слабополюным (H_B) протонам α -метиленовых групп пиперидинового цикла кислоты (IV) в спектрах ^1H -ЯМР в CDCl_3 , соответственно, экваториальной и аксиальной ориентаций подтверждается анализом спектров ^1H -ЯМР в CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$ аналогичных циклических ГК [20], имеющих незамещенные α - и β -метиленовые группы пиперидинового цикла. Согласно характеру вицинальных взаимодействий протонов этих групп, для слабополюных протонов α - H_B и β - H_B , в отличие от сильнополюных протонов α - H_A и β - H_A , наблюдается большая КССВ ($^3J(\alpha\text{-H}_B, \beta\text{-H}_B) \geq 10 \text{ Гц}$), что возможно только для аксиальных протонов *транс*-ориентации в преимущественной конформации “кресло” пиперидинового цикла [21, 22].

Наблюдаемые в спектрах ^1H -ЯМР (**IVa, b**) КССВ протона группы $\text{C}=\text{O}$ с протонами $\text{C}(\text{H})\text{Me}_2$ ($^3J(\text{C}(\text{HCO}), \text{C}(\text{H})\text{Me}_2)$ 4.8–4.9 (CDCl_3), 6.3–6.5 Гц ($\text{DMSO}-d_6$)) и NH -групп ($^3J(\text{C}(\text{HCO}), \text{NH})$ 10.2–10.3 (c 0.05 M, CDCl_3), 9.9 (c 0.25 M, CDCl_3), 10.7 Гц ($\text{DMSO}-d_6$)) свидетельствует, соответственно, о взаимной *цис*- и *транс*-ориентации этих протонов, т.е. конформационной однородности имидазолидинового цикла в растворе сильно различающихся по полярности растворителей.

Острая токсичность гидроксамовой кислоты (IV) in vivo. При изучении острой токсичности на мышах-гибридах линии BDF_1 показано, что при однократном внутрибрюшинном введении соединения (**IV**) гибель животных отмечалась на 1-е и 2-е сутки наблюдения после инъекции раствора гидроксамовой кислоты в дозе 500–900 мг/кг. У выживших животных каких-либо клинических проявлений интоксикации и изменений в поведенческих реакциях не наблюдалось до конца опыта. На рис. 2 представлена кривая нарастания токсичности гидроксамовой кислоты (**IV**) по мере увеличения дозы, исходя из которой была определена величина $\text{LD}_{50} = 730.4 \pm 32.4$ мг/кг, а также были рассчитаны токсические дозы: $\text{LD}_{16} = 639.7$; $\text{LD}_{84} = 833.9$ и $\text{LD}_{100} = 885.7$ мг/кг.

Результаты исследования острой токсичности позволяют отнести соединение (**IV**) к III классу токсичности, т.е. данная гидроксамовая кислота — умеренно токсичное соединение в соответствии с ГОСТ 12.1.007–76.

Хемосенсибилизирующая противоопухолевая активность кислоты (IV) in vivo. Для оценки хемосенсибилизирующего противоопухолевого и антиметастатического действия гидроксамовой кислоты (**IV**) на модели экспериментальной перевиваемой меланомы B16 на самцах мышей-гибридов линии BDF_1 для внутрибрюшинного введения была взята одна третья часть от величины

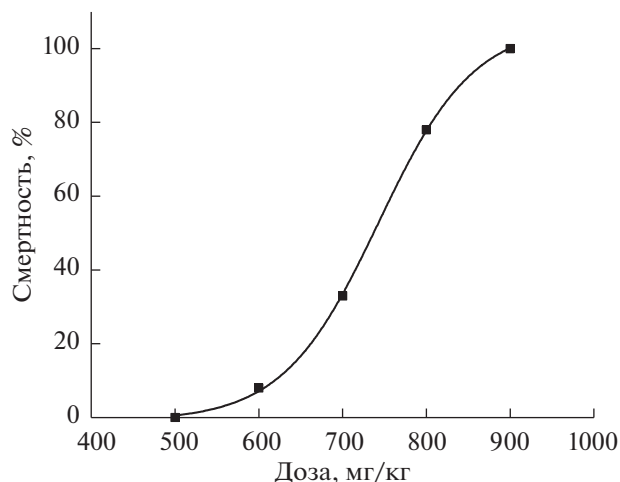


Рис. 2. Кривая зависимости “доза–эффект” для определения параметров острой токсичности после однократного внутрибрюшинного введения раствора гидроксамовой кислоты (**IV**) мышам-гибридам линии BDF_1 .

LD_{50} , которая составила 233 мг/кг. При монотерапии гидроксамовой кислотой и цитостатиком было выявлено достоверное увеличение индекса ингибирования метастазирования (ИИМ) — до 12.82 и 38.46% соответственно. При применении комбинированной химиотерапии циклофосфамидом с исследуемым соединением (**IV**) наблюдалось двукратное увеличение данного показателя по сравнению с группой циклофосфамид (до 74.36%) и появление эффекта усиления противоопухолевого действия известного цитостатика, что может свидетельствовать о проявлении данной ГК адьювантной способности. Терапия меланомы B16 низкотоксичной кислотой (**IV**) в комбинации с циклофосфамидом позволила достичь торможения роста опухоли животных экспериментальных групп до 31.56%, что более чем в 1.5 раза выше данного показателя при монотера-

Таблица 1. Хемосенсибилизирующий эффект кислоты (**IV**) на модели экспериментальной перевиваемой меланомы B16 мышей

Препарат	Разовая доза, мг/кг	Режим введения, сут	Среднее количество метастаз	Индекс ингибирования метастазирования, %	Средний вес опухоли, г	Торможение роста опухоли, %
Циклофосфамид (IV)	20	2, 7	$6.00 \pm 1.39^*$	38.46	7.95 ± 1.34	20.26
Циклофосфамид + (IV)	233	2–9	8.50 ± 1.70	12.82	9.71 ± 0.59	2.62
Циклофосфамид + (IV)	20 + 233	2, 7 + 2–9	$2.50 \pm 1.11^{***}$	74.36	$6.83 \pm 1.22^{**}$	31.56
Контроль	—	—	9.75 ± 2.05	—	9.97 ± 1.34	—

* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$ (достоверность отличий относительно контроля).

пии циклофосфамидом (табл. 1). Ранее нами также было показано усиление противолейкозного действия циклофосфамида в комбинированной терапии лимфолейкоза P388, которое выражалось в увеличении выживаемости животных до 38% и увеличении средней продолжительности жизни невылеченных животных почти в 2 раза по сравнению с монотерапией данным цитостатиком [23].

Введение разветвленной изопропильной группы при имидазолидиновом цикле приводит к значительному повышению хемосенсибилизирующей способности кислоты валинового ряда (IV) по сравнению с ее гомологами глицинового (II) и аланинового ряда (III), активность которых была описана нами ранее [21]. Наибольшее отличие в хемосенсибилизирующей активности наблюдается при совместном действии кислоты (IV) и циклофосфамида (ИИМ ~74%, УПЖ >280% [23]).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез гидроксамовой кислоты (IV). ИК-спектры образцов соединений, запрессованных в таблетки с KBr, регистрировали на спектрометре Specord-82M (Analytik Jena, Германия) в области 400–4000 см⁻¹. Масс-спектры высокого разрешения снимали на квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре Sciex QStar (SCIEX, США) с ортогональным вводом ионов и на масс-спектрометре Thermo Fisher Exactive (Thermo Fisher Scientific, США) с источником ионизации электро-распылением и масс-анализатором Orbitrap. Для ионизации были взяты растворы исходных веществ в ацетонитриле с концентрацией ~10 мкМ. При расчете молекулярных масс использовали следующие величины атомных масс: Н – 1.007825, О – 15.994915, С – 12.000000, N – 14.003074. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance III-500 (Bruker, Германия) с частотой 500.20 МГц (¹Н) и 125.775 МГц (¹³С). Химические сдвиги ядер ¹Н и ¹³С определяли относительно остаточных сигналов растворителя (δ, м.д., 2.50 и 39.52 для DMSO-*d*₆, 7.26 и 77.16 для CDCl₃ соответственно). Температуры плавления определяли на микронагревательном столике Boetius RNMK (Boetius, Германия). Элементный анализ (С, Н, N) выполняли на микроанализаторе Vario MicroCube Elementar (Elementar, Германия). DL-ValГК ((*R,S*)-2-амино-3-метилбутирогидроксамовая кислота, (*R,S*)-*N*-гидроксиамид-2-амино-3-метилмасляной кислоты) синтезировали по известной методике [24].

1-Гидрокси-3-изопропил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро[4,5]декан-2-он (IV). Масс-

спектр (ESI), *m/z*: 270.2192 (M + H)⁺. C₁₄H₂₇N₃O₂. Вычислено: 270.2176 (M + H)⁺.

Гидроксамовая кислота (IVa). Спектр ¹Н-ЯМР (CDCl₃, *c* 0.05 М, δ, м.д., *J*, Гц): 0.96 (д, 3Н, СНMe_A, ³*J* 6.9), 1.06 (д, 3Н, СНMe_B, ³*J* 6.9), 1.20 (с, 3Н, β-Me_A), 1.23 (с, 3Н, β-Me_B), 1.44 (с, 3Н, β-Me_C), 1.46 (с, 3Н, β-Me_D), 1.46 (д.д, 1Н, α₂-H_A, ²*J* 13.9, ⁴*J*_{α1-HA} 2.0), 1.55 (д.д, 2Н, NH + α₁-H_A, *J* 13.6, *J* 2.0), 1.71 (д, 1Н, α₁-H_B, ²*J* 13.6), 1.99 (д, 1Н, α₂-H_B, ²*J* 13.9), 2.03 (с, 1.5 Н, MeCN), 2.10 (д. гепт, 1Н, СНMe₂, ³*J*_{Me} 6.9, ³*J*_{CHCO} 4.8), 3.33 (д.д, 1Н, CHCO, ³*J*_{NH} 10.2, ³*J*_{CHMe2} 4.8), 4.96 (уш. с, 2Н, 0.5H₂O + NOH).

Спектр ¹Н-ЯМР (DMSO-*d*₆, *c* 0.4 М, δ, м.д., *J*, Гц): 0.93 (д, 3Н, СНMe_A, ³*J* 6.6), 1.02 (д, 3Н, СНMe_B, ³*J* 6.7), 1.05 (с, 3Н, β-Me_A), 1.06 (с, 3Н, β-Me_B), 1.34 (с, 3Н, β-Me_C), 1.35 (с, 3Н, β-Me_D), 1.42 (уш. д, 2Н, α₁-H_A + α₂-H_A, ²*J* 13.3), 1.47 (д, 1Н, α₁-H_B, ²*J* 13.3), 1.62 (д.д, 1Н, α₂-H_B, ²*J* 13.5, *J* 2.4), 1.90 (д. гепт, 1Н, СНMe₂, ³*J*_{Me} 6.9, ³*J*_{CHCO} 6.5), 2.08 (с, 1.5Н, 0.5 MeCN), 2.32 (уш. д, 1Н, NH, ³*J*_{CHCO} 10.7), 3.07 (д.д, 1Н, CHCO, ³*J*_{NH} 10.7, ³*J*_{CHMe2} 6.3), 3.71 (уш. с, H₂O + NOH).

Спектр ¹³С-ЯМР (DMSO-*d*₆, *c* 0.4 М, δ, м.д., *J*, Гц): 1.42 (к, 0.5С, MeCN, ¹*J* 135.8), 18.67 (к.м, 1С, СНMe_A, ¹*J* 125.8), 18.95 (к.м, 1С, СНMe_B, ¹*J* 125.8), 29.15 (к.м, 1С, β-Me, ¹*J* 125.8), 29.27 (д.м, 1С, СНMe₂, ¹*J* 127.0), 29.34 (к.м, 1С, β-Me, ¹*J* 125.8), 35.25 (к.м, 1С, β-Me, ¹*J* 125.8), 35.35 (к.м, 1С, β-Me, ¹*J* 125.8), 39.69 (т, 1С, α₁-CH₂, ¹*J* 127.0), 44.19 (т, 1С, α₂-CH₂, ¹*J* 127.0), 50.11 (м, 1С, β-CMe₂), 50.20 (м, 1С, β-CMe₂), 59.88 (д, 1С, CHCO, ¹*J* 139.6), 77.45 (м, 1С, NCN), 118.06 (к, 0.5С, MeCN, ²*J* 10.1), 171.27 (д.д, 1С, C=O, *J* 3.8, *J* 2.5).

Гидроксамовая кислота (IVb). Спектр ¹Н-ЯМР (CDCl₃, *c* 0.05 М, δ, м.д., ³*J*, Гц): 0.97 (д, 3Н, СНMe_A, ³*J* 6.9), 1.07 (д, 3Н, СНMe_B, ³*J* 6.9), 1.20 (с, 3Н, β-Me_A), 1.23 (с, 3Н, β-Me_B), 1.44 (с, 3Н, β-Me_C), 1.46 (с, 3Н, β-Me_D), 1.47 (д.д, 1Н, α₂-H_A, ²*J* 13.9, ⁴*J*_{α2-HA} 2.0), 1.55 (д.д, 2Н, NH + α₁-H_A, *J* 13.4, *J* 2.0), 1.69 (д, 1Н, α₁-H_B, ²*J* 13.7), 1.97 (д, 1Н, α₂-H_B, ²*J* 14.0), 2.12 (д. гепт, 1Н, СНMe₂, ³*J*_{Me} 6.9, ³*J*_{CHCO} 4.9), 3.35 (д.д, 1Н, CHCO, ³*J*_{NH} 10.3, ³*J*_{CHMe2} 4.9), 3.73 (с, 8Н, диоксан).

Спектр ¹Н-ЯМР (CDCl₃, *c* 0.25 М, δ, м.д., ³*J*, Гц): 0.88 (д, 3Н, СНMe_A, ³*J* 6.9), 0.99 (д, 3Н, СНMe_B, ³*J* 6.9), 1.15 (с, 3Н, β-Me_A), 1.17 (с, 3Н, β-Me_B), 1.38 (д.д, 1Н, α₂-H_A, ²*J* 13.9, ⁴*J*_{α2-HA} 1.6), 1.39 (с, 3Н, β-Me_C),

1.41 (с, 3H, β -Me_D), 1.48 (д.д, 2H, NH + α_1 -H_A, J 13.5, J 1.6), 1.68 (д, 1H, α_1 -H_B, 2J 13.5), 1.96 (д, 1H, α_2 -H_B, 2J 13.9), 2.04 (д. гепт, 1H, CHMe₂, $^3J_{Me}$ 6.9, $^3J_{CHCO}$ 4.8), 3.24 (д.д, 1H, CHCO, $^3J_{NH}$ 9.9, $^3J_{CHMe_2}$ 4.8), 3.65 (с, 8H, диоксан), 6.06 (уш.с, 1H, NOH).

Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl₃, с 0.25 М, δ , м.д., 3J , Гц): 17.66 (1C, CHMe_A), 18.88 (1C, CHMe_B), 28.46 (1C, β -Me_D), 28.74 (1C, β -Me_C), 28.94 (1C, CHMe₂), 35.04 (1C, β -Me_B), 35.23 (1C, β -Me_A), 40.68 (1C, α_1 -CH₂), 45.63 (1C, α_2 -CH₂), 51.15 (2C, β -CMe₂), 60.71 (1C, CHCO), 67.07 (4C, диоксан), 78.34 (1C, NCN), 170.91 (1C, C=O).

Острая токсичность гидроксамовой кислоты (IV). Острую токсичность (LD₅₀) определяли на мышах-гибридах BDF₁, полученных из УНУ Питомник и виварий ФГБУН “Институт проблем химической физики” РАН, при однократном внутрибрюшинном введении водных растворов кислоты (IV) по методу, описанному в работе [25]. Исследования острой токсичности соединения (IV) проводили в соответствии с ГОСТ ISO 10993-11-2011. В качестве тест-объекта использовали самцов мышей-гибридов линии BDF₁ весом 21–24 г ($n = 30$). Животных содержали в соответствии с методическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных в вивариях со свободным доступом к воде и пище. В каждую опытную группу рандомизированно распределяли по шесть особей с использованием в качестве основного критерия массу тела так, чтобы различия в данном параметре между особями не превышали 20%. Соединения вводили животным однократно внутрибрюшинно в виде водного раствора в диапазоне доз 500–900 мг/кг массы тела животного. Для учета гибели и оценки общего клинического состояния мышей наблюдения за животными проводили непрерывно в течение первых 30 мин после введения вещества, затем с интервалом 1 ч в течение 4 ч и далее ежедневно один раз в день. Общий срок наблюдения составил 14 сут. Для определения токсических доз строили кривую нарастания токсичности по мере увеличения дозы. Расчет доз LD₁₆, LD₅₀, LD₈₄ и LD₁₀₀ проводили с использованием метода пробит-анализа.

Хемосенсибилизирующая активность гидроксамовой кислоты (IV). Исследование хемосенсибилизирующей активности гидроксамовой кислоты (IV) проводили на модели экспериментальной перевиваемой меланомы В16 на самцах мышей-гибридов линии BDF₁ весом 22–24 г ($n = 32$), полученных из УНУ Питомник и виварий ФГБУН “Институт проблем химической физики” РАН. Мышей содержали в клетках со свободным доступом к воде и пище. Опухоли трансплантировали

подкожно (инокулум измельченной опухолевой ткани в изотоническом растворе NaCl 1 : 5 в объеме 0.2 мл). Противоопухолевый цитостатик циклофосфамид (в субтерапевтической дозе) и соединение (IV) вводили в виде водных растворов внутрибрюшинно. Дозы и режимы введения (сутки после трансплантации опухоли) указаны в табл. 1. Отдельная группа животных-опухолосителей, получавшая вместо инъекций препаратов растворитель, служила контролем. Каждая группа содержала восемь мышей. Наблюдение за животными проводили ежедневно в течение 24 сут, после чего мышей выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков, извлекали внутренние органы, проводили взвешивание опухоли и подсчет метастазов в легких. Антиметастатическую активность соединений определяли по изменению индекса ингибирования метастазирования (ИИМ) по формуле:

$$\text{ИИМ}(\%) = \frac{((A_k \times B_k) - (A_o \times B_o))}{(A_k \times B_k)} \times 100,$$

где A_o и A_k – частота метастазирования в опытной и контрольной группах соответственно; B_o и B_k – среднее число метастазов в опытной и контрольной группах животных соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было показано, что реакция DL-валингидроксамовой кислоты с триацетонамином проходит как N,N' -региоселективная циклоконденсация с образованием (\pm)-1-гидрокси-3-изопропил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триаза Spiro[4,5]декан-2-она. В ходе исследования антиметастатической и противоопухолевой активности синтезированной циклической гидроксамовой кислоты (IV) была обнаружена ее способность повышать чувствительность экспериментальной перевиваемой меланомы В16 мышей к действию циклофосфамида (известного цитостатика алкилирующего действия, использованного в субтерапевтической дозе), проявляя тем самым хемосенсибилизирующие свойства. Было показано значительное снижение количества метастазов, а также торможение роста опухоли у животных экспериментальной группы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности синтеза циклических гидроксамовых кислот на основе DL-валина в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Аналитического центра коллективного пользования ФГБУН “Институт проблем химической физики” РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-10195) и в рамках государственного задания № АААА-А19-119071890015-6.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с решениями Комиссий по биоэтике ФГБУН «Институт проблем химической физики» РАН и ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Torre L.A., Bray F, Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2015. V. 65. P. 87–108.
<https://doi.org/10.3322/caac.21262>
2. Torre L.A., Siegel R.L., Jemal A. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 893. P. 1–19.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_1
3. Harding M.C., Sloan C.D., Merrill R.M., Harding T.M., Thacker B.J., Thacker E.L. // *Prev. Chronic Dis.* 2018. V. 15. P. 180151.
<https://doi.org/10.5888/pcd15.180151external icon>
4. Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D. // *Med. Res. Rev.* 2012. V. 32. P. 1–165.
<https://doi.org/10.1002/med.20200>
5. Manal M., Chandrasekar M.J.N., Gomathi Priya J., Nanjan M.J. // *Bioorg. Chem.* 2016. V. 67. P. 18–42.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.05.005>
6. Вартамян А.А., Хоченков Д.А., Хоченкова Ю.А., Мачкова Ю.С., Хачатрян Д.С., Колотаев А.В., Балаев А.Н., Охманович К.А., Осипов В.Н. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 207–219. [Vartanyan A.A., Khochenkov D.A., Khochenkova Yu.A., Markova Yu.S., Khachatryan D.S., Korotaev A.V., Balaev A.N., Okhmanovich K.A., Osipov V.N. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 252–263.]
<https://doi.org/10.1134/S106816202002017X>
7. Shah R.R. // *Drug Saf.* 2019. V. 42. P. 235–245.
8. Duvi M., Talpur R., Ni X., Zhang Ch., Hazarika P., Kelly C., Chiao J.H., Reilly J.F., Ricker J.L., Richon V.M., Frankel S.R. // *Blood.* 2007. V. 109. P. 31–39.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-025999>
9. Atadja P. // *Cancer Lett.* 2009. V. 280. P. 233–241.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.019>
10. Sawas A., Radeski D., O'Connor O.A. // *Ther. Adv. Hematol.* 2015. V. 6. P. 202–208.
<https://doi.org/10.1177/2040620715592567>
11. Qin H.-T., Li H.-Q., Liu F. // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2016. V. 27. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1276565>
12. Rajulu G.G., Naik H.S.B., Viswanadhan A., Thiruvengadam J., Rajesh K., Ganesh S., Jagadheshan H., Kesavan P.K. // *Chem. Pharm. Bull.* 2014. V. 62. P. 168–175.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c13-00797>
13. Zhang X., Zhang J., Tong L., Luo Yu., Su M., Zang Y., Li J., Lu W., Chen Y. // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21. P. 3240–3244.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.049>
14. Rikiishi H., Shinohara F., Sato T., Sato Y., Suzuki M., Echigo S. // *Int. J. Oncol.* 2007. V. 30. P. 1181–1188.
15. Vystorop I.V., Lyssenko K.A., Kostyanovsky R.G. // *Mendeleev Commun.* 2002. V. 12. P. 85–87.
<https://doi.org/10.1070/MC2002v012n03ABEH001603>
16. Vystorop I.V., Aliev Z.G., Andreeva N.Yu., Atovmyan L.O., Fedorov B.S. // *Russ. Chem. Bull.*, 2000. V. 49. P. 182–183.
<https://doi.org/10.1070/MC2002v012n03ABEH001603>
17. Vystorop I.V., Nelyubina Yu.V., Voznesensky V.N., Sun W.-H., Lodygina V.P., Lyssenko K.A., Kostyanovsky R.G. // *Mendeleev Commun.* 2010. V. 20. P. 106–108.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2010.03.014>
18. Vystorop I.V., Konovalova N.P., Nelyubina Yu.V., Varfolomeev V.N., Fedorov B.S., Sashenkova T.E., Berseneva E.N., Lyssenko K.A., Kostyanovsky R.G. // *Russ. Chem. Bull.* 2010. V. 59. P. 127–135.
<https://doi.org/10.1007/s11172-010-0055-x>
19. Hogradi M. // *Akademiai Kiado, Budapest, chapter 1.2.3, 1981.*
20. Williams D.H., Fleming I. // *Stereochemistry. Basic Concept and Applications / Akademiai Kiado, Budapest, chapter 1.2.3, 1981.*
21. Vystorop I.V., Konovalova N.P., Nelyubina Yu.V., Chernyak A.V., Sashenkova T.E., Klimanova E.N., Utiyshchev A.N., Fedorov B.S., Shilov G.V., Kostyanovsky R.G. // *Russ. Chem. Bull.* 2013. V. 62. P. 1272–1281.
<https://doi.org/10.1007/s11172-013-0176-0>
22. Vystorop I.V., Konovalova N.P., Sashenkova T.E., Berseneva E.N., Chernyak A.V., Fedorov B.S., Kostyanovsky R.G. // *Mendeleev Commun.* 2011. V. 21. P. 239–241.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2011.09.002>
23. Mishchenko D.V., Neganova M.E., Klimanova E. N., Sashenkova T. E., Klochkov S.G., Shevtsova E.F., Vystorop I.V., Tarasov V.V., Chubarev V.N., Samsonova A.N., Ashraf G.Md., Barreto G., Yarla N.S., Aliev G. // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2018. V. 18. P. 365–371.
<https://doi.org/10.2174/1568009617666170623104030>
24. Gunningham K.G., Newbold G.T., Spring F.S., Stark J. // *Chem. Soc.* 1949. P. 2091.
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

Regioselective Synthesis, Structure and Chemosensitizing Antitumor Activity of Cyclic Hydroxamic Acid Based on DL-Valine

I. V. Vystorop*, G. V. Shilov*, A. V. Chernyak*, E. N. Klimanova*, T. E. Sashenkova*, S. G. Klochkov**, M. E. Neganova**.#, Yu. R. Aleksandrova**, U. Yu. Allayarova*, and D. V. Mishchenko*, ***

Phone: +7 (962) 937-68-69; e-mail: neganova83@mail.ru

*Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, prosp. acad. Semenova 1, Chernogolovka, 142432 Russia

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

***Scientific and Educational Center "Medical Chemistry" of Moscow Region State University in Chernogolovka, ul. Very Voloshinoy 24, Mytishi, 141014 Russia

The reaction of DL-valine hydroxamic acid with triacetonamine passes as N,N' -regioselective cyclocondensation to form (\pm)-1-hydroxy-3-isopropyl-7,7,9,9-tetramethyl-1,4,8-triazaspiro[4,5]decan-2-one. *In vivo* study of chemosensitizing antimetastatic and antitumor activity of the obtained hydroxamic acid by the combination therapy with cytostatic of alkylating type in the experimental transplanted tumor models of mouse melanoma B16 showed the ability of this compound to increase the sensitivity of the tumor to the action of the well-known antitumor drug cyclophosphamide applied at sub-therapeutic dose. Chemosensitizing activity of hydroxamic acid in combination with the cyclophosphamide allowed us to achieve an increase the antitumor activity of cytostatic by almost two times, as well as a noticeable decrease in the number of metastases, which is expressed in an increase in the metastasis inhibition index to 74%.

Keywords: hydroxamic acids, cyclocondensation, melanoma B16, cytostatics, chemosensitizers