К 85-летнему юбилею академика РАН А.И. Коновалова

УДК 547.913.6

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 1,1-АЛКИЛЕНДИФОСФОНАТОВ ДИТЕРПЕНОИДА ИЗОСТЕВИОЛА

© 2019 г. И. Ю. Стробыкина, А. В. Немтарев, Б. Ф. Гарифуллин, А. Д. Волошина, А. С. Сапунова, В. Е. Катаев*

ФГБУН Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН, 420029, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Академика Арбузова 8 *e-mail: kataev@iopc.ru

> Поступила в редакцию 3 декабря 2018 г. После доработки 4 декабря 2018 г. Принята к публикации 5 декабря 2018 г.

Реакцией алкиленбромидов дитерпеноида изостевиола с тетраэтилметиленбисфосфонатом синтезированы соответствующие дифосфоновые кислоты, конъюгированные к дитерпеноидному каркасу полиметиленовым спейсером. Одно из синтезированных соединений проявило высокую (МИК 3.9 мкг/мл) антимикробную активность в отношении *S.aureus* и высокую (IC₅₀ 15–18 мкМ) цитотоксичность в отношении раковых линий клеток человека M-Hela и MCF-7.

Ключевые слова: Изостевиол, фосфонаты, фосфоновые кислоты, антимикробная активность, цитотоксичность.

DOI: 10.1134/S051474921901004X

Синтез новых алкилендифосфоновых кислот – аналогов неорганических пирофосфатов является актуальным ввиду их потенциальной биологической активности. Дифосфонаты используются для лечения костных заболеваний, таких как остеопороз и болезнь Педжета [1–3]. В литературе описано их антибактериальное [4], противовоспалительное [5, 6] и противоопухолевое действие [7, 8]. Фосфонаты и дифосфонаты зачастую целенаправленно синтезируются в качестве потенциальных ингибиторов фарнезилпротеинтрансферазы и NS5B полимеразы [9, 10]. Свойство метилендифосфонатной группы эффективно связываться с ионами Ca²⁺ и Mg²⁺ используется для направленного синтеза физиологически активных соединений [11].

В недавно опубликованном обзоре [12], посвященном синтезу и биологической активности производных природного дитерпеноида изостевиола (16-оксо-энт-бейеран-19-овая кислота) 1, описано только два типа его производных с фосфорсодержащими заместителями, а именно, трифенилфосфониевые соли 2 [13], проявляющие антимитотическое и кардиопротекторное действие, и конъюгаты изостевиола с димефосфоном 3, показавшие высокую антитуберкулезную активность, характеризуемую значениями МИК 5-10 мкг/мл [14]. В обзоре [12] не упомянуты гидрофосфорильные производные изостевиола 4 [15, 16], кетофосфонаты изостевиола 5 [17], а также фосфаты изостевиола 6 [18], продемонстрировавшие умеренную цитотоксическую активность в отношении раковых линий клеток человека M-Hela, MCF-7, характеризуемую величинами IC₅₀ 40-72 мкМ.



С целью проследить влияние на биологическую активность производных изостевиола природы фосфорсодержащего заместителя, в настоящей работе сообщается о синтезе и биологической активности 1,1-алкилендифосфонатов, в которых дифосфонатная группировка конъюгирована к дитерпеноидному каркасу полиметиленовым спейсером такой же протяженности, как и у ранее изученных [18] фосфатов изостевиола.

Синтез 1,1-алкилендифосфонатов изостевиола 7–9 представлен на схеме 1. Сначала по известной методике [13] кипячением изостевиола 1 в CH₃CN с двухкратным избытком дибромалканов в присутствии K₂CO₃ были получены алкиленбромиды изостевиола 7а–7с. Далее алкилированием тетраэтилметилендифосфоната бромидами 7а–7с в щелочной среде были синтезированы тетраэтилдифосфонаты 8а–8с. Реакцию проводили по модифицированной методике [19], добавляя к к раствору тетраметилендифосфоната в сухом ДМФА при 0°C сначала NaH, а затем алкиленбромиды изостевиола 7а–7с.

Тетраэтилдифосфонатные производные изостевиола **8а–8с** выделяли колоночной хроматографией в виде прозрачных смол с выходами 23–29%. В масс-спектрах МАЛДИ соединений **8а–8с** наблюдались пики молекулярных ионов $[M + H]^+$ m/z 647.4 (C₃₂H₅₇O₉P₂, 647.4), 689.5 (C₃₅H₆₃O₉P₂, 689.4) и 717.5 (C₃₇H₆₇O₉P₂, 716.4), соответственно. В спектрах ЯМР ³¹Р соединениям **8а–8с** соответствовали синглеты в области δ_P 24 м.д. Образование дифосфонатов **8а–8с** наглядно прослеживалось также в спектрах ЯМР ¹Н по наличию характерного сигнала в виде триплета триплетов в области δ 2.2 м.д., соответствующего протону группы РСНР, а также сигналов протонов этоксильной группы: триплета в области δ 1.3 м.д. и мультиплета в области δ 4.1–4.2 м.д..

В литературе описаны различные способы омыления алкиловых эфиров дифосфоновых кислот: либо нагреванием в среде сильных кислот [11], либо через триметилсилиловые эфиры с последующим алкоголизом [20]. В данной работе был выбран второй метод, характеризующийся более мягкими условиями, поскольку соединения 8а-8с в сильно кислых средах способны претерпевать гидролиз по карбоксиалкильному фрагменту с образованием исходного изостевиола 1. Оказалось, что легкость расщепления эфиров 8а-8с существенно зависит от длины алкиленового спейсера и концентрации соединений в растворе. Так, перемешивание 0.2 М растворов (1 ммоль в 5 мл) дифосфонатов 8а-8с в CH₂Cl₂ в течение 7 ч при комнатной температуре с десятикратным избытком (CH₃)₃SiBr согласно [19]





с последующим алкоголизом реакционных смесей метанолом [20], позволило получить дифосфоновую кислоту только в случае эфира **8c** (выход 50%) с наиболее длинным алкиленовым спейсером (n = 8). По данным масс-спектрометрии МАЛ-ДИ и TCX реакционные смеси на основе эфиров **8b** и **8c** в указанных условиях содержали только исходные соединения. При увеличении общего времени реакции до 15 ч и двукратного добавления избытка (10 экв) (CH₃)₃SiBr, после алкоголиза и разработки реакционных смесей, кроме дифосфоновых кислот **9a** и **9b**, были идентифицированы исходные тетраэтиловые эфиры **8a** и **8b**, а также моноэтиловые эфиры – продукты неполного расщепления тетраэтилдифосфонатов. Согласно литературным данным, в ряде случаев, расщепление алкиловых эфиров галогенсиланами проводят без растворителя [10, 21], но поскольку дифосфонаты **8b**, **8c** представляли собой густую смолу, растворитель был необходим для лучшего массообмена. Использование насыщенных растворов соединений **8b**, **8c** в CH₂Cl₂ (1 ммоль в 1.5–2 мл) и двукратное добавление избытка триметилбромсилана позволило после метанолиза получить искомые

ЖУРНАЛ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 55 № 1 2019

	МИК, мкг/мл						
Соединение	Sa	Bc	Ec	Pa	An	Тт	Са
8a	125 ± 11	125 ± 10	>500	>500	>500	>500	>500
8b	31.3 ± 2.6	250 ± 22	>500	>500	>500	>500	>500
8c	3.9 ± 0.3	62.5 ± 5.3	>500	>500	>500	>500	>500
9a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
9b	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
9c	250 ± 20	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Хлорамфеникол	62.5 ± 5.7	62.5 ± 5.6	125 ± 12	_	_	_	_
	МБК, мкг/мл		МФК, мкг/мл				
8a	125 ± 10	125 ± 11	>500	>500	>500	>500	>500
8b	250 ± 21	>500	>500	>500	>500	>500	>500
8c	15.6 ± 1.4	125 ± 12	>500	>500	>500	>500	>500
9a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
9b	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
9c	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Таблица 1. Антимикробная активность соединений 8а-8с, 9а-9са

^а МИК – минимальная ингибирующая концентрация, МБК – минимальная бактерицидная концентрация, МФК – минимальная фунгицидная концентрация. Sa – Staphylococcus aureus, Bc – Bacillus cereus, Ef - Enterococcus faecalis, Ec – Escherichia coli, Pa – Pseudomonas aeruginosa, An – Aspergillus niger, Tm – Trichophyton mentagrophytes, Ca – Candida albicans.

дифосфоновые кислоты **9b** и **9c** с выходом 87% и 94%. В масс-спектрах МАЛДИ соединений **9а–9с** наблюдались пики молекулярных ионов $[M-H]^$ m/z 533.6 (C₂₄H₃₉O₉P₂, 533.2) (соединение **9а**), m/z 575.6 (C₂₇H₄₅O₉P₂, 575.3) (соединение **9b**), m/z603.2 (C₂₉H₄₉O₉P₂, 603.3) (соединение **9c**). В спектрах ЯМР ¹Н соединений **9а–9с** наблюдались уширенные сигналы в области δ 8 м.д., соответствующие протонам свободных фосфонатных групп.

Соединения **8а–8с** и **9а–9с** были протестированы на антимикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов. Из приведенных в табл. 1 данных, видно, что тетраэтилметилендифосфонаты **8а–8с** проявляют антимикробную активность в отношении тест-штаммов грамположительных бактерий *Staphylococus aureus* 209р и *Bacillus cereus* 8035. По бактериостатической активности соединение **8с** превосходит препарат сравнения хлорамфеникол в отношении *S. aureus* 209р в 16 раз, соединение **8b** в 2 раза. В экспериментах с грамотрицательными бактериями и грибами все соединения в исследуемых концентрациях не проявляют антимикробных свойств.

Соединения 8а-8с, 9а-9с были также исследованы на цитостатическую активность в отношении опухолевых линий клеток человека M-Hela (эпителиоидная карцинома шейки матки), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), а также в отношении эмбриональных клеток легкого человека (WI-38) в качестве модели нормальных клеток. Из приведенных в табл. 2 данных видно, что соединения 8а-8с обладают умеренными цитостатическими свойствами против всех использованных в эксперименте опухолевых линий, характеризуемыми величинами IC₅₀ 14-37 мкМ. Причем тетраэтилметилендифосфонаты 8а-8с оказались в два и более раза активнее дифосфоновых кислот 9а-9с. Длина полиметиленового спейсера играет не столь существенную роль. Так, наиболее активным из тестированных соединений в отношении опухолевых линий клеток является тетраэтилметилендифосфонат 8с, в котором дифосфонатная группа конъюгирована с изостевиольным каркасом октаметиленовым спейсером. Заслуживает внимания тот факт, что аналогичная по строению эфиру 8с дифосфоновая кислота 9с не проявляет цитостатическую активность в отношении M-Hela

СТРОБЫКИНА и др.

Соединение	IC ₅₀ , мкМ				
	M-Hela	MCF-7	WI-38		
8a	25 ± 1.9	36 ± 3.1	58 ± 4.3		
8b	14.2 ± 1.1	37 ± 3.1	37 ± 3.2		
8c	18.0 ± 1.5	15.2 ± 1.2	56.1 ± 4.4		
9a	55 ± 4.2	69.0 ± 5.2	82 ± 6.5		
9b	33 ± 2.8	>100	76.4 ± 5.5		
9c	>100	>100	>100		
Доксорубицин	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.1	1.30 ± 0.09		

Таблица 2. Цитотоксичность соединений 8а–8с, 9а–9с в отношении раковых (М-Hela, MCF-7) и нормальных (WI-38) клеточных линий человека

Таблица 3. Гемолитическая активность соединений 8а-8с, 9а-9с

Соединение	Гемолиз, %				
	100 мкМ	50 мкМ	10 мкМ		
	0.4 ± 0.03	0	0		
8b	63.4 ± 5.70	7.7 ± 6.20	0.2 ± 0.02		
8c	54.3 ± 4.8	22.7 ± 1.60	0.3 ± 0.02		
9a	0.7 ± 0.05	0.4 ± 0.03	0.1 ± 0.01		
9b	2.6 ± 0.10	1.2 ± 0.09	0.3 ± 0.02		
9c	4.7 ± 0.30	2.4 ± 0.20	0.9 ± 0.07		

и MCF-7. Общим для всех изученных соединений является несколько меньшая токсичность в отношении нормальных клеток WI-38 по сравнению с опухолевыми линиями клеток. В диапазоне МИК, МБК и МФК все исследованные соединения характеризуются низким гемолитическим индексом (табл. 3).

С использованием многофункциональной системы Cytell Cell Imaging были выполнены эксперименты по изучению способности соединений **8а–8с**, **9а**, **9b** вызывать апоптоз в клетках опухолевых линий человека MCF-7 и M-Hela (табл. 4) в

Таблица 4. Апоптотический эффект соединений 8а–8с, 9а, 9b в отношении М-Hela и МСF-7

	Апоптоз, %			
Соединение	M-Hela	MCF-7		
8 a	-	25.0 ± 1.9		
8 b	_	2.4 ± 0.2		
8c	21.9 ± 1.9	32.4 ± 2.5		
9a	27.6 ± 2.1	25.1 ± 1.8		
9b	57.5 ± 4.3	25.9 ± 2.1		

концентрациях, соответствующих значениям IC₅₀. Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитотоксичность соединений **8a, 8c**, **9a**, **9b** в клетках культуры M-Hela и MCF-7 реализуется главным образом по апоптотическому пути.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ¹Н и ¹³С регистрировали на спектрометрах Avance-400, Avance-600 (Вгикег, Германия). Масс-спектры МАЛДИ получены на времяпролетном масс-спектрометре UltraFlex III TOF/ TOF (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия) в линейном режиме. Лазер Nd: YAG, λ = 355 нм. Данные обрабатывали с помощью программы FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия). Измерения проводились в диапазоне *m/z* 200–6000. Фиксировались отрицательно или положительно заряженные ионы. В качестве матрицы использовались 2,5-дигидроксибензойная кислота (DHB) и *n*-нитроанилин (*p*-NA). Образцы растворяли в хлористом метилене в концентра-

ции 10⁻³ мг/мл. Раствор матрицы в ацетонитриле готовили в концентрации 10 мг/мл. Нанесение образцов проводили методом "высушенных капель". С помощью дозатора 0.5 мкл раствора матрицы наносили на мишень Anchor Chip (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия). После испарения растворителя на мишень наносили 0.5 мкл раствора аналита. Масс-спектры ионизации электрораспылением (ESI) получены на масс-спектрометре AmazonX (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия). Измерения проводились в режиме регистрации отрицательных или положительных ионов в диапазоне *m/z* от 100 до 2800. Напряжение на капилляре –4500 В. В качестве газа-осушителя использовался азот с температурой 250°С и расходом 8 л мин⁻¹. В качестве элюента использовали раствор состава метанол/вода (70: 30), скорость элюента 0.2 мл/мин. Соединение разбавляли метанолом до концентрации 10-6 г/л. Объем вкалываемой пробы 20 мкл. Данные обрабатывались с помощью программы DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия). Полноту протекания реакций и чистоту веществ контролировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах Sorbfil (ООО "Имид" Краснодар, Россия), вещества обнаруживали обработкой пластин 5% раствором серной кислоты с последующим нагреванием до 120°С. Удельное вращение измеряли на поляриметре Model 341 (PerkinElmer, Inc, CША) в термостатируемой ячейке при 20°С и $\lambda = 589$ нм.

Изостевиол 1 получали по методике [22] из подсластителя Sweta (Stevian Biotechnology Corp.). Т. пл. 235°С (лит. 231–233°С [23]), спектральные параметры 1 соответствуют литературным [24]. Синтез бромидов 7а–7с проводили по методике, приведенной в [13]. Спектральные параметры соответствуют литературным [13].

Общая методика синтеза тетраэтилдифосфонатов 8а–8с. К раствору 1 ммоль тетраэтилметилендифосфоната в 3 мл абсолютного ДМФА в атмосфере Ar при 0°С присыпали при перемешивании 1.3 ммоль NaH (60% суспензия в минеральном масле). После прекращения выделения водорода прикапывали раствор 1.3 ммоля бромида 7а–7с в 10 мл ДМФА, прекращали внешнее охлаждение, перемешивали при комнатной температуре 12 ч. Затем к реакционной смеси приливали 2 мл насыщенного раствора NH₄Cl, перемешивали 5 мин, приливали 9 мл насыщенного раствора NaCl, экстрагировали этилацетатом. Этилацетатные вытяжки промывали 1 раз насыщенным раствором NaHCO₃, 2 раза водой, сушили Na₂SO₄. Продукты выделяли в виде прозрачных смол методом обратной хроматографии на силикагеле КСК (фракция менее 0.063 мм) (элюэнт этилацетат – метанол от 100 : 1 до 7 : 1).

Тетраэтил 4-(16,19-диоксо-энт-бейеран-19илокси)бутан-1,1-дифосфонат (8а). Выход 23%, [а]²⁰-29.5° (1.36, СН₂Сl₂). Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 0.70 c (3H, CH₃-20), 0.96 c (3H, CH₃-17), 1.19 c (3H, CH₃-18), 1.33 T (12H, 4 OCH₂CH₃, J 7.1 Гц), 0.84-2.01 м (18Н, бейерановый скелет), 2.17 д (1Н, Н-3_{экв}, *J* 13.0 Гц), 2.31 т.т (1Н, СН-4", J 24.0, 5.9 Гц), 2.61 д.д (1Н, H-15а, J 18.6, 4.7 Гц), 3.95-4.02 м (1H, CH₂-1"), 4.05-4.12 м (1H, CH₂-1"), 4.13-4.23 м (8H, 4 О<u>СН</u>₂СН₃). Спектр ЯМР ¹³С, δ, м.д.: 13.29 с (СН₃-20), 16.30 д.д (4 ОСН₂<u>СН₃</u> J 6,42, 2.38 Гц), 18.90 с (CH₂-2), 19.73 с (CH₃-17), 20.22 c (CH₂-11), 21.63 c (CH₂-6), 22.59 c (CH₂-2"), 27.87 с (СН₂-3"), 28.88 с (СН₃-18), 36.48 т (СН-4", J 133.9 Гц), 37.20 с (СН₂-12), 37.81 с (СН₂-3), 37.91 c (C-10), 39.34 c (C-13), 39.73 c (CH₂-1), 41.43 c (CH₂-7), 43.73 c (C-4), 48.33 c (C-8), 48.57 c (CH₂-15), 54.20 c (CH₂-14), 54.63 c (CH-9), 56.99 c (CH-5), 62.45 д.д (4 О<u>СН</u>₂CH₃), *J* 16.32, 6,79 Гц), 63.61 c (CH₂-1"), 177.07 c (C-19), 222.12 c (C-16). Спектр ЯМР ³¹Р, б, м.д.: 23.92. Масс-спектр MALDI, *m/z*: 647.4 [*M* + H]⁺, 669.4 [*M* + Na]⁺. Найдено, %: С 59.62; Н 8.69; Р 9.69. С₃₂Н₅₆О₉Р₂. Вычислено, %: С 59.43; Н 8.73; Р 9.58.

Тетраэтил 7-(16,19-диоксо-энт-бейеран-19илокси)гептан-1,1-дифосфонат (8b). Выход 26%, $[\alpha]_D^{20}$ –23.6° (1.0, CH₂Cl₂). Спектр ЯМР ¹Н, δ , м.д.: 0.67 с (3H, CH₃-20), 0.96 с (3H, CH₃-17), 1.17 с (3H, CH₃-18), 1.32 т (12H, 4 OCH₂CH₃, *J* 7.1 Гц), 0.85–1.96 м (18H, бейерановый скелет), 2.16 д (1H, H-Зэкв., *J* 13.8 Гц), 2.24 т.т (1H, CH-7", *J* 24.2, 6.0 Гц), 2.61 д.д (1H, H-15 α , *J* 18.5, 3.6 Гц), 3.93– 4.05 м (2H, CH₂-1"), 4.11–4.19 м (8H, 4 OCH₂CH₃). Спектр ЯМР ¹³С, δ , м.д.: 13.25 с (CH₃-20), 16.24 с (4 OCH₂CH₃), 18.83 с (CH₂-2), 19.69 с (CH₃-17), 20.18 с (CH₂-11), 21.56 с (CH₂-6), 25.36, 25.65, 28.27, 28.82 с (5 CH₂-2"-6"), 28.82 с (CH₃-18), 36.65 т (CH-7", *J* 133.5 Гц), 37.17 с (CH₂-12), 37.80 с (CH₂-3), 37.87 с (C-10), 39.31 с (C-13), 39.71 с (CH₂-1), 41.38 с (CH₂-7), 43.67 с (C-4), 48.27 с (C-8), 48.52 с (CH₂-15), 54.16 с (CH₂-14), 54.57 с (CH-9), 56.95 с (CH-5), 62.28 д.д (4 О<u>СН₂</u>СН₃, *J* 11.8, 6.2 Гц), 64.02 с (CH₂-1"), 177.11 с (C-19), 222.08 с (C-16). Спектр ЯМР ³¹Р, δ, м.д.: 23.95. Масс-спектр МАLDI, *m/z*: 689.5 [*M* + H]⁺, 711.6 [*M* + Na]⁺. Най-дено, %: С 60.82; Н 9.10; Р 9.09. С₃₅Н₆₂О₉Р₂. Вычислено, %: С 61.03; Н 9.07; Р 8.99.

Тетраэтил 9-(16,19-диоксо-энт-бейеран-19илокси)нонан-1,1-дифосфонат (8c). Выход 29%, [а]_D²⁰ –40.3° (1.6, CH₂Cl₂). Спектр ЯМР ¹Н, δ, м.д.: 0.69 с (3H, CH₃-20), 0.96 с (3H, CH₃-17), 1.17 с (3H, CH₃-18), 1.32 т (12H, 4 ОСН₂<u>СН₃</u> J 7.1 Гц), 0.80-1.98 м (18H, бейерановый скелет), 2.16 д (1Н, Н-3_{экв}, *J* 13.5 Гц), 2.24 т.т (1Н, СН-9", J 24.2, 6.0 Гц), 2.61 д.д (1Н, Н-15а, J 18.5, 3.2 Гц), 3.92–4.06 м (2Н, СН₂-1"), 4.10-4.20 м (8Н, 4 О<u>СН</u>₂СН₃). Спектр ЯМР ¹³С, б, м.д.: 13 34 с (СН₃-20), 16.34 д.д (4 ОСН₂<u>СН</u>₃, *J* 3.07, 2.95 Гц), 18.93 с (CH₂-2), 19.79 c (CH₃-17), 20.28 c (CH₂-11), 21.67 c (CH₂-6), 25.45, 25.49, 25.53, 26.06, 28.43, 29.10, 29.24 с (7 СН₂-2"-8"), 28.92 с (СН₃-18), 36.76 т (СН-9", Ј 133.5 Гц), 37.28 с (СН₂-12), 37.91 с (СН₂-3), 37.98 c (C-10), 39.42 c (C-13), 39.82 c (CH₂-1), 41.50 c (CH₂-7), 43.77 c (C-4), 48.39 c (C-8), 48.63 c (CH₂-15), 54.26 c (CH₂-14), 54.67 c (CH-9), 57.06 c (CH-5), 62.37 д.д (4 OCH₂CH₃, J 10.2, 6.8 Гц), 64.23 c (CH₂-1"), 177.28 c (C-19), 222.32 c (C-16). Спектр ЯМР ³¹Р, δ, м.д.: 24.05. Масс-спектр MALDI, *m/z*: 717.5 [*M*+H]⁺, 739.6 [*M*+Na]⁺. Найдено, %: С 62.12; Н 9.25; Р 8.55. С₃₇Н₆₆О₉Р₂. Вычислено, %: С 61.99; Н 9.28; Р 8.64.

Общая методика синтеза дифосфоновых кислот (9а–9с). К охлажденному до 0°С раствору 0.1 ммоль дифосфоната 8а–8с в 1.5–2 мл абс. CH_2Cl_2 в атмосфере Ar добавляли шприцом через септу 1 ммоль триметилбромсилана. Прекращали охлаждение и перемешивали при комнатной температуре 7 ч. Оставляли на ночь без перемешивания. Затем добавляли еще 1 ммоль триметилбромсилана и перемешивали при комнатной температуре 8 ч. Отгоняли хлористый метилен досуха и двукратно добавляли и отгоняли при пониженном давлении 1 мл абсолютного CH_2Cl_2 , сушили на масляном насосе 1 ч. К полученному полупродукту (триметилсили-

ловому эфиру) при 0°С в атмосфере Аг приливали 1 мл абс. метанола. Перемешивали 1 ч при 0°С, затем 4 ч при комнатной температуре. Метанол упаривали досуха, остаток сушили в вакуумном эксикаторе над молекулярными ситами. Для получения чистого дифосфоната 9с, реакционную смесь после удаления метанола растворяли в EtOAc, трижды промывали водой, сушили над Na₂SO₄. Этилацетат упаривали, продукт сушили в вакуумном эксикаторе над молекулярными ситами. Получали дифосфонаты 9а–9с в виде бесцветной пены.

4-(16,19-Диоксо-энт-бейеран-19-илокси)бутан-1,1-дифосфоновая кислота (9а). Выход 87%, [a]²⁰ –59.8° (1.7, CH₂Cl₂). Спектр ЯМР ¹Н, б, м.д.: 0.71 c (3H, CH₃-20), 0.96 c (3H, CH₃-17), 1.19 c (3H, CH₃-18), 0.80-2.10 м (18Н, бейерановый скелет), 2.17 д (1H, H-3_{экв}, J 12.9 Гц), 2.51 уш.т (1H, CH-4", J 24.2 Гц), 2.71 д (1Н, H-15а, J 18.8 Гц), 3.98-4.16 м (2H, CH₂-1"), 8.30 уш.с (4H, POH). Спектр ЯМР ¹³С, б, м.д.: 13.42 с (СН₃-20), 18.93 с (СН₂-2), 19.77 с (CH₃-17), 20.31 c (CH₂-11), 21.80 c (CH₂-6), 22.44 c (CH₂-2"), 27.73 c (CH₂-3"), 28.91 c (CH₃-18),37.42 c (CH₂-12), 38.02 c (CH₂-3, 10), 39.70 c (C-13), 39.90 c (CH₂-1), 41.27 c (CH₂-7), 43.92 c (C-4), 48.25 c (C-8), 49.00 (CH₂-15), 54.10 c (CH₂-14), 54.62 c (CH-9), 57.07 c (CH-5), 64.22 c (CH₂-1"), 178.00 c (C-19), 226.09 с (С-16). Спектр ЯМР ³¹Р, б, м.д.: 23.45. Macc-спектр MALDI, *m/z*: 533.6 [*M*-H]⁻. Найдено, %: C 53.48; H 7.60; P 11.41. C₂₄H₄₀O₉P₂. Вычислено, %: С 53.93; Н 7.51; Р 11.59.

7-(16,19-Диоксо-энт-бейеран-19-илокси)гептан-1,1-дифосфоновая кислота (9b). Выход 94%, [а]²⁰-30.3° (1.29, CH₂Cl₂). Спектр ЯМР ¹Н, б, м.д.: 0.71 c (3H, CH₃-20), 0.98 c (3H, CH₃-17), 1.19 c (3H, CH₃-18), 0.80-2.05 м (18Н, бейерановый скелет), 2.17 д (1H, H-3_{экв}, J 12.6 Гц), 2.46 уш.т (1H, CH-7", Ј 24.4 Гц), 2.68 д (1Н, Н-15α, Ј 18.7 Гц), 3.95-4.11 м (2H, CH₂-1"), 8.12 уш.с (4H, POH). Спектр ЯМР ¹³С, δ, м.д.: 13.40 с (СН₃-20), 18.96 с (СН₂-2), 19.77 c (CH₃-17), 20.31 c (CH₂-11), 21.73 c (CH₂-6), 25.25, 25.88(2C), 28.32, 28.94 c (5 CH₂-2" - 6"), 28.94 c (CH₃-18), 37.41 c (CH₂-12), 37.95 c (CH₂-3), 38.02 c (C-10), 39.66 c (C-13), 39.87 c (CH₂-1), 41.33 c (CH₂-7), 43.89 c (C-4), 48.24 c (C-8), 48.97 c (CH₂-15), 54.10 c (CH₂-14), 54.56 c (CH-9), 57.07 c (CH-5), 64.62 c (CH₂-1"), 177.90 c (C-19), 225.28 c (C-16). Спектр ЯМР ³¹Р, δ, м.д.: 24.09. Масс-спектр МАLDI, *m/z*: 575.6 [*M*-H]⁻, 557.6 [*M*-H₂O-H]⁻. Найдено, %: С 55.98; Н 8.09; Р 10.62. С₂₇Н₄₆О₉Р₂. Вычислено, %: С 56.24; Н 8.04; Р 10.74.

9-(16,19-Диоксо-энт-бейеран-19-илокси)нонан-1,1-дифосфоновая кислота (9с). Выход 50%. [a]²⁰-25.0° (2.1, CH₂Cl₂). Спектр ЯМР ¹Н, б, м.д.: 0.70 c (3H, CH₃-20), 0.97 c (3H, CH₃-17), 1.18 c (3H, CH₃-18), 0.80-1.95 м (18Н, бейерановый скелет), 2.17 д (1Н, Н-3_{экв}, *J* 12.2 Гц), 2.35 уш.с. (1Н, СН-9"), 2.63 д (1H, H-15а, J 18.5 Гц), 3.90-4.08 м (2H, СH₂-1"), 7.55 уш.с (4Н, РОН). Спектр ЯМР ¹³С, δ, м.д.: 13.43 с (СН₃-20), 19.00 с (СН₂-2), 19.85 с (CH₃-17), 20.33 c (CH₂-11), 21.71 c (CH₂-6), 28.47, 28.61, 28.99, 29.24, 29.32, 29.48, 29.67 c (7 CH₂-2"-8"), 28.99 c (CH₃-18), 37.36 c (CH₂-12), 37.92 c (CH₂-3), 38.01 c (C-10), 39.54 c (C-13), 39.85 c (CH₂-1), 41.46 c (CH₂-7), 43.84 c (C-4), 48.40 c (C-8), 48.83 c (CH₂-15), 54.20 c (CH₂-14), 54.64 c (CH-9), 57.08 c (CH-5), 64.49 c (CH₂-1"), 177.55 c (C-19), 223.74 с (С-16). Спектр ЯМР ³¹Р, б, м.д.: 24.68. Macc-спектр MALDI, *m/z*: 603.2 [*M*–H]⁻. Найдено, %: С 57.12; Н 8.29; Р 10.51. С₂₉Н₅₀О₉Р₂. Вычислено, %: С 57.61; Н 8.33; Р 10.25.

Антимикробную активность изучали методом серийных разведений в жидких питательных средах по методикам [25, 26], определяя минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), вызывающую задержку роста и размножения тест-микроорганизмов. Использовали культуры грамположительных бактерий: *Staphylococcus aureus ATCC 209p, Bacillus cereus ATCC 8035;* грамотрицательных бактерий *Escherichia coli CDC F-50, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* и грибов *Aspergillus niger BKMF-1119, Trichophyton mentagrophytes var. gypseum 1773, Candida albicans 855-653.*

Оценку цитотоксического действия проводили путем подсчета жизнеспособных клеток с помощью многофункциональной системы Cytell Cell Imaging (GE Helthcare Life Science, Швеция), используя приложение Cell Viability BioApp, которое позволяет точно подсчитать количество клеток, оценить их жизнеспособность на основании интенсивности флуоресценции [27]. Для экспериментов использовали опухолевые культуры клеток *M-Hela* клон 11 (эпителиоидная карцинома шейки матки), *MCF-7* (аденокарцинома молочной железы); и эмбриональные клетки легкого человека WI-38 в концентрациях рекомендованных для скрининга новых противоопухолевых агентов (100–1 μ M). Клеточные линии были получены из коллекций Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Степень подавления роста клеток под влиянием тестируемого агента вычисляли по формуле:

$$N\% = (1 - Oпыт/Контроль) \times 100,$$

Затем по кривой зависимости роста культуры клеток от концентрации соединения определяли IC_{50} , то есть концентрацию препарата, вызывающие торможение роста клеток на 50%. Соединение нового класса считается цитотоксически активным при $IC_{50} < 10^{-4}$ М. [28].

Оценку гемолитеческой активности дифосфосфонатов **8а–8с, 9а–9с** проводили сравнением оптической плотности их растворов и взвеси эритроцитов человека в физиологическом растворе с оптической плотностью крови при 100%-ном гемолизе по известной методике [29].

Для изучения апоптоза использовали протокол Apoptosis BioApp многофункциональной системы Cytell Cell Imaging (GE Helthcare Life Science, Швеция) и Alexa Fluor 647 Annexin V.

Все биологические эксперименты проводили с трехкратным повторением.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Авторы благодарят ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН за проведенные исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang S., Gangal G., Uludag H., Chem.Soc.Rev. 2007, 36, 507.
- Rogers M.J., Crockett J.C., Coxon F.P., Monkkonen J., Bone, 2011, 49, 34.
- Thompson, K., Roelofs, A.J., Jauhiainen, M., Mönkkönen H., Mönkkönen, J., Rogers, M.J., Advances in Experimental Medicine and Biology. Ed. Y. Choi.

N.Y. London. Dordrecht. Heidelberg. Springer, 2010, 658, 11.

- Leon A., Liu L., Yang Y., Hudock M. P., Hall P., Yin F., Studer D., Puan K.-J., Morita C.T., Oldfield E. *J.Med. Chem.* 2006, 49, 7331.
- 5. Abdou W.M., Barghash R.F., Bekheit M.S., Geronikaki A. *ChemistrySelect*, **2016**, *1*, 3797.
- 6. Santini D., Fratto M.E., Vincenzi B., La Cesa A., Dianzani C., Tonini G. *BioDrags*, **2004**, *18*, 269.
- 7. Morgan G., Lipton A. Semin. Oncol. 2010, 37, S30.
- 8. Green J.R. Oncologist, 2004, 9 (4), 3.
- Holstein S.A., Cermak D.M., Wiemer D.F. Lewis K., Hohl R.J. *Bioorg. Med. Chem.* 1998, *6*, 687.
- Январев Д.В., Коровина А.Н., Усанов Н.Н., Кочетков С.Н. *Биоорг. хим.* 2012, 38 (2), 257. [Yanvarev D.V., Korovina A.N., Usanov N.N., Kochetkov S.N. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2012, 38 (2), 224.]
- Gałęzowska J., Czapor-Irzabek H., Chmielewska E., Kafarski P. and Janek T.. New J. Chem. 2018, 42, 7723.
- Wang M., Li H., Xu F., Gao X., Li J., Xu S., Zhang D., Wu X., Xu J., Hua H., Li D. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 156, 885.
- Strobykina I.Yu , Belenok M.G., Semenova M.N., Semenov V.V., Babaev V.M., Rizvanov I.Kh., Mironov V.F., Kataev V.E. J. Nat. Prod. 2015,78,1300.
- Гарифуллин Б.Ф., Честнова Р.В., Миронов В.Ф., Катаев В.Е. *ХПС*, **2012**, *5*, 711. [Garifullin, В.F., Chestnova, R.V., Mironov, V.F., Kataev, V.E. Chem. Nat. Comp. **2012**, *48* (5), 794.]
- Mamedova V.L., Nikitina K.A., Mamedov V.A., Kataev V.E., Alfonsov V. A. *Mendeleev Commun.* 2005, 15 (3), 98.
- Мамедова В.Л., Никитина К.А., Альфонсов В.А. Изв. АН. Сер .хим. 2012, 61 (8), 1605. [Mamedova V.L., Nikitina K.A, Al'fonsov V.A. Russ. Chem. Bull., Intern. Ed. 2012, 61 (8), 1623.]
- Мамедова В.Л., Никитина К.А., Альфонсов В.А. Изв. АН. Сер. хим. 2009, 58 (1), 241. [Mamedova V.L., Nikitina K.A, Al'fonsov V.A. Russ. Chem. Bull., Intern. Ed. 2009, 58 (1), 244.]
- Стробыкина И.Ю., Хайбуллин Р.Н., Стробыкина А.С., Волошина А.Д., Шарипова Р.Р., Кравченко М.А., Катаев В.Е. *ХПС*. 2018, 54 (4), 583.

[Strobykina I.Yu., Khaibullin R.N., Sapunova A.S., Voloshina A.D., Sharipova R.R., Kravchenko M.A., Kataev V.E. *Chem. Nat. Comp.* **2018**, *54* (4), 688.]

- Houghton T.J., Tanaka K.S.E., Kang T., Dietrich E., Lafontaine Y., Delorme D., Ferreira S.S., Viens F., Arhin F.F., Sarmiento I., Lehoux D., Fadhil I., Laquerre K., Liu J., Ostiguy V., Poirier H., Moeck G., Parr T.R., Far A.R. J. Med. Chem. 2008, 51, 6955.
- Szajnman S.H., Rosso V.S., Malayil L., Smith A., Moreno S.N.J., Docampo R., Rodriguez J.B. Org. Biomol.Chem., 2012, 10, 1424.
- Chiminazzo A., Sperni L., Damuzzo M., Strukul G., Scarso A. Chem. Cat. Chem. 2014, 6, 2712.
- 22. Mosettig E., Nes W.R. J. Org. Chem. 1955, 20, 884.
- Хайбуллин Р.Н., Стробыкина И.Ю., Катаев В.Е., Лодочникова О.А., Губайдуллин А.Т. ЖОХ. 2009, 79 (5), 967. [Khaibullin R.N., Strobykina I.Yu., Kataev V.E., Lodochnikova O.A., Gubaidullin A.T., Musin R.Z. Russ. J. Gen. Chem. 2009, 79 (5), 795.]
- Korochkina M., Fontanella M., Casnati A., Arduini A., Sansone F., Ungaro R., Latypov Sh., Kataev V., and Alfonsov V. *Tetrahedron*. 2005, *61*, 5457.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility. Tests for bacteria that grow aerobically—Sixth edition: Approved standard. M7-A5, NCCLS, Wayne, PA., USA. 2000.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: Proposed standard. M38-P, NCCLS, Wayne, PA., USA. 1998.
- Волошина А.Д., Семенов В.Э, Стробыкина А.С., Кулик Н.В., Крылова Е.С., Зобов В.В., Резник В.С. Биоорг. хим. 2017, 43 (2), 197. [Voloshina A.D., Semenov V.E., Strobykina A.S., Kulik N.V., Krylova E.S., Zobov V.V., Reznik V.S., Russ. J. Bioorg. Chem., 2017, 43, 170.]
- Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012. 1. 20.
- Pashirova T.N., Lukashenko S.S., Zakharov S.V., Voloshina A.D., Zhiltsova E.P., Zobov V.V., E.B. Souto E.B., Zakharova L.Ya., *Coll. Surf B: Biointerfaces.* 2015, *127*, 266.

Synthesis and Biological Activity of 1,1-Alkylendiphosphonates of Diterpenoid Isosteviol

I. Yu. Strobykina, A. V. Nemtarev, B. F. Garifullin, A. D. Voloshina, A. S. Sapunova, and V. E. Kataev*

Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, 420088, Russia, Respublika Tatarstan, Kazan, ul. akad. Arbuzova 8 *e-mail: kataev@iopc.ru

> Received December 3, 2018 Revised December 4, 2018 Accepted December 5, 2018

The reaction of alkylene bromides of diterpenoid isosteviol with tetraethylmethylene bisphosphonate afforded corresponding diphosphonic acids conjugated to the diterpenoid skeleton by a polymethylene spacer. One of the synthesized compounds showed high (MIC 3.9 μ g/mL) antimicrobial activity against S.aureus and high (IC₅₀ 15–18 μ M) cytotoxicity against human cancer cell lines M-Hela and MCF-7.

Keywords: Isosteviol, phosphonates, phosphonic acids, antimicrobial activity, cytotoxicity