

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.Ломоносова
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



НОСОВА ЮЛИЯ НИКОЛАЕВНА

**СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ
АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ И РУТЕНИЯ
С ЛИГАНДАМИ НА ОСНОВЕ ЛОНИДАМИНА И БЕКСАРОТЕНА**

02.00.16 – медицинская химия
02.00.08 – химия элементоорганических соединений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научные руководители:

Милаева Елена Рудольфовна

доктор химических наук, профессор

Назаров Алексей Анатольевич

кандидат химических наук

Официальные оппоненты:

Грин Михаил Александрович

доктор химических наук, доцент

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский технологический университет», профессор, заведующий кафедрой химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Преображенского Н.А.

Белоглазкина Елена Кимовна

доктор химических наук

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», профессор кафедры органической химии Химического факультета

Логинов Дмитрий Александрович

доктор химических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук, ведущий научный сотрудник отдела металлоорганических соединений, 102 Лаборатории пи-комплексов переходных металлов

Защита диссертации состоится «21» февраля 2018 г. в 11⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета МГУ.02.01 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3, МГУ, Химический факультет, в аудитории 446.

e-mail: tvn@org.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/91403011/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

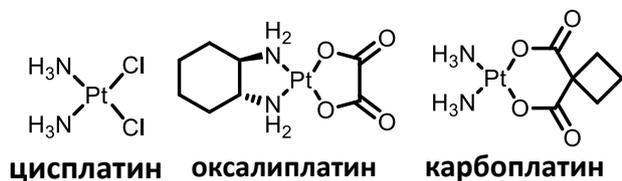
Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.02.01
доктор химических наук, профессор



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

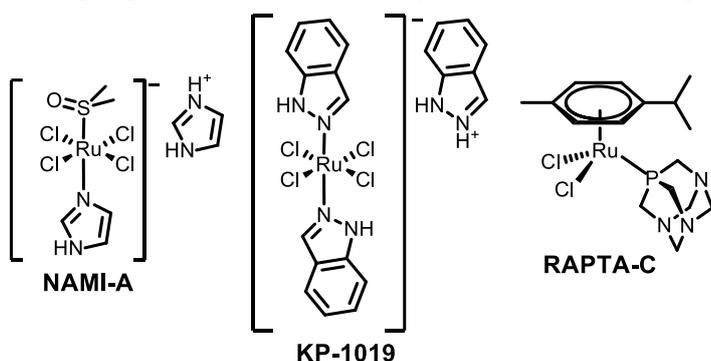
Онкологические заболевания являются одной из важнейших проблем современной медицины. Наряду с хирургией, фотодинамической и радиотерапией широко распространено применение химиотерапии. Направленный поиск и создание новых фармакологических препаратов, обладающих противоопухолевой активностью, – одна из основных задач современной медицинской химии.



После открытия активности цисплатина в 1965 году и последовательных клинических испытаний, он был одобрен в 1978 году как первое металлосодержащее противоопухолевое

лекарственное средство. Затем тысячи соединений платины были синтезированы и исследованы в качестве агентов для терапии злокачественных новообразований. В результате в клиническую практику были введены еще два соединения платины оксалиплатин и карбоплатин. В настоящее время три комплекса платины (цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин) занимают особое место в терапии онкологических заболеваний и применяются в каждой второй схеме лечения.

Несмотря на высокую эффективность препаратов платины их применение ограничено сопутствующими острыми побочными эффектами, а также первичной или приобретенной устойчивостью. В связи с этим ведется поиск новых подходов к конструированию противоопухолевых препаратов, которые будут лишены этих недостатков. Помимо соединений Pt(II), комплексы Pt(IV) интенсивно изучаются как противоопухолевые средства ввиду большей химической инертности, наличия дополнительных координационных возможностей для конструирования новых молекул, не обладающих рядом побочных эффектов.



Поиск новых производных других металлов и исследование их активности как противоопухолевых соединений показал, что комплексы рутения обладают наилучшим потенциалом для создания неплатиновых противоопухолевых препаратов. Они менее токсичны и имеют

тенденцию к снижению побочных эффектов по сравнению с платиновыми препаратами. Два комплекса Ru(III) NAMI-A и KP1019 стали первыми соединениями рутения, вошедшими в клинические испытания в качестве противоопухолевых агентов, а соединения Ru(II) типа RAPTA показывают высокую антиметастатическую активность в тестах *in vivo*.

За последние десятилетия наряду с поиском высокоэффективных соединений с противоопухолевым эффектом действия возросла необходимость направленной модификации их молекул с целью повышения селективности и, таким образом, уменьшения неспецифического токсического воздействия. Одним из подходов, широко применяемых в медицинской химии

является мультитаргетный подход, т.е. создание лекарств, состоящих из двух физиологически активных функциональных фрагментов, которые будут воздействовать в опухолевой клетке одновременно на различные мишени.

Соединения Pt(IV), Ru(III) и Ru(II) используются в качестве платформы для введения фрагментов биологически активных органических субстанций. Введение в металлосодержащую платформу фрагмента органического лекарственного препарата, который имеет определённую мишень в раковой клетке и обладает собственной активностью, приводит к соединениям двойного действия. Лигандное окружение влияет на противораковую и антиметастатическую активность координационных и металлоорганических соединений, а специфичность их действия может быть увеличена посредством связывания органической части молекулы с биологическими мишенями.

1-(2,4-Дихлоробензил)-1H-индазол-3-карбоновая кислота (*лонидамин*) является селективным ингибитором гликолиза в раковой клетке, а 4-(1-(3,5,5,8,8-пентаметил-5,6,7,8-тетрагидро-2-нафтил)винил)бензойная кислота (*бексаротен*) – агонист ретиноидного RXR рецептора – эффективен в борьбе с Т-клеточной лимфомой. Данные соединения ввиду выраженной противоопухолевой активности выбраны в настоящей работе в качестве фармакологически активных органических субстанций для введения в структуры соединений Pt(IV), Ru(III) и Ru(II).

Целью настоящей работы являлась разработка методов получения соединений Pt(IV), Ru(III) и Ru(II) с фрагментами 1-(2,4-дихлоробензил)-1H-индазол-3-карбоновой кислоты и 4-(1-(3,5,5,8,8-пентаметил-5,6,7,8-тетрагидро-2-нафтил)винил)бензойной кислоты, а также исследование их физико-химических свойств и противоопухолевой активности с целью отбора соединений-лидеров.

Задачи работы

- 1) Разработка синтетических подходов к получению комплексов Pt(IV), Ru(III) и металлоорганических соединений Ru(II) с лигандами на основе *лонидамина* и *бексаротена*;
- 2) Разработка синтетических подходов для получения нового типа гетероядерных соединений Pt(IV)-Ru(II);
- 3) Исследование *in vitro* и *in vivo* биологической активности новых соединений Pt(IV), Ru(III), Ru(II) и Pt(IV)-Ru(II);
- 4) Исследование зависимости «структура-активность» новых соединений Pt(IV), Ru(III), Ru(II) и Pt(IV)-Ru(II) и выбор соединений-лидеров для дальнейших расширенных испытаний.

Научная новизна

Предложен новый подход к конструированию металлосодержащих противоопухолевых средств, заключающийся в комбинации в одной молекуле атомов Pt(IV), Ru(III) и Ru(II) и фрагментов лекарственных препаратов – *лонидамина* и *бексаротена*.

Разработаны методы получения и синтезированы серии комплексов Pt(IV) и Ru(III), а также металлоорганических соединений Ru(II), содержащих фрагменты *лонидамина* и *бексаротена*, и изучены их физико-химические характеристики.

Получена серия гетероядерных комплексов нового типа, которые содержат в одной молекуле атомы Pt(IV) и Ru(II), связанные линкерами различной длины.

Показана высокая противоопухолевая активность комплексов Pt(IV), содержащих фрагменты *лонидамина* и *бексаротена*. Впервые исследовано внутриклеточное накопление комплекса Pt(IV) с лигандом на основе *лонидамина*, изучено его воздействие на клеточный цикл и механизм гибели раковой клетки. Впервые изучена *in vivo* острая токсичность комплекса Pt(IV) с лигандом на основе *лонидамина* и его биораспределение в организме лабораторных животных.

Показана цитотоксичность комплексов Ru(III) и металлоорганических соединений Ru(II) с лигандами на основе *лонидамина* и *бексаротена* на различных клеточных линиях рака человека. Показана высокая селективность комплекса Ru(III) с фрагментом *бексаротена* по отношению к клеточной линии нейробластомы и возможность связывания комплекса с альбумином и трансферрином.

Показана зависимость цитотоксичности гетероядерных соединений Pt(IV)-Ru(II) от структуры их молекул, в частности от расстояния между атомами металлов.

Практическая значимость

Разработаны методы получения и синтезированы экспериментальные образцы новых гибридных соединений Pt(IV), Ru(III) и Ru(II), содержащих фрагменты лекарственных препаратов *лонидамина* и *бексаротена*, и гетероядерных комплексов Pt(IV)-Ru(II).

Выявлено соединение-лидер в ряду комплексов Pt(IV) с фрагментом *лонидамина*, для которого характерны: накопление в клетках рака молочной железы MCF7, в 10 раз превышающее таковое для цисплатины, запуск раннего апоптоза в 3 раза более эффективно, чем цисплатином и *in vivo* низкая общая токсичность, что делает его перспективным кандидатом в противоопухолевые лекарственные средства.

Обнаружена избирательная активность комплекса Ru(III) с лигандом на основе *бексаротена* на клеточной линии нейробластомы человека. При этом соединение характеризуется низкой общей токсичностью, что делает его перспективным для дальнейшего исследования.

Впервые показана мультитаргетная активность гетероядерного соединения Pt(IV)-Ru(II), способного одновременно связываться в нуклеосомной частице как с геномной ДНК, так и с гистоновыми белками, что представляет перспективу для дальнейших расширенных испытаний.

На защиту выносятся следующие положения:

Разработка подходов к синтезу лигандов на основе 1-(2,4-дихлоробензил)-1H-индазол-3-карбоновой кислоты и 4-(1-(3,5,5,8,8-пентаметил-5,6,7,8-тетрагидро-2-нафтил)винил)бензойной кислоты. Результаты изучения физико-химических свойств и биологической активности лигандов.

Разработка методов синтеза комплексов Pt(IV) с лигандами на основе 1-(2,4-дихлоробензил)-1H-индазол-3-карбоновой кислоты и 4-(1-(3,5,5,8,8-пентаметил-5,6,7,8-тетрагидро-2-нафтил)винил)бензойной кислоты. Результаты изучения физико-химических свойств и биологической активности.

Разработка подходов к синтезу комплексов Ru(III), а также металлоорганических соединений Ru(II), содержащих фрагменты 1-(2,4-дихлоробензил)-1H-индазол-3-карбоновой кислоты и 4-(1-(3,5,5,8,8-пентаметил-5,6,7,8-тетрагидро-2-нафтил)винил)бензойной кислоты. Результаты изучения физико-химических свойств и биологической активности.

Разработка подходов к синтезу гетероядерных соединений Pt(IV)-Ru(II). Результаты изучения физико-химических свойств и биологической активности.

Личный вклад автора состоял в выполнении синтетической части работы, включая синтез, выделение и анализ продуктов, а также анализ и обработка экспериментальных данных; в обсуждении и интерпретации данных исследования биологической активности; участии в постановке задачи и разработке плана исследований, обсуждении результатов, формулировании выводов и подготовке публикаций по теме диссертационной работы.

Апробация работы

Результаты работы доложены на XXV Международной конференции по координационной и бионеорганической химии, Смоленис, Словакия, 2015; 8-ом Международном симпозиуме по биометаллоорганической химии, ISBOMC16, Москва, Россия, 2016; Втором междисциплинарном симпозиум по медицинской, органической и биологической химии, 2015, Новый Свет, Россия, 2015; Кластере конференций Оргхим-2016, Репино, Санкт-Петербург, Россия, 2016; XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии, Екатеринбург, Россия, 2016; Гордоновской исследовательской конференции Металлы в медицине, Андовер, США, 2016; 3-ей Российской конференции по медицинской химии, Казань, Россия, 2017; XXIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017», Москва, Россия, 2017.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ (в журналах из списка ВАК и/или WOS): 3 статьи [1-3] и 9 тезисов докладов на конференциях [4-12]).

Объём и структура диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы. Материал диссертации изложен на 171 странице печатного текста, содержит 23 схемы, 28 рисунков и 19 таблиц. Список цитируемой литературы включает 176 наименований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ 14-13-00483, РФФИ 16-03-00743 и стипендии Австрийского научного фонда OeAD ICM-2014-08349.

Основное содержание работы

1. Обзор литературы посвящен анализу и систематизации методов модификации соединений Pt(IV), Ru(II) и Ru(III) и подходов для введения в их структуры фрагментов биологически активных органических соединений с целью повышения биологической активности.

2. Обсуждение результатов

Целью данной работы является получение, характеристика, изучение физико-химических характеристик и биологической активности новых комплексов Pt(IV) и Ru(III) и металлоорганических соединений Ru(II) с биологически активными лигандами. В настоящей работе выбраны два фармакологически активных органических соединения – препараты *бексаротен* и *лонидамин* (Схема 1).

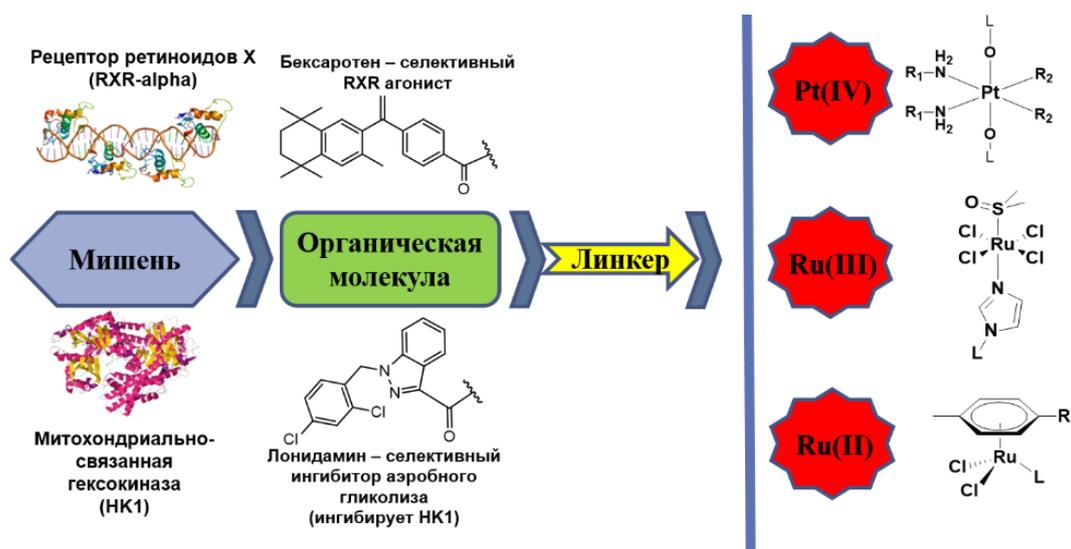


Схема 1. Принцип конструирования соединений Pt и Ru.

2.1. Синтез и физико-химические свойства новых соединений

2.1.1. Синтез и физико-химические свойства комплексов Pt(IV) на основе лонидамина и бексаротена

Основной подход, использованный в работе, основан на объединении в одной молекуле структурных единиц – ингибитора гликолиза лонидамина **1** и производных известных фармакофоров на основе Pt(IV), посредством введения органического фрагмента в аксиальное положение комплексов. Комплексы **7-10** получали взаимодействием избытка 1-(2,4-дихлоробenzил)-1H-индазол-3-карбонилхлорида **2**, полученного *in situ* кипячением в CH₂Cl₂ с оксалилхлоридом, с комплексами **3-6** соответственно. В качестве акцептора HCl использовали пиридин. Комплексы **7-10** получены с хорошими выходами (42-71%) (Схема 2).

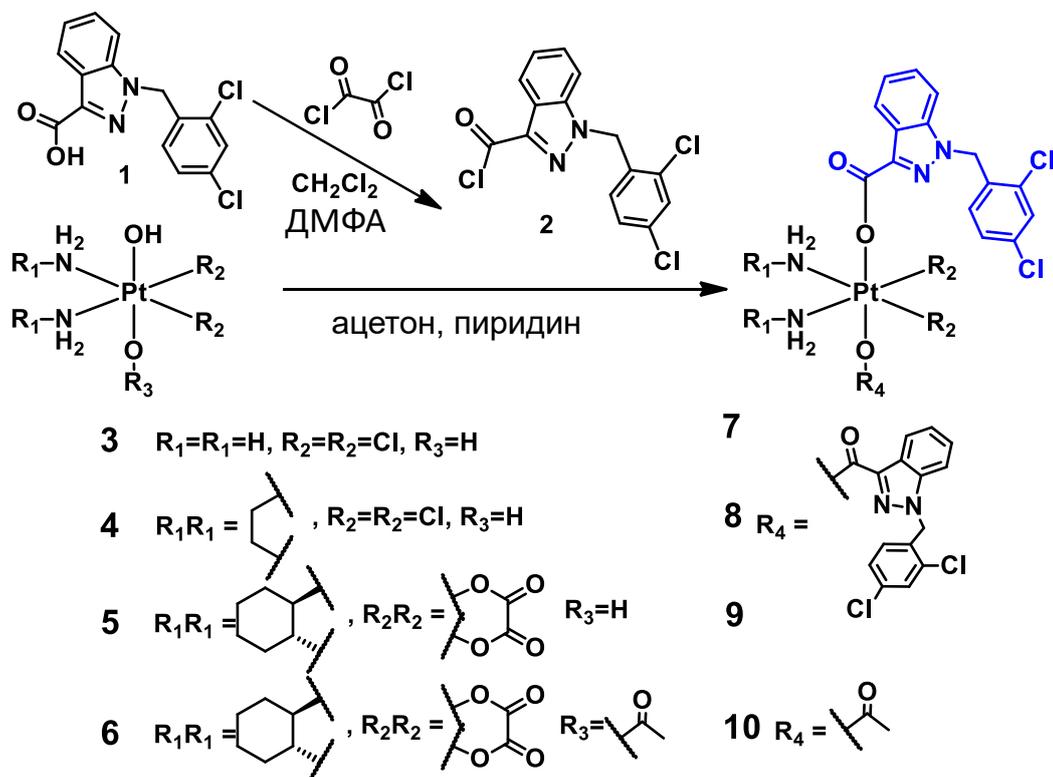


Схема 2. Синтез комплексов Pt(IV) с фрагментом лонидамина в аксиальном положении.

Для разнесения в пространстве двух активных фрагментов – Pt(IV) и лонидамина, получена серия комплексов **16-18** введением органического фрагмента 1-(2,4-дихлорбензил)-1H-индазол-3-карбоновой кислоты в структуру лиганда комплексов платины **13-15**. Предварительно получали *tert*-бутил-2-(1-(2,4-дихлорбензил)-1H-индазол-3-карбоксамид)этилкарбамат взаимодействием 1-(2,4-дихлорбензил)-1H-индазол-3-карбонилхлорида с эквимолярным количеством N-(2-аминоэтил)карбамата в CH₂Cl₂ в присутствии триэтиламина. Затем *tert*-бутокси-карбонильную защиту удаляли в избытке трифторуксусной кислоты и получали амин **12**, который использовали без дополнительной очистки и характеристики (Схема 3).

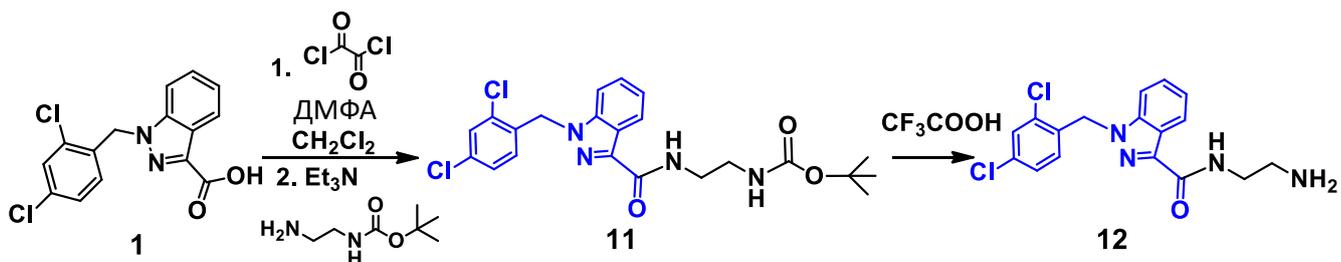


Схема 3. Синтез N-(2-аминоэтил)-1-(2,4-дихлорбензил)-1H-индазол-3-карбоксамид.

На основе амина **12** и соединений **13-15** получена серия комплексов **16-18** (Схема 4). Реакцию проводили в безводном ДМФА в атмосфере аргона. Предварительно свободную кислотную группу **13-15** активировали карбонилдимидазолом.

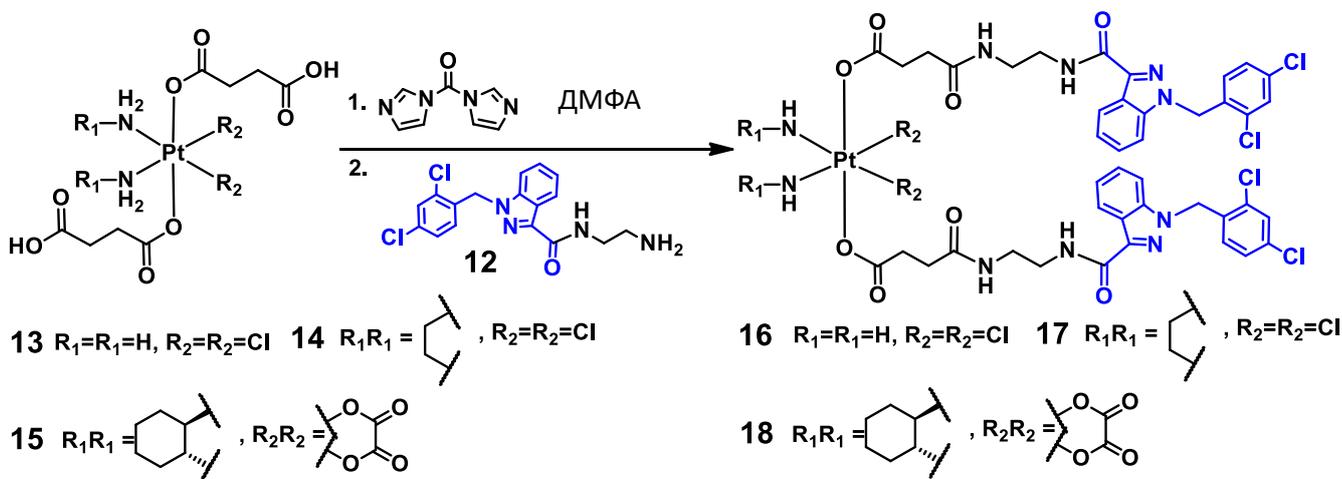


Схема 4. Синтез комплексов Pt(IV) с лигандом на основе лонидамина – производных (3-карбоксипропаноато)платины(IV).

Полученные комплексы **16-18** выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе этанол/хлористый метилен. Соединения **16-18** получены с умеренными выходами 22-36%.

Основываясь на подходе, предложенном для синтеза комплексов производных лонидамина **7-10**, получены соединения **21** и **22** – аналоги оксалиплатина, с фрагментом бексаротена в аксиальном положении (Схема 5), взаимодействием 4-(1-(3,5,5,8,8-пентаметил-5,6,7,8-тетрагидро-2-нафтил)винил)бензилхлорида, полученного *in situ*, и соединений **5** и **6**. Ввиду слабой растворимости и низкой реакционной способности комплексов **3** и **4**, производные на их основе получить не удалось.

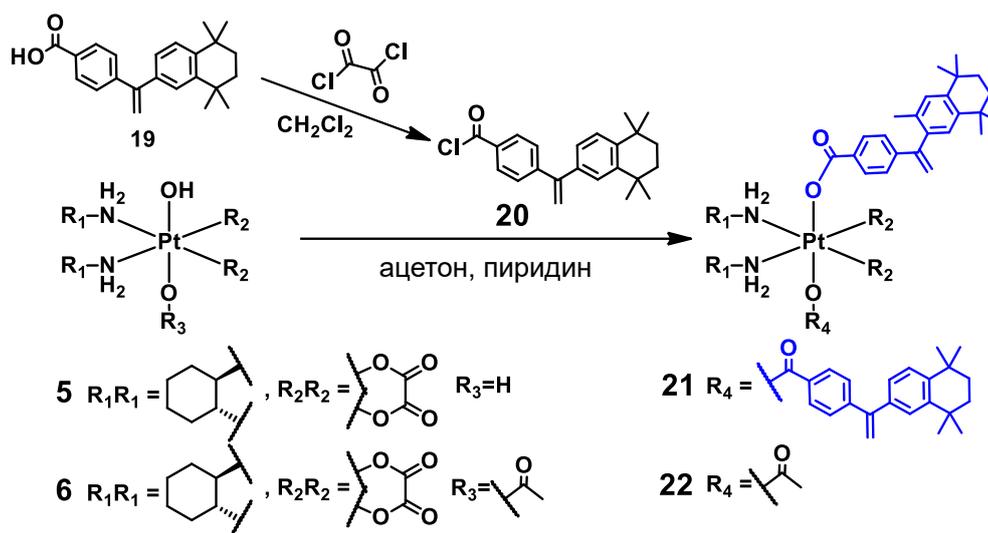


Схема 5. Синтез комплексов Pt(IV) с фрагментом бексаротена в аксиальном положении.

Для получения аналогов цисплатина **25-27** с фрагментом бексаротена применяли подход, аналогичный синтезу соединений **16-18** (Схемы 6, 7). В качестве стартовых соединений использовали комплексы **13-15**, свободную карбоксильную группу которых модифицировали амином **24**, содержащим фрагмент бексаротена (Схемы 6, 7).

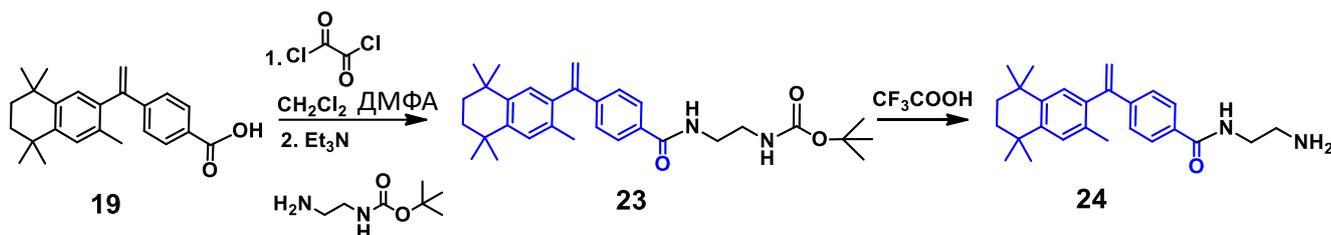


Схема 6. Синтез N-(2-аминоэтил)-4-(1-(3,5,5,8,8-пентаметил-5,6,7,8-тетрагидронафтален-2-ил)винил)бензамида.

Соединения **25-27** выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе этанол/хлористый метилен и получили с умеренными выходами 25-46%.

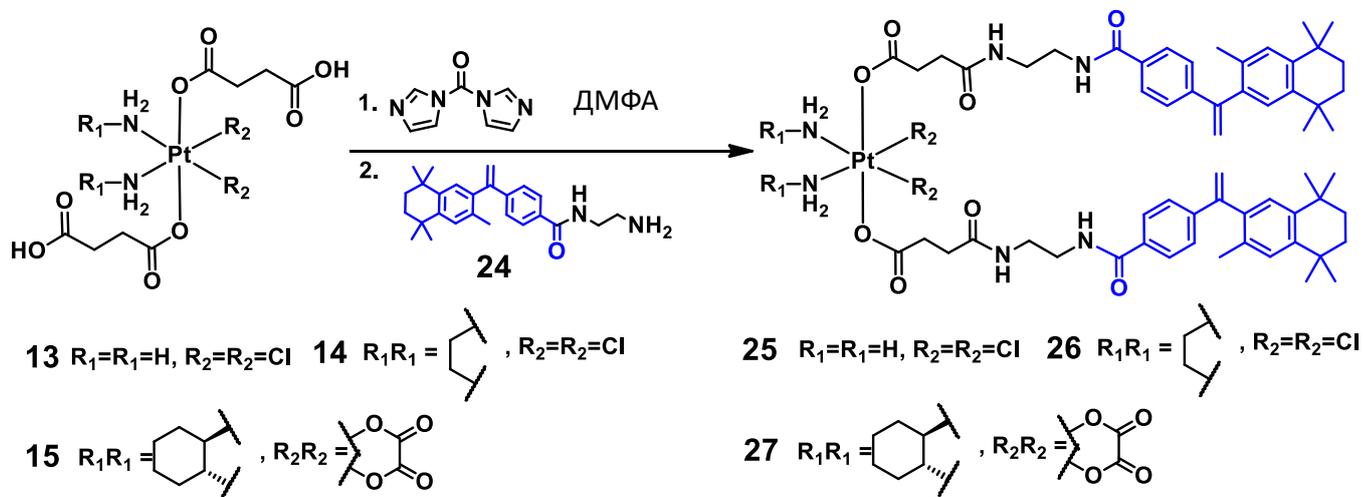


Схема 7. Синтез комплексов Pt(IV) с лигандом на основе лонидинамина – производных (3-карбоксипропаноато)платины (IV).

Состав, чистота и строение полученных соединений **7-10, 16-18, 21, 22, 25-27** подтверждены данными элементного анализа, масс-спектрометрии ИЭР и ЯМР спектроскопии. Строение новых комплексов платины было установлено с использованием ЯМР спектроскопии ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, ^{15}N и ^{195}Pt . Полное соотнесение сигналов было произведено с помощью корреляционной спектроскопии ЯМР $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC и $^1\text{H},^{15}\text{N}$ COSY комплексов **7-10, 21, 22**.

В спектре ЯМР ^1H комплексов **7-9, 16-18, 21 и 25-27** наблюдается один набор сигналов, соответствующих органическому фрагменту (лонидамина или бексаротена), интегрируемых с протонами экваториального платинового центра в соотношении 2:1. Это подтверждает образование дизамещенных комплексов с двумя молекулами лиганда в аксиальных положениях. Для комплексов **10** и **22** в спектре ЯМР ^1H при интегрировании сигналов наблюдали соотношение 1:1, а также наличие синглета в области 2 м.д., соответствующего протонам $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ группы, что указывает на образование моно-функционализированных продуктов. В спектрах ЯМР ^1H соединений **16-18 и 25-27** наблюдается смещение сигналов протонов метильных групп в сильное поле ($\delta \sim 2.46$ и 2.29 м.д.) по сравнению с исходными комплексами **13-15** ($\delta \sim 2.70$ и 2.66 м.д.), что подтверждает образование амидной связи. В спектре ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ комплексов **7-10 и 21, 22** наблюдается смещение сигнала карбонильной группы по сравнению с исходными лонидамином и бексаротеном, что свидетельствует о координации лиганда к атому платины с образованием карбоксилата.

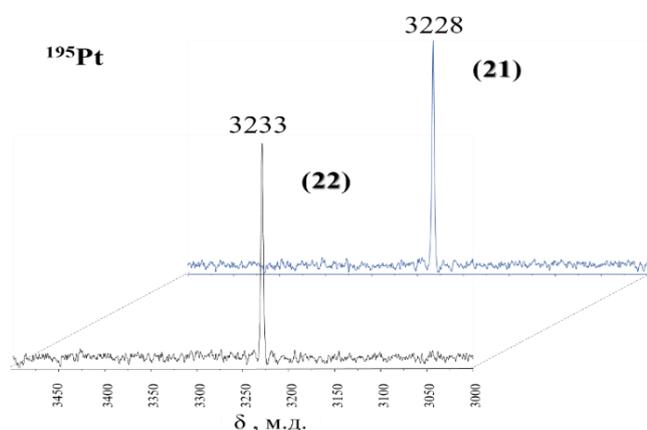


Рис. 1. Спектры ЯМР ^{195}Pt комплексов **21 и 22** и **27** химический сдвиг в области 3200 м.д. (Рис. 1), что указывает на образование комплекса $\text{Pt}(\text{IV})\text{N}_2\text{O}_4$. Наличие единственного сигнала в спектре ЯМР ^{195}Pt соединений **7-10, 16-18, 21, 22, 25-27**, значения химических сдвигов и изменение по сравнению с исходными соединениями **3-6 и 13-15** указывают на образование новых комплексов $\text{Pt}(\text{IV})$.

В масс-спектрах ИЭР комплексов **7-10, 21 и 22** в метаноле наблюдаются наиболее интенсивные пики, соответствующие $[\text{M} - \text{H}^+]^-$ (для отрицательных ионов) и $[\text{M} + \text{Na}^+]^+$ (для положительных ионов), а для комплексов **16-18 и 25-27** соответствующие сигналам $[\text{M} + \text{Na}^+]^+$ (для

Химические сдвиги в спектрах ^{195}Pt чувствительны к степени окисления, координационному числу, природе донорных атомов и геометрии платинового центра. Для соединений **7, 8; 16, 17 и 25, 26** в спектре ЯМР ^{195}Pt наблюдаются сигналы с химическим сдвигом в области 2400-2900 м.д., что указывает на образование комплекса типа $\text{Pt}(\text{IV})\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$, а для комплексов **9, 10; 18; 21, 22**

положительных ионов) и $[M - H^+]^-$ (для отрицательных ионов), и согласующиеся с предсказанным изотопным распределением, что подтверждает молекулярную формулу полученных соединений.

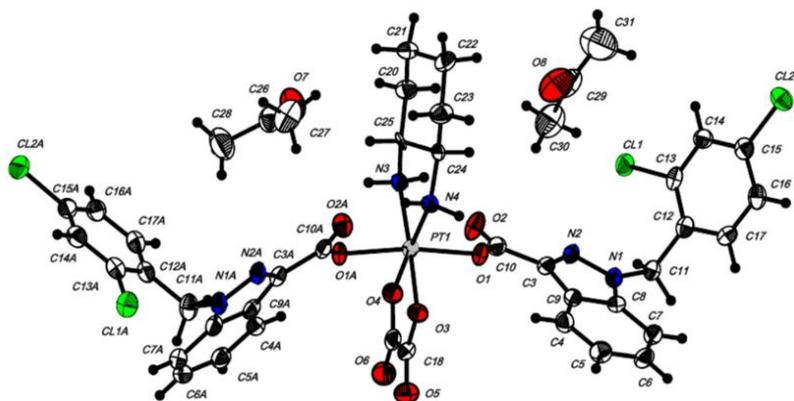


Рис. 2 Молекулярная структура комплекса **9**.

Молекулярная структура комплекса **9** была подтверждена методом рентгеноструктурного анализа при (Рис. 2). В кристаллическом состоянии комплекс **9** является мономером с искаженной октаэдрической геометрией вокруг платинового центра (Рис. 2).

Поиск и разработка нового лекарственного соединения включают как исследования фармакокинетического профиля вещества, так и определение физико-химических параметров, отвечающих за биоактивность и биодоступность. Одним из важных свойств, характеризующих способность проникать через клеточные мембраны, является липофильность, оцениваемая параметром – коэффициент липофильности ($\log P_{\text{октанол/вода}}$).

Таблица 1. Липофильность комплексов **7-10**.

| Соединение | logP | |
|------------|--------------------|------|
| | Метод встряхивания | МЭКХ |
| 1 | 1.30 | 1.30 |
| 7 | 1.76 | 1.69 |
| 8 | 1.31 | 1.60 |
| 9 | 1.79 | 1.77 |
| 10 | 1.84 | 1.84 |

В таблице 1 представлены результаты оценки липофильности соединений **7-10** двумя методами (встряхивания и мицеллярной электрокинетической хроматографии), данные которых хорошо согласуются. Результаты показывают, что значение липофильности не зависит от природы экваториального лиганда и близки для комплексов **7-10***

2.1.2. Синтез и физико-химические свойства металлоорганических соединений Ru(II) и комплексов Ru(III) с лигандами на основе лонидамин и бексаротена

Соединения **34-39** – модифицированные производные лонидамин, получали взаимодействием 1-(2,4-дихлоробензил)-1H-индазол-3-карбонил хлорида **2**, с эквимольным количеством соответствующего амина **28-33** в присутствии триэтиламина и выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле в системах этанол–хлористый метилен. Амиды **34-38** вводили во взаимодействие с эквимольным количеством димера $[(4\text{-изопропилтолуол})\text{RuCl}_2]_2$ в хлористом метиле (Схема 8) и получали металлоорганические соединения **45-49** в виде оранжевых порошков с выходами 50-82%.

* Исследование липофильности выполнено совместно с к.х.н., с.н.с. лаборатории концентрирования ГЕОХИ РАН Л.С. Фотеевой.

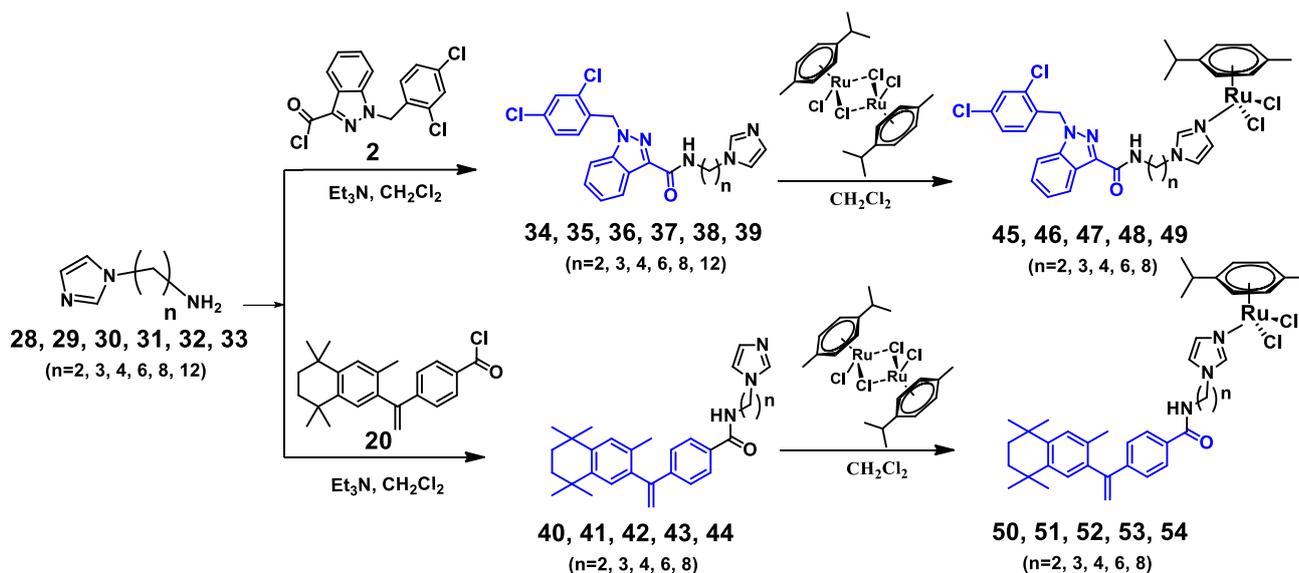


Схема 8. Синтез лигандов и металлоорганических соединений Ru(II) основе лонидамина и бексаротена.

Бексаротен был также использован для введения в структуры металлоорганических соединений Ru(II). Амиды **40-44** на его основе получали аналогично соединениям **34-39** взаимодействием 4-(1-(3,5,5,8,8-пентаметил-5,6,7,8-тетрагидро-2-нафтил)винил)бензил хлорида, полученного *in situ*, с соответствующим амином (**28-33**) в присутствии триэтиламина. В результате реакции **40-44** с эквимолярным количеством димера [(4-изопропилтолуол)RuCl₂]₂ получена серия металлоорганических производных **50-54** на основе бексаротена в виде оранжевых порошков с хорошими выходами (46-80%) (Схема 8). Состав, чистота и строение полученных лигандов **34-44** и металлоорганических соединений **45-54** были подтверждены данными элементного анализа, масс-спектрометрии ИЭР и ЯМР спектроскопии.

Для соединений **34-39** и **40-44** в спектре ЯМР ¹H в области 7.10÷7.19 и 6.29÷6.81 м.д. наблюдаются триплеты протонов NH групп с константой спин-спинового взаимодействия с протонами соседней CH₂ группы линкера J~5.7 Гц, что подтверждает образование амидной связи. При δ = 3.93÷4.25 и 3.44÷3.77 м.д. регистрируются триплет и квадруплет метиленовых групп фрагментов N-CH₂ и NH-CH₂ углеводородной цепи линкера. В спектре ЯМР ¹³C{¹H} соединений **34-39** и **40-44** наблюдается заметное смещение сигнала карбонильной группы по сравнению с исходными и лонидамином и бексаротеном. В спектре ЯМР ¹H металлоорганических соединений **45-54** регистрируется смещение сигналов протонов CH-N=CH имидазольного кольца по сравнению с исходными **34-38** и **40-44**, что подтверждает координацию группы имидазола к атому Ru.

В масс-спектрах ИЭР лигандов **34-39** и **40-44** наблюдаются наиболее интенсивные пики, соответствующие протонированной форме [M + H]⁺ (для положительных ионов), а в масс-спектрах металлоорганических соединений **45-49** и **50-54** пики, соответствующие иону [M-Cl]⁺ и согласующиеся с предсказанным изотопным распределением.

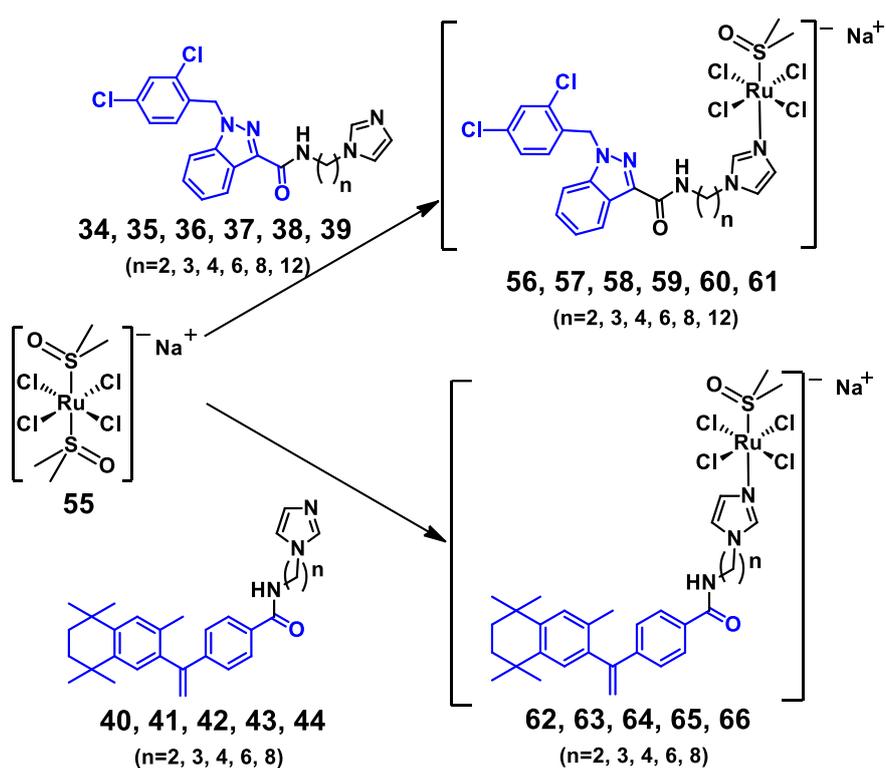


Схема 9. Синтез комплексов **56-66** Ru(III).

Лиганды **34-44** вводили во взаимодействие с эквимолярным количеством комплекса **55** в ацетоне для получения комплексов Ru(III) – аналогов NAMI-A. (Схема 9). Комплексы **56-66** выделяли с использованием метода колоночной хроматографии. Соединения **56-66** были получены в виде желтых и оранжевых порошков с выходами 41-95%.

Комплексы Ru(III) являются парамагнитными, поэтому в спектрах ЯМР ^1H

данных соединений все сигналы уширены, что делает затруднительным использование ЯМР спектроскопии для характеристики полученных соединений. Состав, чистота и строение полученных комплексов **56-66** подтверждены данными элементного анализа и масс-спектрометрии ИЭР. Для комплексов **56-66** в масс-спектрах наблюдаются характерные сигналы, соответствующие $[\text{M}-\text{Na}^+]^-$, изотопное распределение которых хорошо согласуется с расчетным.

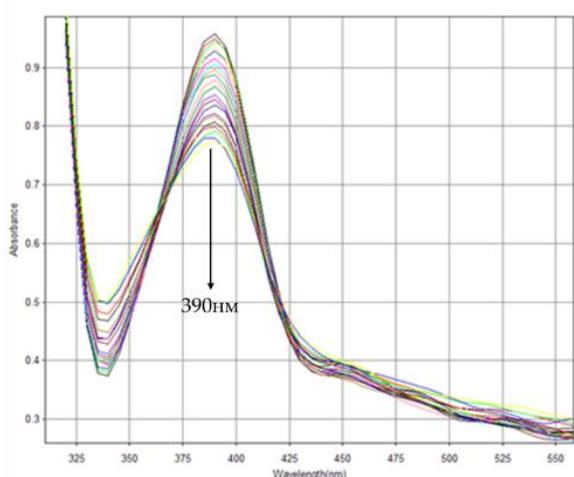


Рис. 3. Изменение электронных спектров поглощения для соединения **57** ($\Delta t = 2.5$ мин).

наблюдается уменьшение значения оптической плотности максимума поглощения (Рис. 3). Характеристикой стабильности является время полупревращения соединения или время полугидролиза ($t_{1/2}$).

Для понимания механизмов взаимодействия соединений Ru(III) с биологическими мишенями, а также механизма метаболизма противораковых соединений изучена стабильность комплексов **56-66** методом спектрофотометрии в буферных растворах, близких к физиологическим условиям. Комплексы **56-66** являются хорошо растворимыми окрашенными соединениями и характеризуются интенсивной полосой поглощения в видимой области спектра ($\lambda_{\text{max}}=390$ нм) (Рис. 3). В ходе гидролиза

Таблица 2. Времена полупревращения $t_{1/2}$ для комплексов Ru(III).

| Соединение | $t_{1/2}$, сек | Соединение | $t_{1/2}$, с |
|------------|-----------------|------------|---------------|
| 56 | 360±20 | 62 | 660±30 |
| 57 | 330±20 | 63 | 760±40 |
| 58 | 360±20 | 64 | 300±20 |
| 59 | 650±30 | 65 | 610±30 |
| 60 | 1390±70 | 66 | 510±30 |
| 61 | 2150±110 | | |

Для комплексов **62-66** с фрагментом бексаротена не наблюдается явной зависимости между длиной линкера и временем полупревращения, наиболее стабильным является комплекс **63**. Для комплексов **56-61** с фрагментом лонидамина, наблюдается выраженная зависимость увеличения стабильности

комплексов с увеличением длины линкера, и наиболее стабильным комплексом является соединение **61** (Таблица 2).

Предполагается, что механизм действия комплексов Ru (III) включает восстановление до активных соединений Ru(II). Восстановление в физиологических условиях возможно при действии биологических восстановителей, таких как глутатион, аскорбиновая кислота и цистеин. Для возможности активации восстановлением комплексы Ru(III) должны обладать биологически достигаемыми потенциалами восстановления (-0.4-0.8 В). Редокс-поведение лигандов **35** и **41** и комплексов **56-66** изучали в CH₃CN на Pt и стеклоуглеродном электродах. Для лигандов переходов не наблюдалось вплоть до потенциалов разряда фонового электролита n-Bu₄NBF₄^{*}.

В катодной области потенциалов комплексов **56-61** наблюдается одноэлектронный пик при значениях от - 80 до - 310 мВ при измерениях на Pt электроде и при значениях от - 128 до - 410 мВ при измерениях на стеклоуглеродном электроде. Значения потенциала, согласно литературным данным, соответствуют процессу восстановления Ru(III) до Ru(II). Из полученных данных можно сделать вывод, что комплексы могут подвергаться восстановлению биологическими восстановителями, а длина углеводородного линкера в лиганде незначительно сказывается на значениях редокс-потенциалов.

Для лигандов **34-44** также изучена липофильность методом ВЭЖХ и определены значения logP (Таблица 3). Соединения на основе бексаротена **40-44** являются более липофильными по сравнению с лигандами на основе лонидамина **34-39**. Для всех соединений **34-44** прослеживается увеличение липофильности с увеличением длины линкера.

Липофильность комплексов **56-66** изучали методом встряхивания и регистрировали спектрофотометрически (Таблица 3). В ряду комплексов наибольшей липофильностью обладают соединения с длиной линкера n=8 и 12 (**61**, **65** и **66**), что коррелирует с данными о липофильности лигандов.

* Электрохимические исследования выполнены совместно с к.х.н., доцентом химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова В.Ю.Тюриным.

Таблица 3. Значения logP для соединений **34-44** и **56-66**.

| n | Соединение | logP | Соединение | logP | Соединение | logP | Соединение | logP |
|----|------------|------|------------|------|------------|------|---|------|
| 2 | 34 | 3.3 | 40 | 2.6 | 56 | * | 62 | 0.55 |
| 3 | 35 | 3.0 | 41 | 3.7 | 57 | * | 63 | 0.81 |
| 4 | 36 | 4.1 | 42 | 5.4 | 58 | * | 64 | 0.66 |
| 6 | 37 | 4.3 | 43 | 4.9 | 59 | 0.6 | 65 | 1.33 |
| 8 | 38 | 4.4 | 44 | 5.6 | 60 | 0.53 | 66 | 1.1 |
| 12 | 39 | 4.8 | | | 61 | 1.3 | *: Комплексы не стабильны в водном растворе | |

2.1.3. Синтез и физико-химические свойства гетероядерных комплексов Ru(II)-Pt(IV)

Комбинация атомов платины и рутения в одной молекуле может привести к уникальной активности, поэтому целью данной части работы был синтез гетероядерных соединений Ru(II)-Pt(IV), как потенциальных противораковых агентов, и исследование их биологической активности.

Для получения гетероядерных соединений Ru(II)-Pt(IV) предварительно синтезировали комплексы Pt(IV) **67-69**, на основе **14** и аминов **29, 31** и **32** с длиной цепи n=3, 6, 8. Соединения **67-69** выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе метанол/хлористый метилен. Комплексы **67-69** получены в виде желтых гигроскопичных порошков с выходами 32-77% (Схема 10).

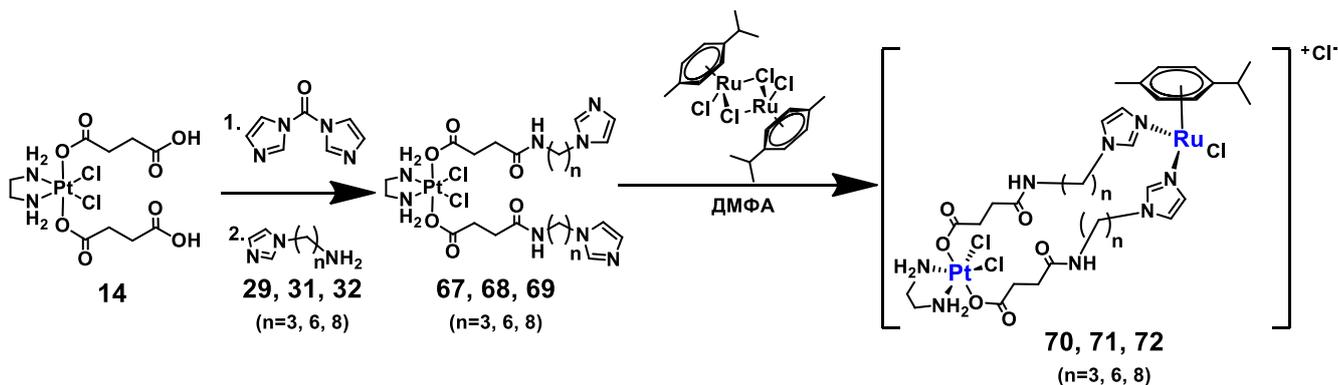


Схема 10. Синтез гетероядерных комплексов Ru(II)-Pt(IV).

На основе комплексов **67-69** в результате реакции с рутениевым димером в соотношении 2:1 получили соединения **70-72** в виде гигроскопичных оранжевых порошков с высокими выходами 70-86%. Состав, чистота и строение полученных соединений **67-72** подтверждены данными элементного анализа, масс-спектрометрии ИЭР и ЯМР спектроскопии.

В ЯМР спектрах ^1H наблюдается смещение в слабое поле сигналов протонов фрагмента имидазола при координации к атому рутения **67-69** (7.68, 7.14 и 6.98 м.д. соответственно) и получении гетероядерных соединений Ru(II)-Pt(IV) **70-72** (8.05-7.95, 7.26 и 7.29-7.12 соответственно). Синглеты протонов группы имидазола для соединений **67-69** при координации к атому Ru переходят в мультиплеты в спектрах комплексов **70-72**. Это связано, по-видимому, с

наличием двух имидазольных фрагментов у одного Ru центра и взаимодействием их протонов между собой.

В спектре ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ соединений **70-72** наблюдается смещение сигналов атомов углерода N-CH=N имидазольного кольца (140.0÷141.4 м.д.) по сравнению с исходными лигандами **67-69** (137.0÷137.8 м.д.), что свидетельствует о координации к атому рутения атома N имидазольного фрагмента. В масс-спектрах ИЭР лигандов **67-69** наблюдаются наиболее интенсивные пики положительных ионов, соответствующие протонированной форме $[\text{M} + \text{H}^+]^+$, а в масс-спектрах соединений **70-72** соответствующие иону $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ и согласующиеся с предсказанным изотопным распределением.

2.2. Исследование биологической активности соединений Pt и Ru*

Для всех новых соединений определена цитотоксичность по отношению к раковым клеткам с использованием МТТ теста и выражена в виде концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}). Соединения, обладающие наиболее выраженной активностью и селективностью, были выбраны для дальнейших *in vitro* и *in vivo* исследований.

Для соединений **7-10**, **16-18**, **21**, **22**, **25-27** исследование цитотоксичности проводили на клетках аденокарциномы толстой кишки человека SW480, аденокарциномы молочной железы человека MCF7 и её доксорубицин-резистентного аналога MCF7D и аденокарциномы легкого человека A549. В качестве сравнения исследование цитотоксичности проводили на клетках линии HaCaT (спонтанно immortalized *in vitro* кератиноциты из гистологически нормального эпителия человека). Оценку цитотоксичности проводили при сравнении с исходными органическими соединениями лонидамином (**1**) и бексаротеном (**19**), и клинически используемым цисплатином (Таблица 4).

В ряду всех серий соединений платины (**7-10**, **16-18**, **21**, **22**, **25-27**) наиболее активными оказались комплексы **7-10**, в которых платиновый центр связан непосредственно с карбоксилатной группой. Данные соединения на порядок активней лонидамина и цисплатина. Все соединения обладают наибольшей активностью на клетках рака молочной железы MCF7. Несмотря на то, что для лонидамина и цисплатина значения IC_{50} на доксорубицин/цисплатин-резистентной линии MCF7D в 3-5 раз выше, чем на MCF7, соединения **7-10** одинаково эффективны на двух клеточных линиях.

* Исследования цитотоксичности лигандов и соединений Ru(II) проведены в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ в Институте химического канцерогенеза под руководством к.б.н. К.И. Кирсановым. Исследования цитотоксичности комплексов Ru(III) проведены в ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН под руководством к.х.н. Е.Ф. Шевцовой.

Таблица 4. Цитотоксичность комплексов Pt(IV): **7-10, 16-18, 21, 22, 25-27**.

| Соединение | IC ₅₀ , μM | | | | |
|---|-----------------------|----------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| | SW480 | A549 | MCF7 | MCF7D | HaCat |
| <i>Комплексы Pt(IV) на основе лонидамина</i> | | | | | |
| | SW480 | A549 | MCF7 | MCF7D | HaCat |
| цисплатин | 14±4.4 | 29.0±10 | 14±7 | 75±5.8 | 30±10 |
| оксалиплатин | 0.9±0.3 | 11.5±3.9 | 43.8 | | |
| 1 | >90 | >90 | 30±10 | 60±5 | 25±10 |
| 7 | 1±0.5 | 2.1±0.7 | 0.45±0.3 | 0.6±0.15 | 2.5±1.1 |
| 8 | 0.13±0.06 | 1.5±0.9 | 0.03±0.008 | 0.07±0.024 | 0.04±0.015 |
| 9 | 0.7±0.2 | 1.2±0.4 | 0.5±0.25 | 0.33±0.01 | 1.2±0.5 |
| 10 | 2.1±1.0 | 3.9±2.4 | 0.5±0.2 | 0.5±0.1 | 0.21±0.06 |
| 16 | 48±6 | >100 | 27±4 | 53±7 | >100 |
| 17 | 43±1 | >100 | 3.4±0.5 | 5.9±0.1 | 42±8 |
| 18 | >100 | >100 | 56±12 | >100 | >100 |
| <i>Комплексы Pt(IV) на основе бексаротена</i> | | | | | |
| | SW480 | A549 | MCF7 | MCF7D | HaCat |
| 19 | 80±10 | 85±9 | 67±13 | 71±21 | >90 |
| 21 | >100 | 83±16 | >100 | >100 | >100 |
| 22 | 11±1.6 | 10±1 | 0.47±0.07 | 4.8±0.5 | 8±1.3 |
| 25 | 24±0,8 | >100 | 50±6 | >100 | 48±10 |
| 26 | 0.8±0.1 | 1±0.01 | 0.75±0.1 | 0.85±0.1 | 0.7±0.01 |
| 27 | 35±0.6 | 52±5 | 23±5 | 24±3.2 | 23±2.5 |

Комплексы **16-18** с дополнительным линкером обладают в 50-100 раз меньшей активностью. Наиболее интересным из данной серии веществ является комплекс **17**, который обладает высокой специфичностью по отношению к клеткам рака молочной железы MCF7 и MCF7D и в 50 раз более токсичен при действии на данные линии клеток рака человека, чем на линии HaCat нормального эпителия.

В сериях комплексов на основе бексаротена **21, 22** и **25-27** наибольшей цитотоксичностью обладают соединения **22** и **26**. В отличие от производных лонидамина для данных комплексов активность не зависит от типа связи платинового и бексаротенового фрагментов.

Соединение **22** также проявляет селективность при действии на клеточную линию рака молочной железы MCF7 по сравнению с клетками нормального эпителия HaCat. Комплекс **26** показывает цитотоксичность в 50-100 большую, чем у аналогов **25** и **27** и одинаково эффективен на всех исследуемых клеточных линиях со значением IC₅₀ ~ 1 μM.

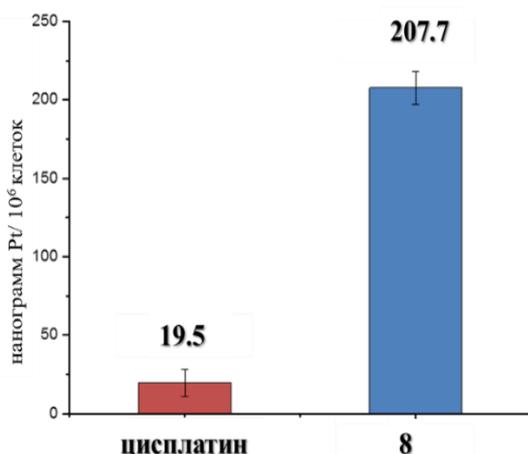


Рис. 4. Накопление платины в MCF7 клетках.

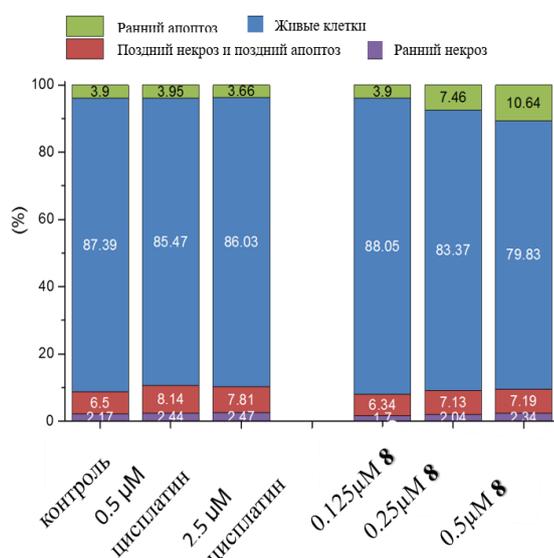


Рис. 5. Изучение механизма гибели раковых клеток (клеточная линия MCF7).

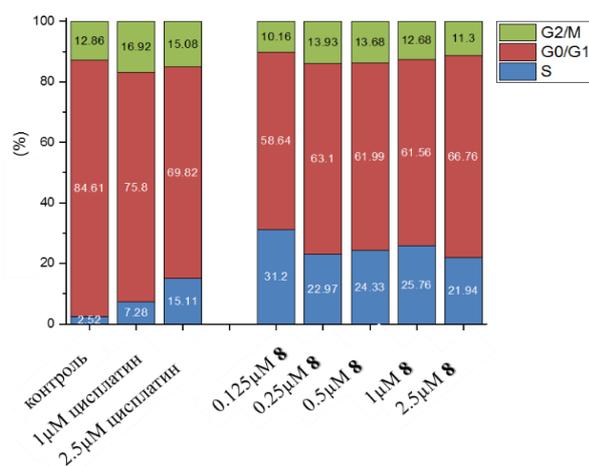


Рис. 6. Изучение влияния комплекса 8 на клеточный цикл (линия MCF7).

Наибольшей цитотоксичностью в ряду всех полученных соединений Pt обладает комплекс с лонидамином **8**, проявляющий активность в наномолярных концентрациях на всех клеточных линиях. Комплекс **8** в 1000 раз более активен, чем исходные лонидамин и цисплатин. Для понимания механизма действия данный комплекс был выбран для дальнейшего исследования в *in vitro* и *in vivo* тестах. Исследовано накопление комплекса **8** в клетках рака молочной железы MCF7, как наиболее чувствительной к действию данного соединения*.

Показано, что накопление комплекса **8** в 10 раз больше чем для цисплатина (Рис. 4), что согласуется с данными МТТ-теста, в котором соединение в 1000 раз более активно, чем цисплатин (Таблица 4).

Исследования механизма гибели клетки при действии комплекса **8** показали, что он индуцирует ранний апоптоз в 3 раза более эффективно, чем цисплатин при одинаковой концентрации и вызывает сравнимую с цисплатином степень позднего некроза и позднего апоптоза (Рис. 5).

Дополнительное исследование изменения клеточного цикла клеток линии MCF7 при действии соединения **8** показало, что комплекс оказывает влияние на клеточный цикл и эффективно тормозит переход из фазы S в фазу G2 (Рис. 6).

Для оценки возможности использования соединения **8** в качестве цитостатика исследована острая общерезорбтивная токсичность на линии мышей Balb/c. Выявлено, что максимально переносимая доза для комплекса **8** >125 мг/кг. Результаты токсикометрии, а также данные некропсии позволяют отнести соединения **8** к IV классу токсичности (малотоксичные вещества).

* Биохимические исследования комплекса платины проведены на факультете биологии и химии Университета Гонконга под руководством профессора Гуангу Жу.

Таблица 5. Распределение **8** по органам.

| орган | Pt нг /г | | |
|--------------|----------|--------|--------|
| | 30 мин | 4 ч | 24 ч |
| печень | 64.45 | 425.49 | 394.20 |
| почка | 376.16 | 73.93 | 69.97 |
| легкое | 39.28 | 16.63 | 21.47 |
| мозг | 0.18 | 0.35 | 0.36 |
| клетки крови | 25.23 | 2.37 | 8.15 |
| плазма | 15.67 | 4.59 | 4.93 |

Дополнительно получены первичные данные фармакокинетики при определении распределения Pt (соединение **8**) по органам мышей Balb/c при однократном введении в дозе 75 мг/кг. Распределение определяли как концентрацию Pt в органе методом ИСП-МС (Таблица 5). Наблюдается очевидное накопление платины в органах выведения и легких, что делает вещество перспективным для дальнейших исследований*.

Для соединений **34-44**, **45-54** и **56-66** исследование цитотоксичности проводили на клетках SW480, MCF7 и A549. Для соединений **56-66** дополнительно исследовали цитотоксичность на клетках нейробластомы человека SH-SY5Y. Оценку цитотоксичности проводили при сравнении с исходными органическими соединениями лонидамином (**1**) и бексаротеном (**19**), и цисплатином (Таблицы 6-8).

Таблица 6. Значения IC₅₀ для лигандов на основе бексаротена и лонидамина (инкубация 72ч).

| Соединение | Линкер, n | IC ₅₀ , μM | | |
|------------------------|-----------|-----------------------|------------|----------|
| | | A549 | MCF7 | SW480 |
| 1 (лонидамин) | | >90 | >90 | 30±10 |
| 34 | 2 | 50 ± 16 | 35 ± 6 | 48 ± 10 |
| 35 | 3 | >90 | >90 | >90 |
| 36 | 4 | 25 ± 7 | 22 ± 6 | 28 ± 8 |
| 37 | 6 | 24 ± 10 | 17 ± 2.5 | 16 ± 6 |
| 38 | 8 | 15 ± 6 | 10 ± 2 | >90 |
| 39 | 12 | 15.0± 2.2 | 20.8± 4.7 | 8.4± 1.6 |
| 19 (бексаротен) | | 85 ± 9 | 67 ± 13 | 80± 10 |
| 40 | 2 | 16 ± 5 | 11.0 ± 1.2 | 18 ± 7 |
| 41 | 3 | >90 | >90 | >90 |
| 42 | 4 | >90 | >90 | >90 |
| 43 | 6 | >90 | 35 ± 5 | >90 |
| 44 | 8 | >90 | >90 | 65 ± 12 |

Лиганды на основе лонидамина **34-39** обладают большей цитотоксичностью, чем исходный лонидамин. При этом соединение **35** показало низкую активность. В целом для соединений **34-39** наблюдается увеличение значений цитотоксичности с увеличением длины линкера. Наиболее активными являются соединения **38** и **39**.

Лиганды на основе бексаротена **40-44** обладают цитотоксичностью, близкой к исходному органическому соединению. Исключение составляет соединение **40**, которое в ~4 раза более токсично, чем бексаротен.

* Исследования общерезорбтивной токсичности проведены в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ под руководством д.м.н. А.А. Штиля

Металлоорганические соединения Ru **45-54**, полученные на основе соответствующих лигандов, являются более цитотоксичными, чем исходные лонидамин и бексаротен. При этом соединения **50-54** с фрагментом бексаротена являются более активными, чем аналогичные соединения с лонидамином **45-49**.

Наиболее активными металлоорганическими производными с фрагментом лонидамина являются соединения **45-47** с длиной линкера $n=2, 3$ и 4 . Интересно отметить, что исходные лиганды **34, 36-38** являются более активными, чем соединения рутения **45, 47-49**. А координация неактивного лиганда **35** к атому Ru(II) приводит к увеличению активности в 3-4 раза для вещества **46**, которое является одним из наиболее эффективных в данном ряду. Соединение **46** также характеризуется некоторой специфичностью по отношению к клеточной линии рака молочной железы MCF7 (Таблица 8).

Таблица 7. Значения IC_{50} металлоорганических соединений на основе бексаротена и лонидамина (инкубация 72ч).

| Соединение | Линкер, n | IC_{50} , μM | | |
|------------------------|-----------|---------------------|---------|--------|
| | | A549 | MCF7 | SW480 |
| 1 (лонидамин) | | >90 | >90 | 30±10 |
| 45 | 2 | 39±2.3 | 41±1.8 | 34±4 |
| 46 | 3 | 37±4.4 | 18±2.8 | 30±7 |
| 47 | 4 | 29±6 | 20±3,1 | 25±0.3 |
| 48 | 6 | 55±3 | 48±1.1 | 41±2 |
| 49 | 8 | 74±4 | 65±3 | 45±4 |
| 19 (бексаротен) | | 85 ± 9 | 67 ± 13 | 80± 10 |
| 50 | 2 | 52±6 | 23±4 | 49±0.1 |
| 51 | 3 | 22±1,6 | 22±1.6 | 24±1.3 |
| 52 | 4 | 23±3 | 10±1.7 | 12±2,2 |
| 53 | 6 | 20±1.2 | 15±4 | 23±1.3 |
| 54 | 8 | 40±3.7 | 10±0.8 | 26±3 |

Для лигандов **41-44** на основе бексаротена координация к атому Ru(II) приводит к более активным металлоорганическим соединениям **51-54**. Таким образом наблюдается синергизм действия двух биологически активных фрагментов (бексаротенового и рутениевого). Соединения **50-54** также проявляют селективность по отношению к клеткам рака молочной железы MCF7, по отношению к которой в 2 раза более активны, чем исходный бексаротен.

Комплексы Ru(III) обладают большей цитотоксичностью, чем исходные лонидамин и бексаротен и большинство лигандов **34-44**. В случае комплексов **56-61**, как и у лигандов **34-39**, наблюдается увеличение активности с увеличением длины линкера. Наибольшую активность проявляют комплексы **60** и **61**, которые также являются более активными чем цисплатин.

Все комплексы на основе бексаротена **62-66** являются более активными, чем цисплатин. Однако наиболее интересные результаты были получены для клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Комплекс **63** с длиной линкера $n=3$ проявляет избирательную активность на данной линии в области наномолярных концентраций. При этом аналоги, отличающиеся на одну CH_2 группу (**62** и **64**), на несколько порядков менее активны, чем **63**. Таким образом данное соединение было выбрано в качестве соединения-лидера, и для него были проведены дополнительные исследования.

Таблица 8. Значения IC_{50} для комплексов Ru(III) с фрагментом лонидамина и бексаротена.

| Соединение | Линкер, n | IC_{50} , μM | | | |
|------------------------|-----------|----------------------------------|------------------|--|------------------|
| | | A549 | MCF7 | SH-SY5Y | SW480 |
| цисплатин | | 23 ± 6.5 | >30 | 9.5 ± 0.1 | 21.7 ± 0.5 |
| 1 (лонидамин) | | >90 | 30 ± 10 | >30 | >90 |
| 56 | 2 | >30 | 20.39 ± 0.04 | 25.8 ± 4.5 | 21.4 ± 1.8 |
| 57 | 3 | >30 | 23.05 ± 0.51 | 26.1 ± 5.5 | 25 ± 7.1 |
| 58 | 4 | >30 | >30 | 27.7 ± 3.3 | 21 ± 1.8 |
| 59 | 6 | 12.94 ± 0.97 | 22.01 ± 0.7 | 5.12 ± 2.5 | 19.57 ± 3.91 |
| 60 | 8 | 5.95 ± 2.57 | 17.06 ± 0.3 | 2.64 ± 1.5 | 9.28 ± 0.09 |
| 61 | 12 | 8.1 ± 1.1 | 9.2 ± 0.1 | 6.1 ± 0.3 | 9.6 ± 1.3 |
| 19 (бексаротен) | | 85 ± 9 | 67 ± 13 | 24.8 ± 7.3 | 80 ± 10 |
| 62 | 2 | 10.1 ± 2 | 7.2 ± 0.1 | 6.7 ± 0.1 | 7.9 ± 0.2 |
| 63 | 3 | 13.4 ± 0.7 | 18.3 ± 1.2 | 0.02859 ± 0.0007 | 10 ± 3 |
| 64 | 4 | 18.4 ± 2.3 | 18.9 ± 8.4 | 10.9 ± 9.8 | 18 ± 9.3 |
| 65 | 6 | 18.1 ± 1.4 | 19.9 ± 11.5 | 10 ± 7.3 | 21.2 ± 11.7 |
| 66 | 8 | 20.9 ± 4.1 | 25 ± 7.1 | 11.6 ± 8.1 | 27 ± 4.2 |

Для исследования связывания с транспортными белками было выбрано соединение **63**, которое проявляет наибольшую активность в серии комплексов Ru(III) на основе бексаротена. Исследование связывания проводили с использованием метода регистрации масс-спектрометрии ИСП (10 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, концентрация NaCl 100 мМ, 37°C) при концентрации соединения **38** $2.5 \cdot 10^{-5}$ М. В исследуемом растворе поддерживали постоянную концентрацию $5 \cdot 10^{-4}$ и $3 \cdot 10^{-5}$ М альбумина и трансферрина соответственно (в соотношении 20:1 и 1.2:1, как в условиях потока крови)*.

Степень связывания с двумя транспортными белками довольно высокая, через 20-40 мин инкубации комплекс в свободном виде не наблюдали. Соединение характеризуется более быстрым связыванием с альбумином по сравнению с трансферрином. Вероятно, это связано с большей концентрацией альбумина, а не с кинетическими параметрами.

* Исследование связывания комплексов с альбумином и трансферрином выполнено совместно с к.х.н., с.н.с. лаборатории концентрирования ГЕОХИ РАН Л.С. Фотеевой.

Проведена оценка острой общерезорбтивной токсичности наиболее активного соединения **63** с фрагментов бексаротена и его структурного аналога **57** на основе лонидамина. Мышам линии Balb/c вводили раствор соединения **63** внутривнутрибрюшинно в возрастающих концентрациях и наблюдали животных на протяжении 21 суток. Установлено, что максимальная переносимая доза для мышей Balb/c при в/б введении для соединений составляет **57** и **63** составляет 80 мг/кг, и соединения можно отнести к IV классу токсичности (малотоксичные вещества).

Для соединений **67-72** определена цитотоксичность на клетках немелкоклеточного рака легкого A549, прямой кишки SW480 и рака яичников CH1*. Оценку цитотоксичности проводили при сравнении со структурным аналогом – соединением RAPTA-C (Таблица 9).

Таблица 9. Цитотоксичность комплексов **67-69** гетероядерных соединений **70-72**.

| Линкер, n | Соединение | IC ₅₀ , μM | | |
|-----------|------------|-----------------------|---------------|--------------|
| | | A549 | SW480 | CH1 |
| 3 | 67 | 105.43 ± 25.56 | 69.17 ± 8.18 | 3.27 ± 0.55 |
| 3 | 70 | 98.12 ± 30.02 | 59.25 ± 14.76 | 2.05 ± 0.26 |
| 6 | 68 | 37.00 ± 4.08 | 39.29 ± 12.23 | 1.51 ± 0.32 |
| 6 | 71 | 60.30 ± 6.26 | 43.70 ± 10.53 | 1.78 ± 0.28 |
| 8 | 69 | 132.35 ± 52.40 | 30.59 ± 9.50 | 0.594 ± 0.11 |
| 8 | 72 | 46.28 ± 14.97 | 19.89 ± 5.08 | 0.99 ± 0.36 |
| | RAPTA-C | >500 | 170 ± 60 | 65 ± 15 |

Соединения **67-72** существенно более активны, чем RAPTA-C. Для гетероядерных соединений **70-72** наблюдается увеличение активности с увеличением длины линкера. Наибольшей цитотоксичностью обладает комплекс **72** с длиной линкера n=8.

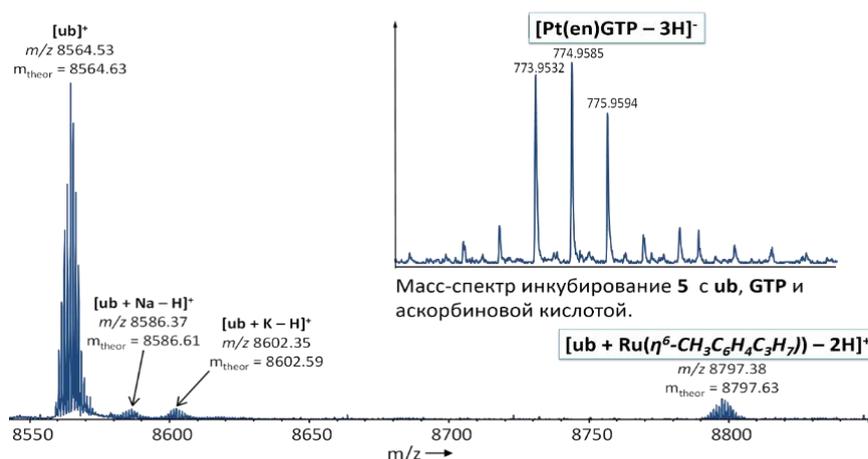


Рис. 7. Масс-спектр после 24 ч инкубирования соединения **70** с убиквитином и гуанозинтрифосфатом в ацетатном буфере.

Для изучения связывания полученных соединений **70-72** с белками и ДНК был использован метод масс-спектрометрии. В качестве модельных соединений использовали убиквитин (ub) и гуанозинтрифосфат (GTP) (Рис. 7).

* Исследования цитотоксичности комплексов проведены в Институте Неорганической Химии Университета Вены (Австрия) под руководством профессора Б.К. Кепплера.

Взаимодействие соединения **70** с убиквитином приводит к появлению сигнала в масс-спектре, соответствующему $[\text{ub} + \text{Ru}(\eta^6\text{-4-изопропилтолуол}) - 2\text{H}]^+$ (Рис. 7). Аддукты, соответствующие взаимодействию Pt с убиквитином, обнаружены не были. Добавление гуанозинтрифосфата приводит к появлению сигнала, соответствующего частице $[\text{Pt}(\text{en})\text{GTP} - 3\text{H}]^-$ (Рис. 7). Таким образом, можно предположить, что для данных соединений характерен мультитаргетный тип взаимодействия (с белками и ДНК).

Известно, что мишенью для соединений Pt является молекула ДНК. В то же время для соединений Ru в большей степени характерно связывание с белками. Мишенью, содержащей молекулу ДНК и гистоновые белки, является нуклеосомная частица. Для соединения RAPTА-С ранее было показано предпочтительное связывание с гистоновыми белками нуклеосомной частицы. Ввиду того, что полученные гетероядерные соединения **70-72** включают фрагмент, структурно схожий RAPTА-С и платиновый центр, мы предположили, что возможно связывание каждого фрагмента со своей мишенью (ДНК или белки). В качестве модели выбрана нуклеосомная частица, которая представляет собой совместную упаковку нити ДНК с гистоновыми белками.

Для соединений **70** и **72** (с наименьшей и наибольшей длиной линкера), отличающихся цитотоксичностью, исследована возможность связывания с нуклеосомной частицей методом рентгеноструктурного анализа.

Для соединения **70** показано, что рутениевый фрагмент связан с белковой частью, в то время как платиновый – направлен в сторону ДНК. Однако длины линкера соединения **70** недостаточно для двойного связывания.

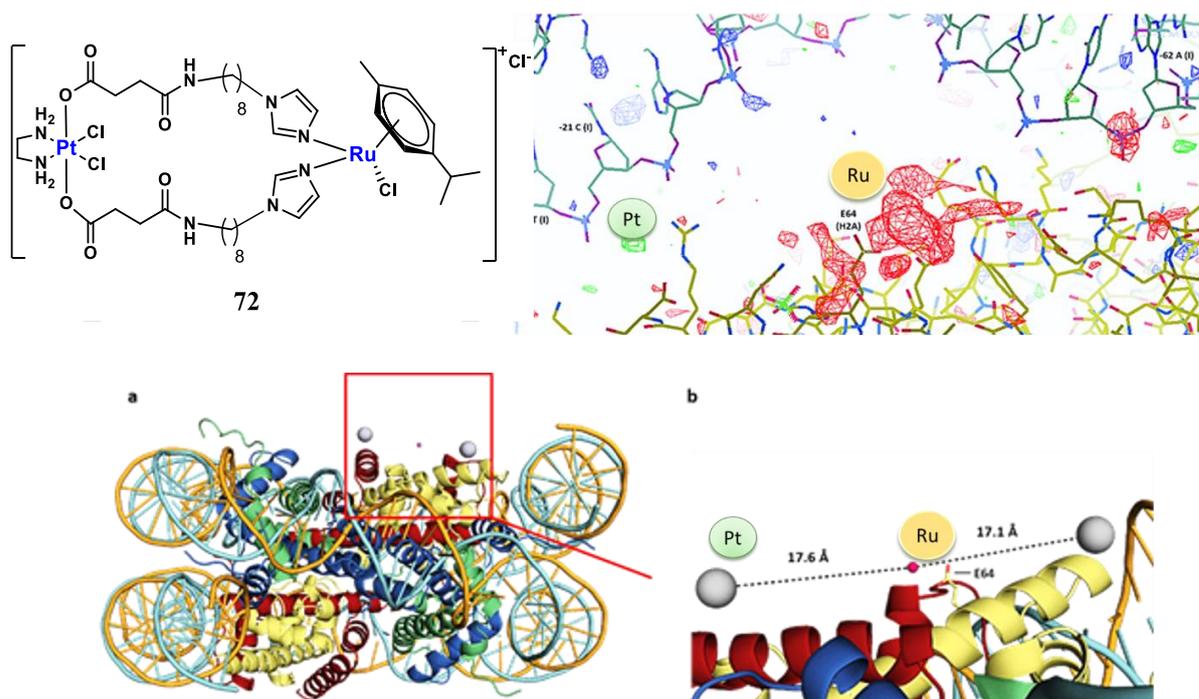
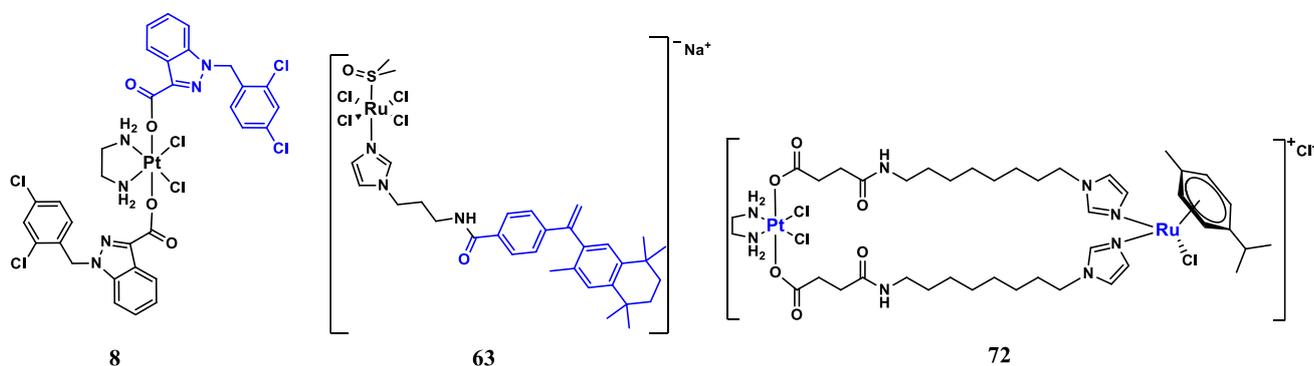


Рис. 8. Связывание соединения **72** с нуклеосомной частицей.

В то же время для комплекса **72** (Рис. 8) повышенная положительная электронная плотность около фрагмента E64 гистона указывает на наличие катиона Ru^{2+} , аренового и имидазольного фрагментов. А сигнал, соответствующий тяжелому платиновому центру, находится вблизи молекулы ДНК. Наблюдается взаимодействие с фосфатными группами нуклеосомной ДНК.

Таким образом, увеличение длины линкера и увеличение расстояния между двумя атомами металлов приводит к возможности двойного связывания. Полученные данные согласуются с исследованием цитотоксичности, в которых комплекс **72** показывает наибольшую активность.

2.3. Выбор соединений лидеров



В ряду полученных соединений каждого класса были выбраны соединения-лидеры. Наибольшую активность *in vitro* в серии соединений платины проявил комплекс Pt(IV) **8**, который также оказался мало токсичен в тестах *in vivo* и показал хорошие результаты по накоплению в клетках и распределению в органах животных.

Среди производных рутения наибольший интерес представляет комплекс **63**, который проявляет избирательную активность в области наномолярных концентраций в тестах *in vitro* на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y и существенно более активен, чем его структурные аналоги. Комплекс характеризуется высокой скоростью связывания с транспортными белками альбумином и трансферрином. Высокий уровень активности **63** в тестах *in vitro* сопряжен с низкой токсичностью в тестах *in vivo*. Результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными, а также данные некропсии позволяют отнести соединение **63** к IV классу малотоксичных веществ.

Для гетероядерных соединений Pt-Ru обнаружено влияние длины линкера на активность и способность связываться с биологическими мишенями. Наиболее перспективным является комплекс **72** показавший высокую активность в тестах *in vitro* на клетках рака человека и характеризующийся специфическим двойным связыванием в нуклеосомной частице (как с геномной ДНК, так и с гистоновыми белками).

Соединения **8**, **63** и **72** были выбраны в качестве соединений-лидеров и представляют интерес для дальнейших расширенных испытаний.

ВЫВОДЫ

1. Предложен общий подход к конструированию физиологически активных соединений с противоопухолевым эффектом действия, в состав молекул которых входят как атомы платины или рутения, так и фрагменты лекарственных препаратов – *бексаротена* или *лонидамина*.
2. Разработаны методы получения и синтезированы серии комплексов Pt(IV), Ru(II) и Ru(III) с лигандами на основе *бексаротена* и *лонидамина*.
3. Получена серия гетероядерных комплексов нового типа, которые содержат в одной молекуле атомы Pt(IV) и Ru(II), связанные линкерами различной длины.
4. Изучены физико-химические характеристики полученных соединений (химическая реакционная способность в реакциях гидролиза и восстановления в условиях, близких к физиологическим; липофильность; способность связываться с транспортными белками и нуклеосомной частицей).
5. Проведено комплексное исследование противоопухолевой активности новых соединений: цитотоксичность, накопление в клетках, влияние на клеточный цикл, механизм гибели раковых клеток, *in vivo* острая токсичность и биораспределение в органах лабораторных животных.
6. На основании результатов скрининга получены данные о соотношении «структура–активность» для комплексов Pt(IV), Ru(II), Ru(III) и Pt(IV)-Ru(II). Определены ключевые структурные фрагменты молекул, влияющие на активность: природа металла, аксиальных и экваториальных лигандов и длина линкера.
7. Отобраны соединения-лидеры – кандидаты для расширенных доклинических испытаний: комплекс Pt(IV), содержащий два непосредственно связанных фрагмента *лонидамина* (**8**), комплекс Ru(III) с *бексаротеном* - аналог NAMI-A (**63**), и гетероядерный комплекс Pt(IV)-Ru(II) с $-(CH_2)_8$ - линкером (**72**).

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах (статьи индексируются в системах Web of science, Scopus и РИНЦ):

1. **Nosova Y. N.**, Zenin I. V., Maximova V. P., Zhidkova E. M., Kirsanov K. I., Lesovaya E. A., Lobas A. A., Gorshkov M. V., Kovaleva O. N., Milaeva E. R., Galanski M., Keppler B. K., Nazarov A. A. Influence of the number of axial bexarotene ligands on the cytotoxicity of Pt(IV) analogs of oxaliplatin // *Bioinorg. Chem. and Appl.* — 2017. — Vol. 2017. — P. 1–6. Article ID 4736321
2. **Nosova Y. N.**, Foteeva L. S., Zenin I. V., Fetisov T. I., Kirsanov K. I., Yakubovskaya M. G., Antonenko T. A., Tafeenko V. A., Aslanov L. A., Lobas A. A., Gorshkov M. V., Galanski M., Keppler B., Timerbaev A. R., Milaeva E. R., Nazarov A. A. Enhancing the cytotoxic activity of anticancer Pt(IV) complexes by introduction of lonidamine as an axial ligand // *Eur. J. Inorg. Chem.* — 2017. — No. 12. — P. 1785–1791.

3. **Nosova Y. N.**, Karlov D. S., Pisarev S. A., Shutkov I. A., Palyulin V. A., Mathurin B., Milaeva E. R., Dyson P. J., Nazarov A. A. New highly cytotoxic organic and organometallic bexarotene derivatives // *J. Organomet. Chem.* — 2017. — Vol. 839. — P. 91–97.
4. **Nosova Y.N.**, Shutkov I.A., Zenin I.V., Shevtsova E.F., Kirsanov K.I., Milaeva E.R., Nazarov A.A., Antitumor active Ru(III) compounds with target specific ligand// 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry. Abstract book. Moscow, Russia, 28 September – 3 October 2017. P. 251.
5. **Nosova Y. N.**, Shutkov I. A., Nazarov A. A., Milaeva E. R. Anticancer ruthenium compounds with biologically active ligands // The XXV International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry. Book of abstracts «Advancing Coordination, Bioinorganic and Applied Inorganic Chemistry». Smolenice, Slovakia, 31 May – 5 June 2015. — P. 98.
6. **Nosova Y. N.**, Shutkov I. A., Gonchar M. R., Zadorozhnaya O. I., Fetisov T. I., Kirsanov K. I., Milaeva E. R., Nazarov A. A. Anticancer Ru(II)-arene compounds with bexarotene and lonidamine-modified ligands // The 8th International Symposium on Bioorganometallic Chemistry ISBOMC16. Book of abstracts. Moscow, Russia, 4 – 8 September 2016. — P. 47.
7. Шутков И.А., **Носова Ю.Н.** Комплексы Ru(III) с биологически активными лигандами, как потенциальные противоопухолевые соединения // XXIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017». Сборник тезисов. Москва, Россия, 10 – 14 Апреля 2017. — С. 38.
8. Тюрин В.Ю., Шутков И.А., **Носова Ю.Н.**, Назаров А.А., Милаева Е.Р. Синтез и изучение редокс-свойств комплексов Ru(III) методом циклической вольтамперометрии // Второй Междисциплинарный Симпозиум по медицинской, органической и биологической химии - 2015. Сборник тезисов. Новый Свет, Россия, 27 сентября – 1 октября 2015. — С. 140.
9. **Носова Ю. Н.**, Назаров А. А., Фотеева Л. С., Тимербаев А. Р., Задорожная О. И., Фетисов Т. И., Кирсанов К. И., Зенин И. В., Милаева Е. Р. Комплексы Pt(IV), содержащие ингибитор гликолиза - эффективные антипролиферативные агенты // Кластер конференций Оргхим-2016. Сборник тезисов. Репино, Санкт-Петербург, Россия, 27 июня – 1 июля 2016. — С. 634.
10. **Носова Ю. Н.**, Шутков И. А., Шевцова Е. Ф., Редкозубова О. М., Серкова Т. П., Назаров А. А., Милаева Е. Р. Противораковые комплексы Ru(III) с биологически активными лигандами // Кластер конференций Оргхим-2016. Сборник тезисов. Репино, Санкт-Петербург, Россия, 27 июня – 1 июля 2016. — С. 635.
11. Nazarov A.A., **Nosova Y.N.**, Milaeva E.R. Pt(IV) and Pt(IV)-Ru(II) complexes as anticancer agents with targeting properties // Gordon Research Conference (GRC) on Metal in Medicine (2016). Book of abstracts. Proctor Academy, Andover, USA, 26 June – 1 July 2016. — P. 47.
12. **Носова Ю. Н.**, Зенин И. В., Тафеенко В. А., Асланов Л. А., Антоненко Т. А., Милаева Е. Р., Назаров А. А., Фотеева Л. С., Тимербаев А. Р., Задорожная О. И., Фетисов Т. И., Кирсанов К. И. Комплексы Pt(IV), содержащие ингибитор гликолиза // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Сборник тезисов. Екатеринбург, Россия, 26 – 30 сентября 2016 — Т. 4 — С. 527.