

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



ГОНЧАР МАРИЯ РОМАНОВНА

**Соединения рутения, золота и иридия
с фосфитными лигандами на основе глюкозы
как перспективные противоопухолевые агенты**

1.4.16. – Медицинская химия

1.4.11. – Бионеорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Работа выполнена на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научные руководители** – *Милаева Елена Рудольфовна*
доктор химических наук, профессор
Назаров Алексей Анатольевич
кандидат химических наук
- Официальные оппоненты** – *Луценко Ирина Александровна*
доктор химических наук,
ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН», лаборатория химии координационных
полюдерных соединений, ведущий научный сотрудник
Друзина Анна Александровна
кандидат химических наук,
ФГБУН «Институт элементоорганических соединений имени
А.Н. Несмеянова РАН», лаборатория алюминий- и
борорганических соединений, старший научный сотрудник
Белоглазкина Елена Кимовна
доктор химических наук, доцент
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова», химический факультет, кафедра
органической химии, профессор

Защита диссертации состоится «17» ноября 2023 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.7 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, дом 1, строение 3, МГУ, Химический факультет, ауд. 446.

E-mail: *natalylozinskaya@mail.ru* (учёный секретарь)

marija-gnchar@rambler.ru (соискатель)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.7/2655>

Автореферат разослан «__» октября 2023 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета МГУ.014.7,

кандидат химических наук



Н.А. Лозинская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В настоящее время многочисленные исследования посвящены поиску соединений различных металлов, обладающих противоопухолевой активностью, в том числе металлоорганических соединений. Так, например, перспективным относятся соединения Ru, Au и Ir, которые не являются биогенными металлами и не вовлекаются в метаболизм, но обладают токсичностью, а кинетика комплексов данных металлов, так же, как и платины, находится во временных рамках клеточного цикла.

Одним из известных подходов в медицинской химии является модификация структуры соединения-лидера путем введения дополнительного биологически активного фрагмента. Данный подход направлен на изменение активности и фармакокинетических параметров. Модификация координационных и металлоорганических соединений путем введения биологически активного фрагмента – лиганда, который может селективно связываться с молекулярной мишенью в раковой клетке, влияет таким образом на степень негативного токсичного действия металла.

В раковых клетках происходит процесс сверхэкспрессии мембранных белков, которые отвечают за перенос глюкозы, благодаря высокой зависимости от анаэробного гликолиза. В связи с этим данные белки могут представлять перспективную мишень для лекарственных препаратов, а наличие фрагмента глюкозы в составе соединения позволит увеличить селективность.

Степень разработанности темы диссертации

В связи со всем вышперечисленным, можно полагать, что создание мультитаргетных соединений, путем, например конъюгирования активных молекул и хорошо известных и изученных препаратов, содержащих в своем составе металл, может являться эффективным и многообещающим новым подходом к увеличению водорастворимости и избирательности и увеличению накопления препарата в клетках.

Целью данной работы являлось получение новых комплексов рутения, золота и иридия с фосфитными лигандами на основе глюкозы и с лигандами, содержащими фармакологически активный фрагмент, а также определение соотношения «структура-активность», изучение противоопухолевой активности и фармакокинетических параметров. Для достижения данных целей были поставлены следующие задачи:

Задачи работы

- 1) Разработка синтетических подходов для получения соединений Ru(II), Au(I), Ir(III) с фосфитными лигандами на основе глюкозы.
- 2) Разработка синтетических подходов к получению комплексов Ru(II) и Au(I) с модифицированными лигандами на основе глюкозы и фрагмента фармакологически активного препарата бексаротена.
- 3) Исследование стабильности полученных соединений Ru(II) и Au(I) как одного из важных фармакокинетических параметров.
- 4) Изучение цитотоксичности полученных соединений Ru(II), Au(I), Ir(III) *in vitro* на различных клеточных линиях рака человека, анализ зависимости «структура-активность» и выбор соединений-лидеров для расширенных биологических испытаний.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования являлись металлоорганические соединения Ru(II), Au(I), Ir(III) с фосфитными лигандами на основе глюкозы и с модифицированными лигандами на основе глюкозы и фрагмента фармакологически активного препарата бексаротена. Предметом

исследования являлось изучение антипролиферативной активности и фармакокинетических параметров.

Методология и методы исследования

В работе использовали физико-химические методы установления состава, структуры и чистоты соединений: ^1H , ^{13}C $\{^1\text{H}\}$, ^{31}P $\{^1\text{H}\}$; ^{19}F $\{^1\text{H}\}$, ^{13}C , ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный и элементный анализы. Двумерные спектры были получены с использованием стандартных импульсных программ. Стабильность в водных растворах изучали методом ЯМР спектроскопии на ядрах ^{31}P . Исследование антипролиферативной активности проводили методом МТТ-теста на библиотеке клеточных линий рака человека.

Научная новизна

Разработан подход к получению комплексов Ru(II), Au(I), Ir(III), содержащих фосфитные лиганды на основе глюкозы, исследована их устойчивость в реакциях лигандного обмена в ДМСО-содержащих растворах.

Разработан подход к получению комплексов Ru(II), Au(I) с модифицированными лигандами на основе глюкозы, содержащими фрагмент известного противоопухолевого препарата бексаротен. Изучена цитотоксичность (антипролиферативная активность) полученных соединений *in vitro* на библиотеке клеточных линий рака человека и выбраны соединения-лидеры.

Для наиболее активных соединений Ru(II) и Au(I) определена активность по отношению к ферменту тиоредоксин редуктазе (TrxR1), как одной из возможных мишеней.

Практическая значимость

Впервые получен ряд соединений Ru(II), Au(I), Ir(III) с фосфитными лигандами на основе глюкозы и серия комплексов Ru(II) и Au(I) с модифицированными лигандами на основе глюкозы и фрагментом препарата бексаротена, наработаны экспериментальные образцы.

Исследована стабильность полученных соединений Ru(II) и Au(I), и для данного параметра выявлена зависимость от структуры.

На основании данных определения цитотоксичности полученных комплексов *in vitro* выбраны соединения-лидеры для расширенных биологических испытаний.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Методом создания полифункциональных физиологически активных соединений рутения, иридия и золота является введение в структуру комплексов в качестве лигандов бициклофосфитов глюкозы, пиримидиновых азотистых оснований и фрагмента лекарственного препарата – бексаротена.
- 2) Цитотоксичность комплексов Ru(II), Ir(III) и Au(I) зависит от ряда факторов: природы металла, наличия остатка глюкозы и пиримидинового основания, а также природы уходящей группы.
- 3) Введение фрагмента противоопухолевого препарата бексаротена в структуру комплексов Ru(II) и Au(I) приводит к повышению антипролиферативной активности, а для комплексов Ir(III) с фрагментом бексаротена характерно значительное снижение антипролиферативной активности.
- 4) Стабильность соединений в водных растворах определяется природой металла и галогенов (Cl, Br, I) в качестве уходящих групп: все комплексы Ir(III) устойчивы в реакциях лигандного обмена; в ряду соединений Ru(II) наибольшей устойчивостью обладают комплексы с бромом и иодом.
- 5) Структурная модификация пиримидинового основания в лиганде существенно влияет на стабильность, и, в частности, при введении метильной группы стабильность комплексов значительно повышается.

Личный вклад автора

Автором лично был проведен анализ литературы по основным направлениям работы. Автор лично выполнил всю синтетическую работу, включающую постановку синтетического эксперимента,

решение актуальных задач оптимизации процессов модификации целевых соединений и очистку целевых соединений. Автор самостоятельно провёл исследование антипролиферативной активности полученных соединений и их важных фармакокинетических параметров. Автор принимал непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, обработке и интерпретации полученных результатов, представлении ключевых результатов работы на конференциях, в подготовке материалов к публикации в научных журналах и в формулировании выводов.

Апробация работы и публикации

По результатам работы опубликовано 3 статьи в журналах, индексируемых базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.16. Медицинская химия и 1.4.11 Бионеорганическая химия, и 8 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях. Вклад автора во все публикации был определяющим.

Результаты работы были представлены на Всероссийских конференциях с международным участием: 11-ой Международной конференции для молодых ученых по химии «Mendeleev 2019», Санкт-Петербург, 2019; 4-ой Российской конференции по медицинской химии «MedChem Russia 2019», 22-ой Международной Черняевской конференции по химии, аналитике и технологии платиновых металлов «Черняев 2019», Москва, 2019; XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021", Москва, 2021; Первой Всероссийской школе для молодых ученых по медицинской химии «MEDCHEMSCHOOL2021», Новосибирск, 2021, 5-ой Российской конференции «MedChem Russia 2021», Волгоград, 2021; Международной научно-практической конференции "Белорусские лекарства", Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь, 2022.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований – № 20-33-90081, № 19-53-12042, № 19-03-00394.

Структура и объем работы

Полный текст диссертации изложен на 151 странице машинописного текста и состоит из 8 разделов: введение, обзор литературы, обсуждение результатов, заключение, экспериментальная часть, выводы, список сокращений и условный обозначений, список цитируемой литературы, включающий 124 наименований.

Диссертационная работа содержит 58 рисунков, 12 таблиц и 21 схему.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

В данном разделе обоснована актуальность работы, ее научная новизна и практическая значимость, сформулированы цель и основные задачи работы.

Обзор литературы посвящен соединениям рутения, золота и иридия, их биологической активности, биомолекулярным механизмам действия, возможным молекулярным мишеням данных соединений и перспективам их использования в качестве противоопухолевых препаратов.

Результаты и их обсуждение

Структура работы основана на последовательном решении следующих задач:

- (1) Разработка синтетических подходов к получению комплексов Ru(II), Ir(III) и Au(I) с бициклофосфитными и модифицированными лигандами на основе глюкозы и фрагмента фармакологически активного препарата бексаротена.
- (2) Исследование стабильности полученных соединений Ru(II), Ir(III) и Au(I) как одного из важных фармакокинетических параметров.
- (3) Изучение биологической (антипролиферативной) активности новых соединений Ru(II), Au(I), Ir(III)
- (4) Отбор соединений лидеров.

1. Синтез

1.1. Разработка синтетических подходов к получению комплексов Ru(II), Ir(III) и Au(I) с бициклофосфитными и модифицированными лигандами на основе глюкозы и фрагмента фармакологически активного препарата бексаротена

Создание мультитаргетных соединений, путем, например, конъюгирования активных молекул и хорошо известных и изученных препаратов, содержащих в своем составе металл, может являться эффективным и многообещающим новым подходом к увеличению водорастворимости и избирательности и увеличению накопления препарата в клетках. А дальнейшее изучение новых молекул и мишеней с последующим исследованием зависимости структура-активность полученных соединений является важной задачей для создания новых активных агентов для борьбы с раковыми новообразованиями.

Общая схема структуры целевых соединений, полученных в данной работе, представлена на Рисунке 1. Молекулы новых комплексов металлов включают несколько фрагментов:

- (1) глюкоза (один из основных источников энергии в клетке);
- (2) урацил, тимин (пиримидиновые основания, которые являются компонентами нуклеиновых кислот и могут способствовать увеличению гидрофильности) или 5-фторурацил (биологически активное соединение с известным противоопухолевым действием, которое ингибирует процесс деления клеток путем блокирования синтеза ДНК и образования структурно несовершенной РНК),
- (3) фрагмент бексаротена (агонист ретиноидных рецепторов X и известный противоопухолевый препарат),
- (4) экзогенный металл – золото, рутений или иридий (для обеспечения токсичности по механизму действия, отличного от препаратов платины).

X = Cl, Br, I, 1/2(C₂O₄)

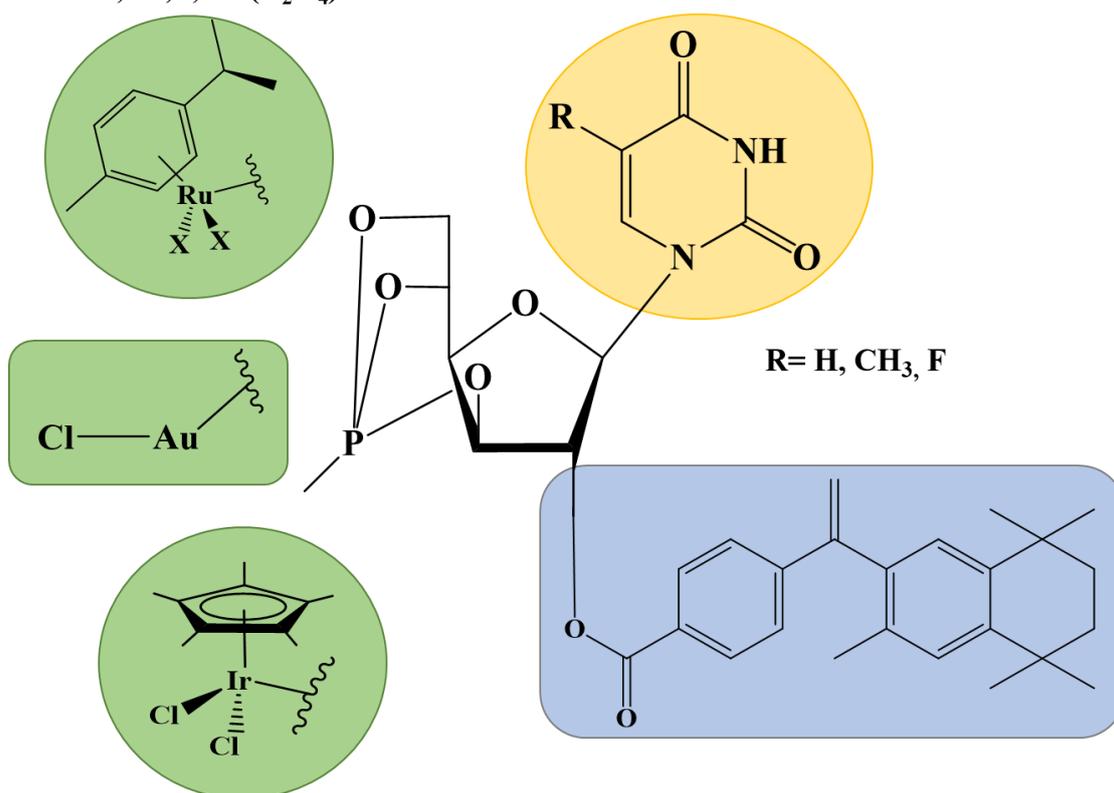
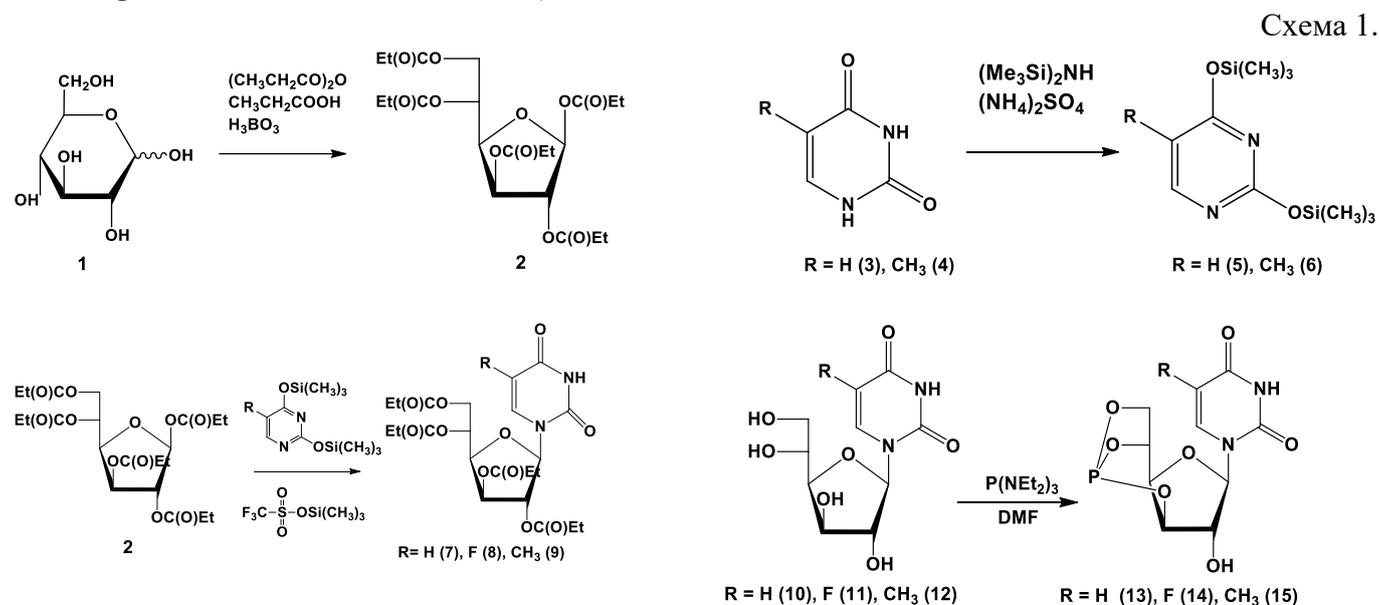
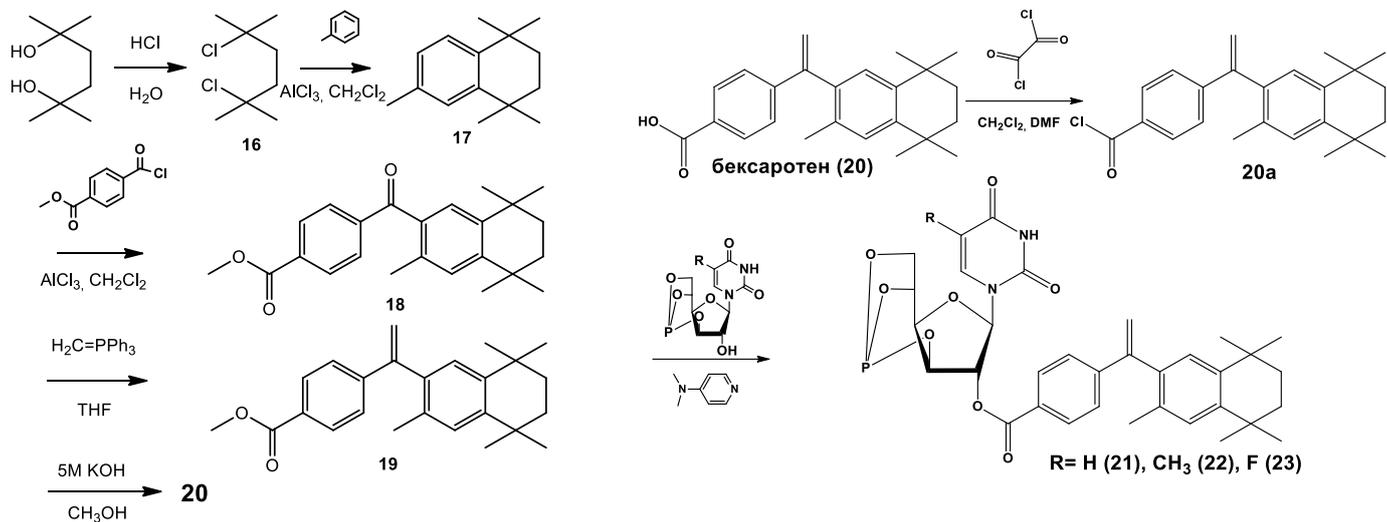


Рис. 1. Общая схема молекулярного конструирования новых соединений Ru(II), Ir(III) и Au(I)

1.1.1. Синтез бициклофосфитных лигандов

В результате многостадийного синтеза получены бициклофосфиты **13-15**, содержащие урацил, тимин, 5-фторурацил, и фосфиты **21-23**, содержащие фрагмент бексаротена **20**, синтезированного из исходных **16-19** (Схема 1).





Строение полученных соединений подтверждали методом спектроскопии ЯМР ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, ^{31}P (Таблица 1, Рис. 2).

Таблица 1. Химические сдвиги сигналов ядерно-магнитного резонанса для ядра ^{31}P

Основание	Соединение N / N + бексаротен	ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (161.98 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ м.д.	ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (161.98 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ м.д.) + бексаротен
Урацил	13 / 21	119.2	119.8
Тимин	14 / 22	119.3	119.9
5-Фторурацил	15 / 23	119.3	120.1

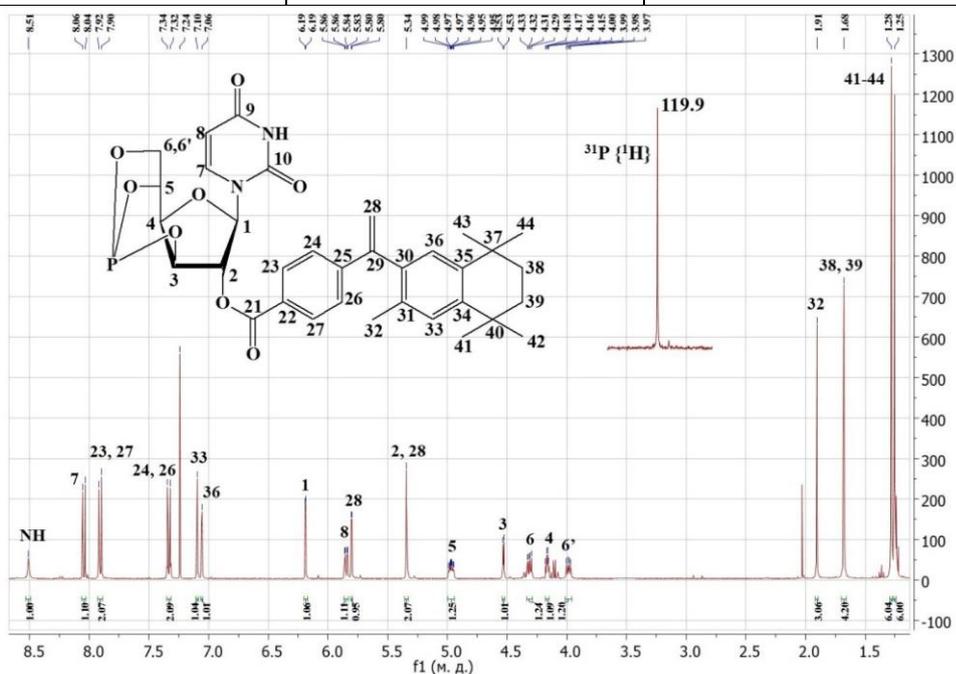
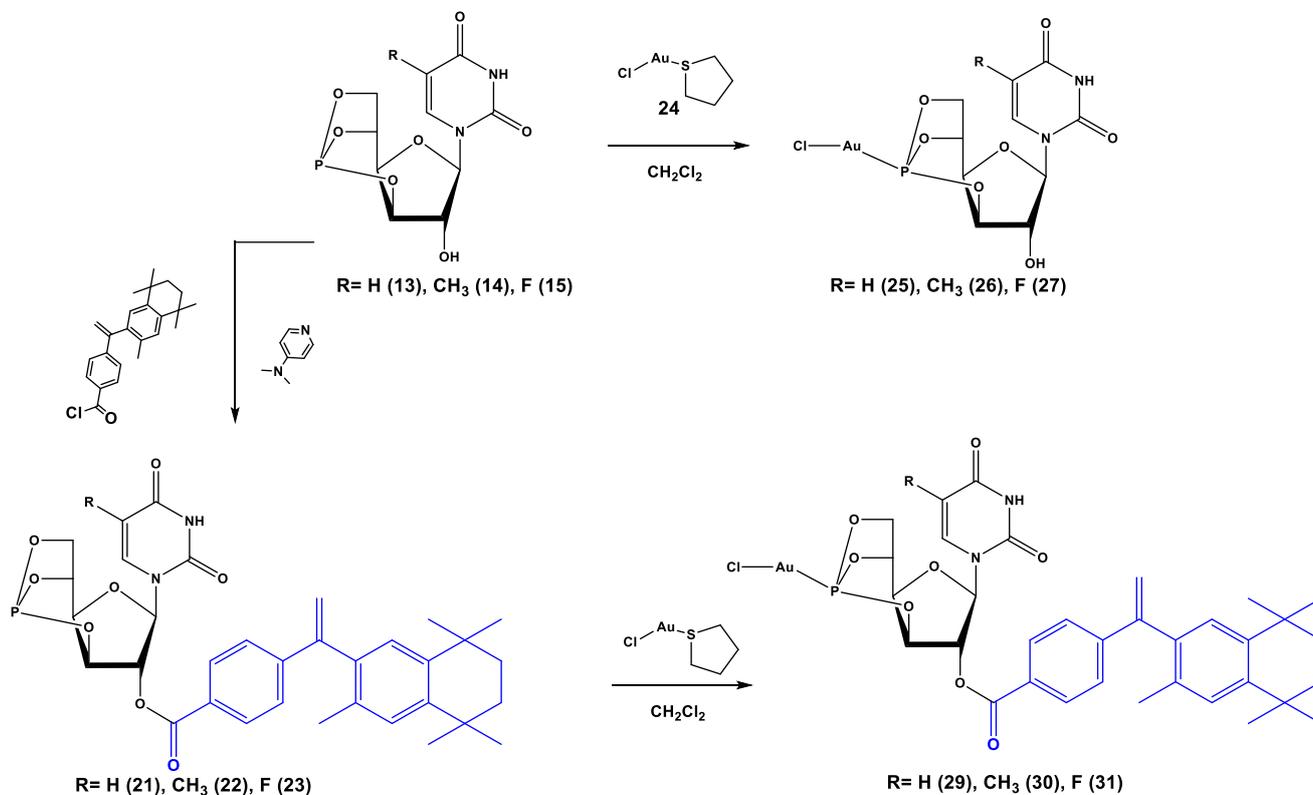


Рис. 2. Спектры ЯМР ^1H и ^{31}P соединения **21**

1.1.2. Синтез комплексов Au(I) с бициклофосфитными и модифицированными лигандами на основе глюкозы

Хлоро(тетрагидротиофен) золота(I) (**24**) – являлся исходным соединением для получения комплексов золота(I) **21-31** (Схема 2).

Схема 2.



Комплексы золота(I) **25-27** получали при взаимодействии фосфитов **13-15** с соединением **24**. Подтверждение структуры и чистоты синтезированных соединений **25-27** проводили методами ЯМР спектроскопии на ядрах ¹H, ³¹P{¹H}, чистоту подтверждали также элементным анализом. В спектрах ЯМР на ядре ³¹P для соединений **25-27** в ДМСО-d₆ присутствует синглет в области 121 – 124 м.д., а спектры ЯМР ¹H для соединений **25-27** незначительно отличаются по химическим сдвигам от спектров исходных фосфитов **13-15** (менее 0.3 м.д.) для групп, чувствительных к координации золота.

Бициклофосфитные комплексы золота(I) с фрагментом бексаротена **29-31**, который был введен в структуру комплексов, получали при взаимодействии синтезированных фосфитов **21-23** с комплексом **24** в мольном соотношении 1:1.

Структура соединений **29-31** подтверждена методом ЯМР спектроскопии ¹H, ³¹P и масс-спектрометрией, а чистота - методом элементного анализа. В спектрах ЯМР ³¹P соединений **29** и **30** в ДМСО-d₆ наблюдается синглет в области 122 – 123 м.д., а для соединения **29** в CDCl₃ – при 125 м.д. (Таблица 2). Спектры ЯМР ¹H соединения **29-31** отличаются от спектров исходных фосфитов **21-23** наличием сдвигами сигналов (менее 0.3 м.д.), которые подтверждают координацию атома золота к фосфору.

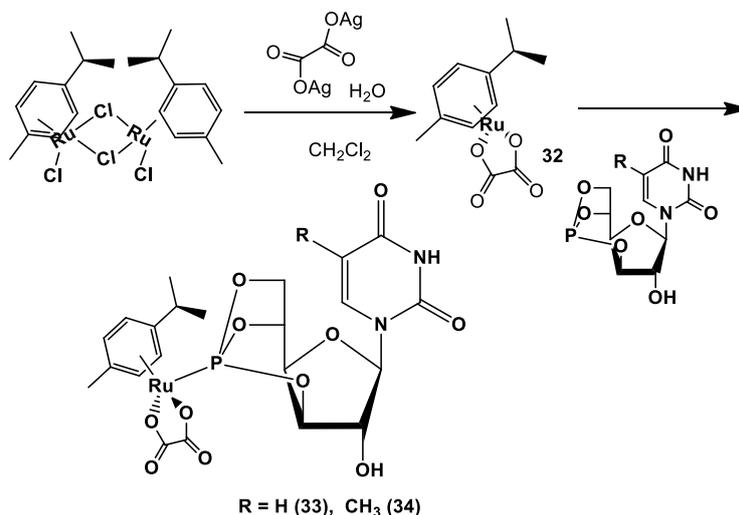
Таблица 2. Химические сдвиги сигналов ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ соединений **25-31**

Основание	Соединение N / N + бексаротен	ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (161.98 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ м.д.	ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (161.98 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ м.д.) + бексаротен
Урацил	25 / 29	121.4	125.4
Тимин	26 / 30	121.7	122.4
5-Фторурацил	27 / 31	123.7	122.5

1.1.3. Синтез комплексов Ru(II) с бициклофосфитными и модифицированными лигандами на основе глюкозы

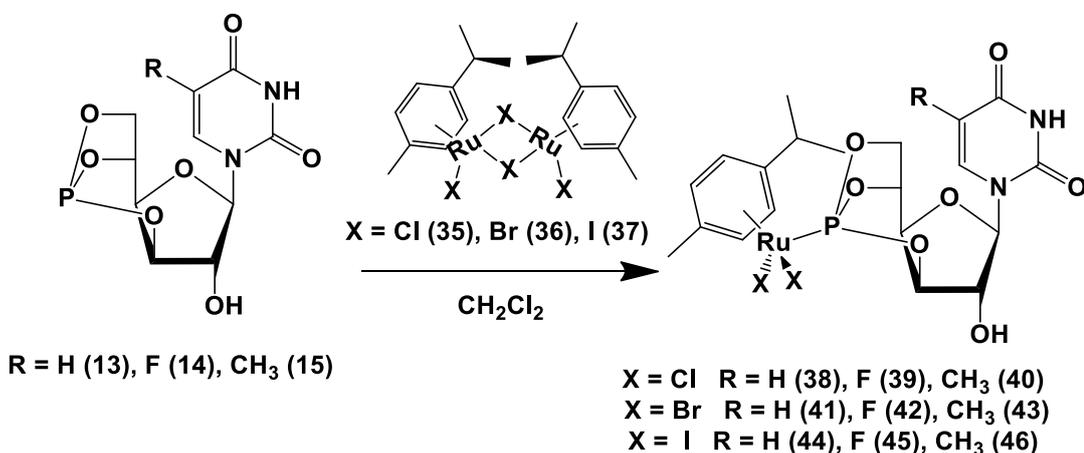
Комплексы рутения с оксалатной защитой были получены в две стадии (Схема 3). На первой стадии из бис[дихлоро(η^6 -4-изопропилтолуол) рутения(II)] и дикарбоксилата серебра в водном растворе был получен промежуточный оксалатный комплекс **32**, после чего данный комплекс добавляли к растворам соответствующих фосфитов.

Схема 3.



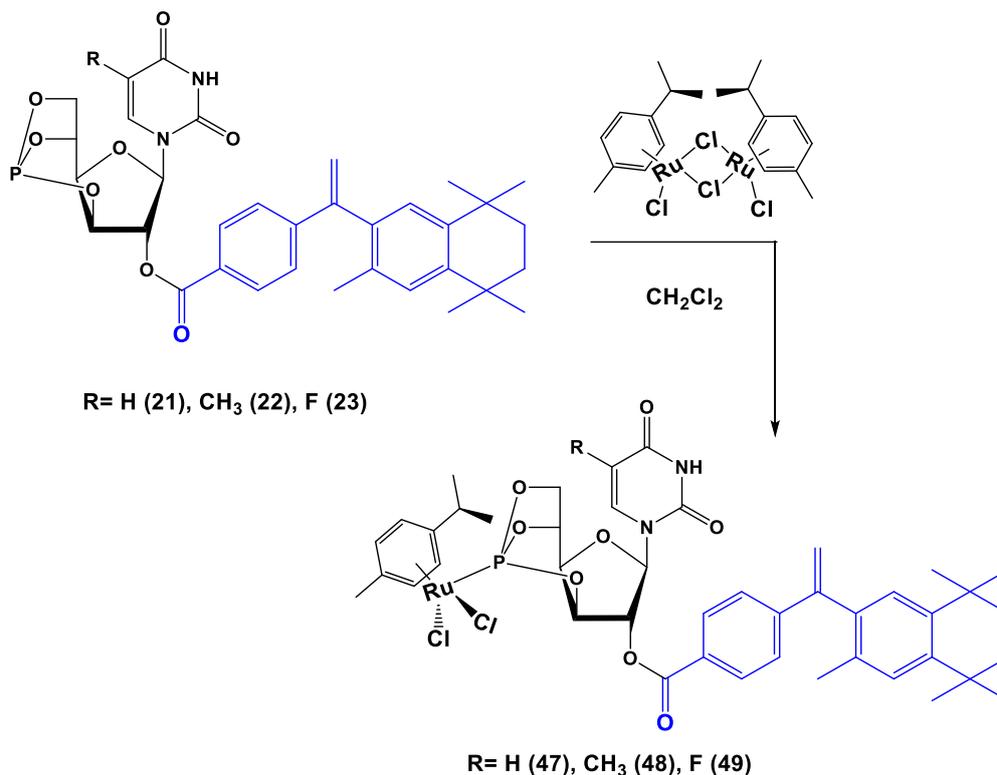
Комплексы Ru (II) **38-46** с Cl, Br и I в качестве уходящих групп для исследования зависимости активности соединений от природы галогена синтезировали на основе полученных димерных комплексов по реакции с исходными бициклофосфитами (Схема 4).

Схема 4.



Бициклофосфитные комплексы рутения (II) с фрагментом бексаротена получали при взаимодействии синтезированных фосфитов **21-23** с комплексом **35** в мольном соотношении 2:1 (Схема 5).

Схема 5.



Подтверждение строения и чистоты синтезированных соединений осуществляли методами ЯМР спектроскопии на ядрах ¹H, ³¹P, элементного анализа и масс-спектрометрии ИЭР.

В спектрах ЯМР ³¹P соединений **47-49** наблюдается синглет в области 136-137 м.д. Спектры ЯМР ¹H соединения **47-49** отличаются от спектров исходных фосфитов **21-23** незначительными сдвигами сигналов (менее 0.2 м.д.), чувствительных к координации рутения, и наличием сигналов, которые соответствуют протонам 4-изопропилтолуола, что указывает на прохождение реакции (Рис. 3, Таблица 3).

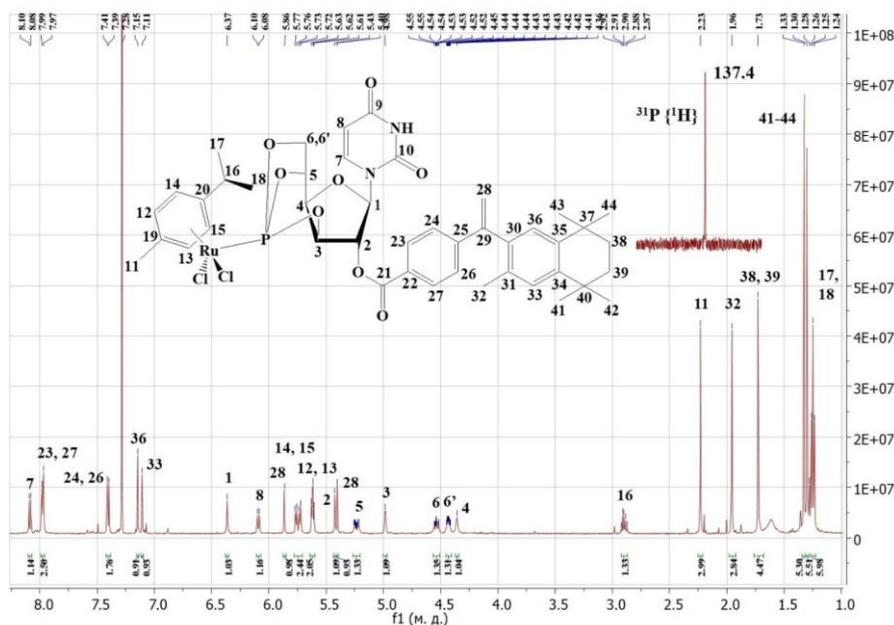


Рис. 3. Спектры ЯМР

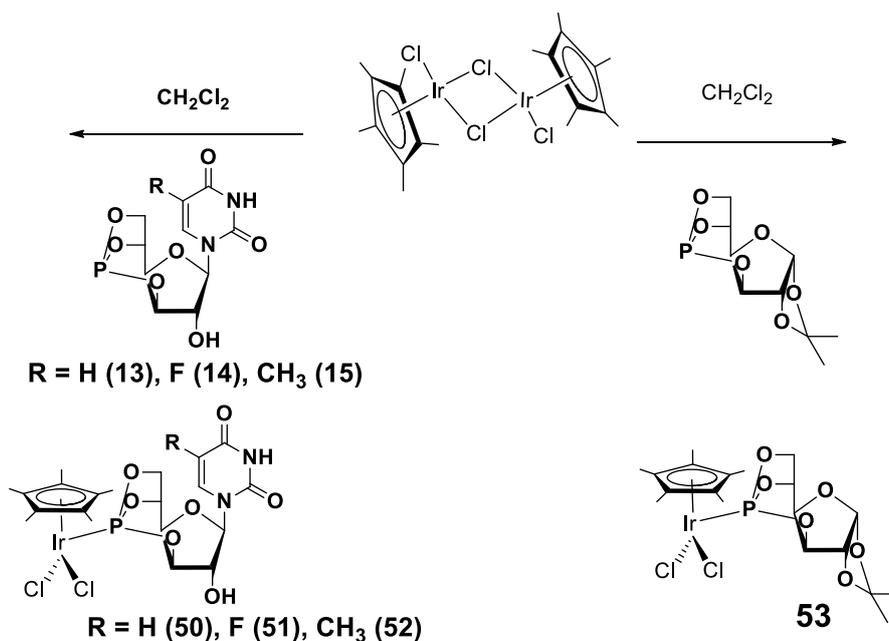
¹H и ³¹P комплекса **47**

Таблица 3. Химические сдвиги сигналов ЯМР на ядрах ^{31}P для соединений **33, 34, 38-49**.

Металл / группа	Основание	Комплекс	ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (161.98 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ м.д.
Ru-Ox (Ox = оксалат)	Урацил	33	136.2
	Тимин	34	134.5
Ru-Cl	Урацил	38	134.9
	5-Фторурацил	39	134.3
	Тимин	40	134.5
Ru-Br	Урацил	41	134.3
	5-Фторурацил	42	133.8
	Тимин	43	133.7
Ru-I	Урацил	44	137.5
	5-Фторурацил	45	136.9
	Тимин	46	136.8
Ru – бексаротен	Урацил	47	137.4
	Тимин	48	136.8
	5-Фторурацил	49	135.4

1.1.4. Синтез комплексов Ir(III) с бициклофосфитными лигандами на основе глюкозы

Комплексы иридия(III) **50-53** получали взаимодействием исходных фосфитов **13-15**, а также с уже ранее полученным фосфитом с изопропилиденовой защитной группой с соответствующим димерным комплексом иридия (Схема 6).



Перекристаллизацией соединения **53** из смеси диэтилового эфира и хлористого метилена получены оранжевые кристаллы, которые были охарактеризованы с помощью РСА (Рис. 4, Таблица 4). Данные скорректированы с учетом эффектов поглощения с помощью полуэмпирических методов.

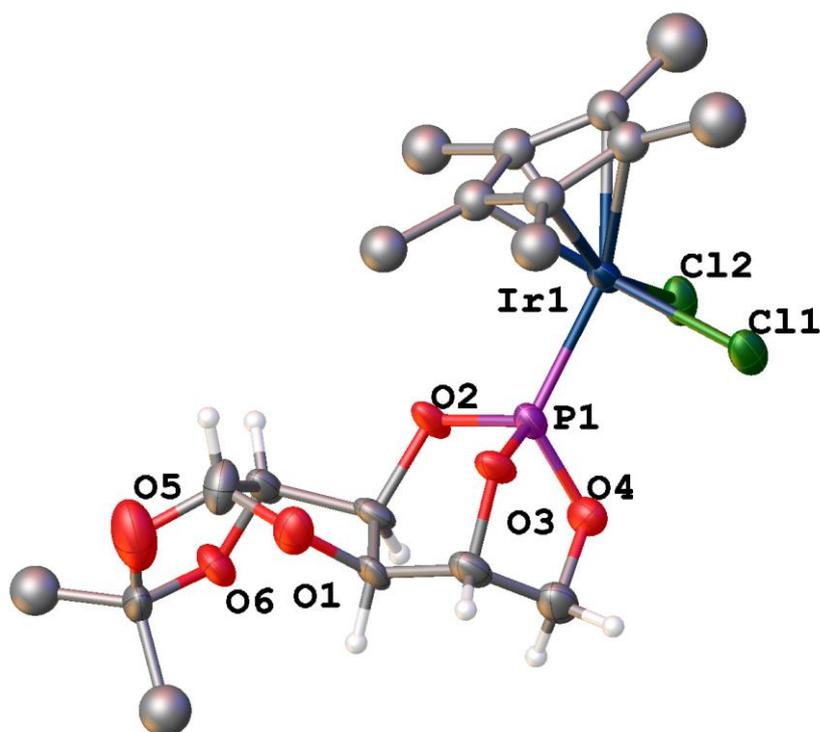


Рис. 4. Молекулярная структура комплекса **53**

Детальный анализ параметров атомных смещений, а также наличие дополнительных пиков вблизи метильных групп интерпретировали как нарушение порядка Cr^* вследствие незначительной либрации вокруг оси Ir-Cr. В связи с близостью положений атомов углерода внутри кольца Cr^* уточнение проводилось с ограничениями на атомные смещения и позиционные

параметры с использованием ряда ограничений и запретов. Экспериментальная и кристаллографическая информация приведена в таблице 4.

Таблица 4. Данные РСА для **53**

Брутто-формула	$C_{19}H_{28}Cl_2IrO_6P$	Молекулярная масса	646.48
T, К	122	V (\AA^3)	2224.7(3)
Простр. группа	P212121	Z (Z')	4(1)
Кристаллическая система	Орторомбическая	max/min ($e/\text{\AA}^3$)	1.515 /-3
a (\AA)	9.8274(7)	Излучение	Mo K α
b (\AA)	14.4958(10)	R1/wR2 ($I \geq 2\sigma(I)$)	0.0510/0.1325
c (\AA)	15.6169(11)	GOOF	0.920

** Рентгеноструктурный анализ был выполнен на кафедре физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова профессором, д.х.н. Лысенко Константином Александровичем.

2. Изучение биологической активности и фармакокинетических параметров

2.1. Исследование стабильности

Стабильность соединений - важный физико-химический параметр, который необходим для оценки кандидата в лекарственные средства. Процесс активации комплекса путем гидролиза и образование активных частиц может влиять на цитотоксические свойства соединения. Гидролиз комплексов Au(I) с бициклофосфитными лигандами **25** (Рис. 5) и **26** (Рис. 6) изучали методом ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Комплексы растворяли в ДМСО-d₆, далее к раствору добавляли D₂O в количестве, необходимом для получения 5% раствора ДМСО и концентрации 2 мМ. Спектр ^{31}P регистрировали каждые 30 мин.

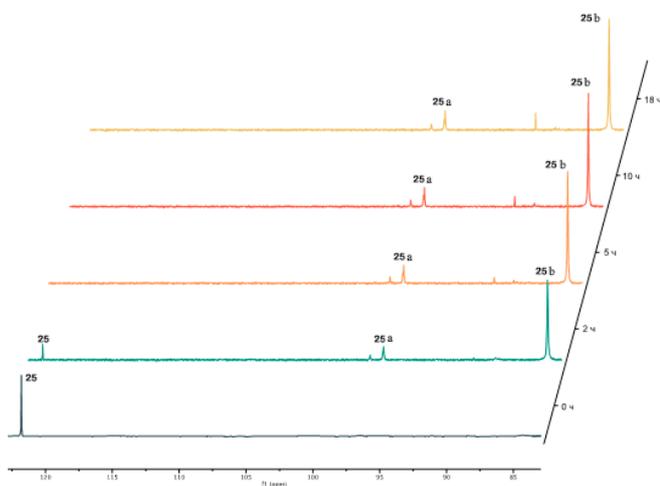


Рис. 5. Спектры ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ комплекса **25** через 2, 5, 10 и 18 ч после начала эксперимента

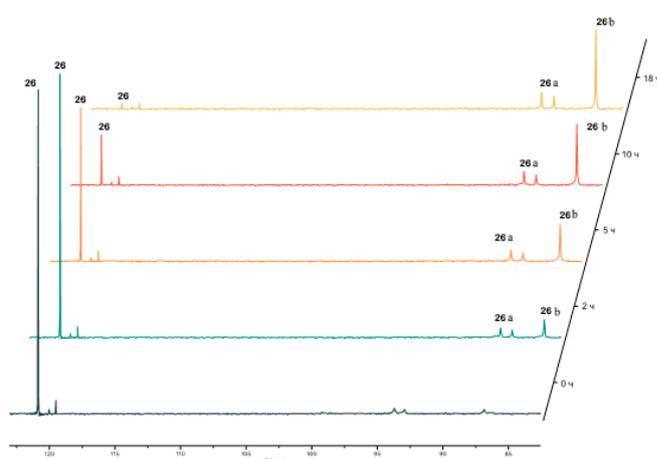
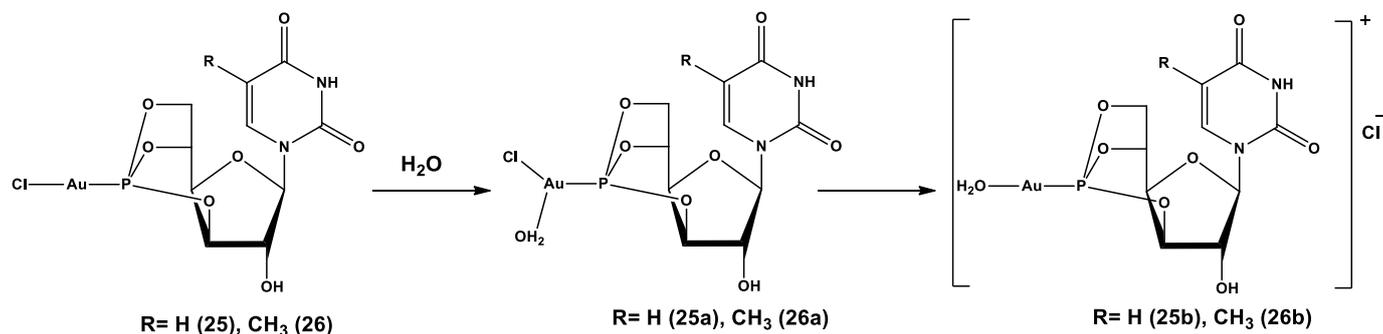


Рис. 6. Спектры ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ комплекса **26** через 2, 5, 10 и 18 ч после начала эксперимента

Анализ спектральных данных показывает, что гидролиз комплекса **25** проходит быстрее, чем комплекса **26** (предположительный механизм гидролиза представлен на схеме 7). Исходные комплексы **25** и **26** связываются с одной молекулой воды и превращаются в малостабильные комплексы золота с координационным числом атома золота = 3 (**25a** и **26a**), которые в свою

очередь превращаются из-за их нестабильности в наиболее устойчивые соединения **25b** и **26b** с линейной конфигурацией молекулы, благодаря аниону хлора, уходящему во внешнюю координационную среду.

Схема 7.



Для того, чтобы определить соотношения всех продуктов, которые образуются в ходе гидролиза соединений **25** и **26**, построены зависимости их содержания от времени (Рис. 7 и 8).

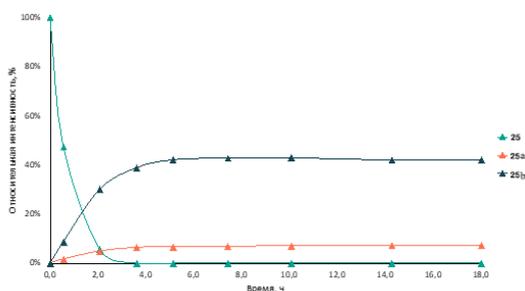


Рис. 7. Зависимость относительных интенсивностей сигналов ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ при гидролизе комплекса **25** от времени

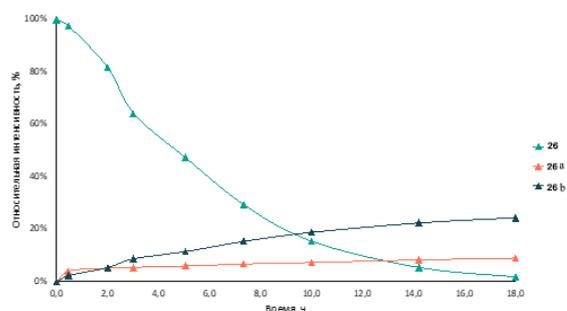
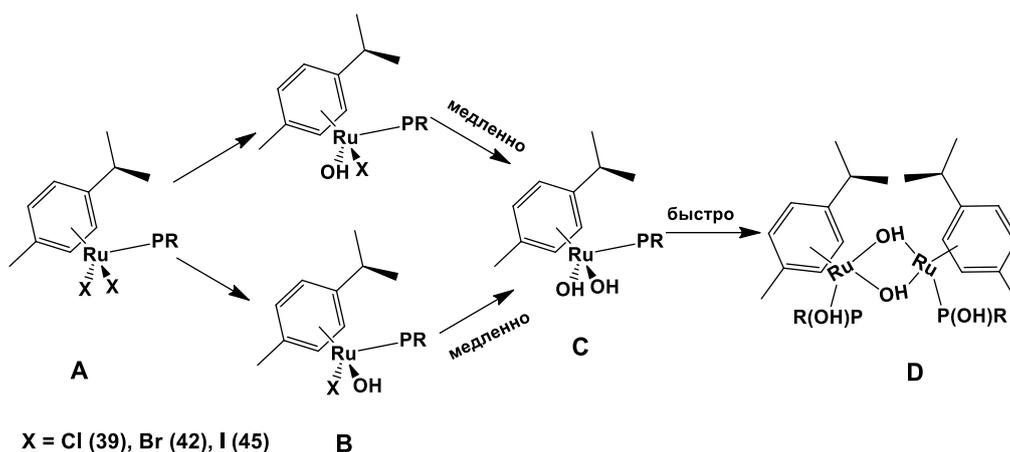


Рис. 8. Зависимость относительных интенсивностей сигналов ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ комплекса **26** от времени

Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие в структуре пиримидинового основания метильной группы в комплексе **26** значительно увеличивает стабильность. Данное явление, по-видимому, связано с тем, что происходят существенные изменения в гидрофильно-липофильном балансе, так как комплекс с тиминовым фрагментом оставался стабильным более 2 часов, тогда как содержание комплекса с урацильным фрагментом составляло менее 45%.

Для изучения влияния природы уходящей группы на стабильность комплексов **39**, **42**, **45** исследован процесс гидролиза. На схеме 8 показан общий путь гидролиза в водных растворах и образование гипотетических комплексов.



Исследования проводили методом ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ аналогично комплексам золота (I). Спектр регистрировали каждые 30 мин (Рис. 9).

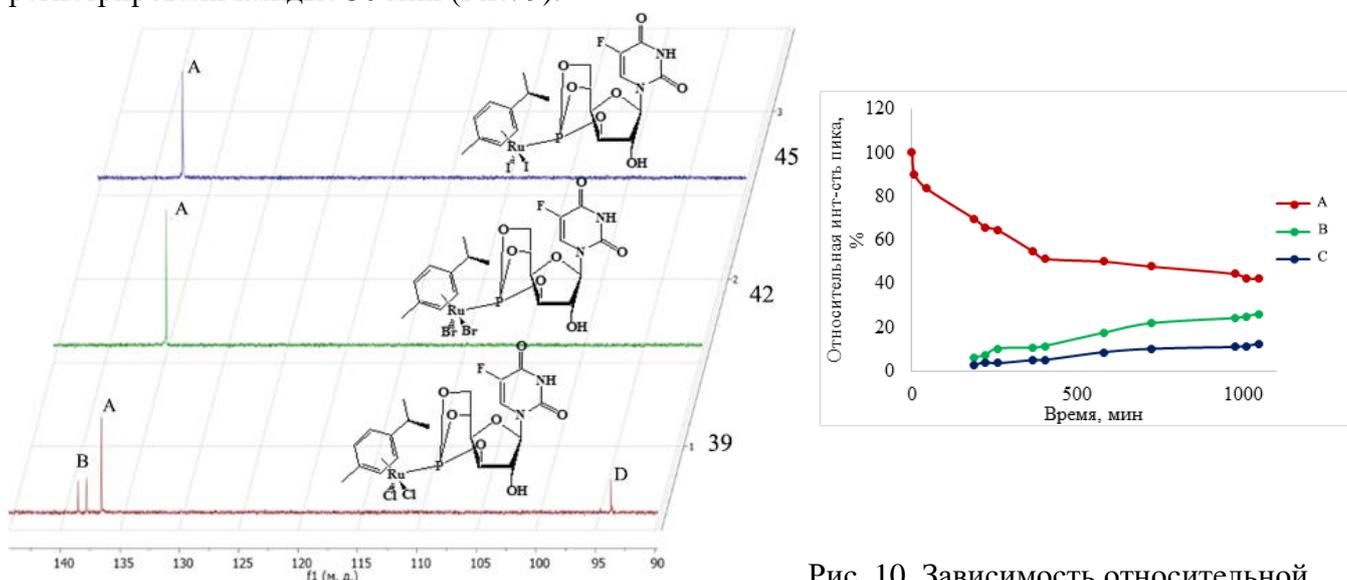


Рис. 9. Спектры ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ для комплексов **39**, **42**, **45** через 24 ч после начала эксперимента

Рис. 10. Зависимость относительной интенсивности сигналов ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ при гидролизе соединения **39** от времени

Для определения распределения всех образующихся продуктов гидролиза построены графики процентного содержания различных продуктов гидролиза от времени для соединения **39** (Рис. 10). Таким образом обнаружено, что комплекс с хлором в качестве лиганда достаточно быстро подвергается гидролизу (в течение нескольких часов), после чего содержание целевого соединения в исследуемом растворе медленно снижается в течение суток. Следует отметить, что комплекс с бромом и гидратированный комплекс оставались достаточно стабильными на протяжении всего эксперимента (24 часа). Можно сделать вывод о том, что наибольшей стабильностью обладают комплексы с бромом и иодом в качестве уходящих групп, в то время как комплекс с хлором оказывается наименее стабильным.

Исследования стабильности комплексов иридия показали, что в отличие от ранее изученных комплексов новые соединения иридия **50-53** обладают высокой стабильностью в водном растворе. Для определения стабильности был использован раствор DMSO-d₆ для приготовления исходных растворов, затем была добавлена ионизированная вода для получения рабочих растворов для измерения спектров ЯМР ^{31}P . Все полученные соединения иридия (**50-53**) обладают высокой стабильностью в водном растворе, по крайней мере, в течение 24 часов.

2.2. Исследование антипролиферативной активности

Антипролиферативную активность полученных соединений изучали методом МТТ и определяли как концентрацию полуингибирования IC_{50} . МТТ-тест основан на способности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ метаболически активных клеток восстанавливать производное тетразолия (МТТ, желтый тетразол) до формазана. Спектрофотометрическое измерение оптической плотности позволяет точно оценить специфическую гибель клеток, индуцированную цитотоксическим агентом. Антипролиферативная активность всех полученных бициклофосфитных комплексов, а также модифицированных лигандов **16-18** исследована по отношению к клеточным линиям немелкоклеточного рака легкого A549, фибробластов человека WI38, карциномы толстой кишки человека HCT-116 и аденокарциномы молочной железы человека MCF7. Клетки культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (Invitrogen, Brasilia) при 37 °C и в инкубаторе с содержанием CO_2 около 5 %. Все измерения проводились в трех независимых повторах в сравнении с клинически используемым противоопухолевым препаратом цисплатином в качестве внутреннего стандарта (Таблица 5).

Известно, что координация токсичного металла к глюкозосодержащим лигандам в ряде случаев приводит к потере или снижению антипролиферативной активности. Как и для аналогичных комплексов Ru, координация глюкозофосфатных лигандов к металлоорганическому центру иридия привела к значительному снижению антипролиферативной активности для соединений **24-46** и **50-53** ($IC_{50} > 150$ мкМ), даже по сравнению с исходными димерными комплексами.

Обнаружено, что антипролиферативная активность полученных комплексов Ir и Ru не зависит от наличия и природы основания (урацил, тимин) или 5-фторурацила, включенных в соединения, а также от природы атома галогена и гетероциклического фрагмента в структурах соединений.

Важно отметить, что модификация структуры введением биологически активного соединения бексаротен на порядок увеличивает цитотоксичность соединений. Модифицированные фосфиты проявляют цитотоксичность в микромолярном диапазоне, а их активность выше, чем для известного противоопухолевого препарата цисплатина.

Координация фосфатных лигандов с остатком глюкозы к металлоорганическому центру Au(I) привела к значительному снижению активности, подобная тенденция наблюдается также и для модифицированных фосфитов, но в меньшей степени. Данный факт может быть связан с достаточно быстрым гидролизом соединений золота, а также с затруднением проникновения в клетку соединений, которые содержат экзогенный металл. Несмотря на уменьшение активности, комплексы золота **29**, **30** и **31** могут представлять интерес для дальнейшего изучения.

Комплексы рутения **33** и **34** с оксалатным фрагментом проявили достаточно низкую активность, однако металлоорганические комплексы Ru(II) с 4-изопропилтолуолом и модифицированными фосфитами оказались наиболее активными из всего ряда полученных в работе соединений.

Следует отметить, что комплекс **47** показал значение IC_{50} практически на порядок ниже, чем IC_{50} для известного противоракового препарата цисплатина. Также была обнаружена зависимость активности от природы пиримидинового основания в структуре соединения, так как комплекс рутения с фрагментом 5-фторурацила оказался 5 раз менее активен, чем аналогичное соединение с фрагментом тимина.

Таблица 5. Значения IC₅₀ лигандов **21-23**, комплексов **Au(I), Ru(II), Ir(III)** и клинически используемых противоопухолевых соединений бексаротен и цисплатин

Соединение / металл	IC ₅₀ , мкМ / Клеточные линии			
	A549	WI38	HCT116	MCF7
21	86.6 ± 5.9	59.9 ± 4.2	31.9 ± 3.7	49.2 ± 2.6
22	89.4 ± 8.0	28.3 ± 2.1	52.2 ± 1.9	71.0 ± 1.3
23	71.2 ± 6.6	42.7 ± 4.2	26.1 ± 2.6	41.7 ± 2.3
25 / Au	>150	>150	>150	>150
26 / Au	>150	>150	>150	>150
27 / Au	>150	>150	>150	>150
28 / Au	>150	>150	>150	>150
29 / Au	108.4 ± 6.2	76.2 ± 9.8	85.0 ± 8.1	105.4 ± 5.9
30 / Au	105.8 ± 2.8	144.3 ± 5.9	120.8 ± 8.5	105.0 ± 0.7
31 / Au	88.6 ± 14.8	84.1 ± 12.0	106.9 ± 5.9	100.8 ± 7.3
33 / Ru	>150	>150	127.4 ± 18.3	>150
34 / Ru	>150	>150	>150	>150
38 / Ru	>150	>150	>150	>150
39 / Ru	>150	>150	>150	>150
40 / Ru	>150	>150	>150	>150
41 / Ru	>150	>150	>150	>150
42 / Ru	>150	>150	>150	>150
43 / Ru	>150	>150	>150	>150
44 / Ru	>150	>150	>150	>150
45 / Ru	>150	>150	>150	>150
46 / Ru	>150	>150	>150	>150
47 / Ru	2.13 ± 0.60	1.03 ± 0.06	1.65 ± 0.30	1.56 ± 0.60
48 / Ru	4.0 ± 0.5	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1
49 / Ru	18.4 ± 0.5	7.1 ± 1.8	7.2 ± 0.5	16.8 ± 2.2
50 / Ir	>150	>150	>150	>150

51 / Ir	>150	>150	>150	>150
52 / Ir	>150	>150	>150	>150
53 / Ir	>150	>150	>150	>150
Бексаротен	85 ± 9	–	53 ± 1	67 ± 13
Цисплатин	8.8±0.9	3.0±0.7	12.3±1.7	12.5±1.2

По результатам всех проведенных исследований изучения цитотоксичности определены соединения - лидеры как для комплексов рутения (II) – **47**, так и для комплексов золота (I) – **29**. Предполагается, что данные комплексы металлов могут иметь свой уникальный механизм действия, включающий действие на опухолевые клетки всех структурных компонентов соединения.

Безусловно, подтверждение подобной гипотезы, а также подтверждение увеличения селективности данных субстанций требует проведения испытаний *in vivo* и дальнейших исследований, таких как накопление соединения в митохондриях и взаимодействие с тиоредоксинредуктазой как наиболее перспективной мишени.

2.3. Ингибирование фермента тиоредоксинредуктазы TrxR

Одной из мишеней, предлагаемых для комплексов металлов, в частности, Au, является тиоредоксинредуктаза TrxR. TrxR — это Se-зависимый фермент цикла тиоредоксина, который содержит в активном центре особую пару селеноцистеин – цистеин.

Соединения золота избирательно реагируют с селеном, в результате чего образовавшийся аддукт ингибирует окислительно-восстановительную активность фермента. Тиоредоксин обладает свойствами антиоксиданта, так как совместно с системой глутатиона нейтрализует активные метаболиты кислорода (АМК), одновременно с этим обладая способностью донора электронов для многих пероксидаз.

Возможность участия соединений рутения в окислительно-восстановительных процессах в клетке, в том числе и вовлечение в цикл тиоредоксина, также предполагалась в ряде исследований.

На основании полученных данных по цитотоксичности новых соединений предложены два соединения-лидера в ряду комплексов рутения и золота (**29** и **47**) для дальнейшего тестирования на возможность взаимодействия с тиоредоксинредуктазой TrxR1. Комплексы рутения и золота с урацильным фрагментом в фосфитном лиганде, модифицированным введением бексаротена, исследованы в концентрации 100 мкМ (Таблица 6).

Обнаружено, что только соединение **29** значимо ингибирует активность TrxR1 печени мышей на 88%.

Исследование концентрационной зависимости активности соединения **29** показало, что данный комплекс является микромолярным ингибитором TrxR1 с $IC_{50} = 32,06 \pm 4,20$ мкМ.

Таблица 6. Данные ингибирования TrxR1 соединениями **29** и **47**

Проба	AUC _{Сигнал-время}	Ингибирование TrxR1, %
Контрольная	240,3±6,8	0,00±3,6
Холостая	4,2±1,4*	100,0±2,1*
29	32,0±1,5*	88,2±1,2*
47	250,4±0,4	-4,2±2,4

* - значимо к контрольной пробе согласно критерию Краскелла-Уоллеса ($p < 0,05$)

Соединение **29** также было исследовано в серийных разведениях от 3,125 до 100 мкМ в 4 независимых сериях (Рис. 11, Таблица 7).

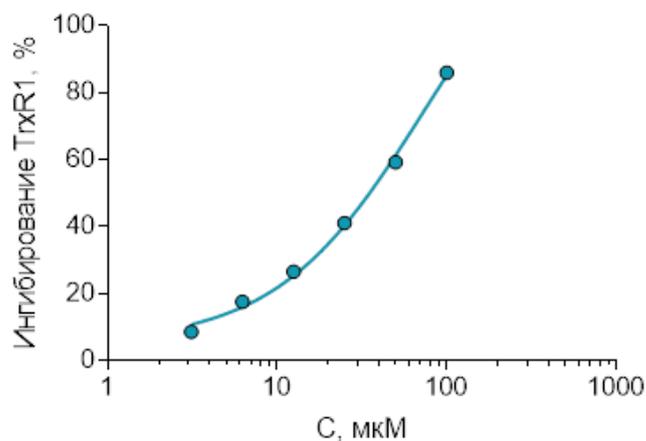


Рис. 11. Концентрационная зависимость ингибирования TrxR1 в присутствии соединения **29** (репрезентативная кривая)

Таблица 7. Эффективность ингибирования TrxR1 в присутствии соединения **29****

Серия	IC ₅₀ , мкМ	SE, мкМ
1	59,5	29,9
2	72,9	31,2
3	42,2	22,6
4	31,1	3,2
Среднее взвешенное	32,1	4,2

** Исследование ингибирования внутриклеточной тиоредоксинредуктазы выполнено в Научном центре инновационных лекарственных средств Волгоградского государственного медицинского университета под руководством академика Спасова А.А.

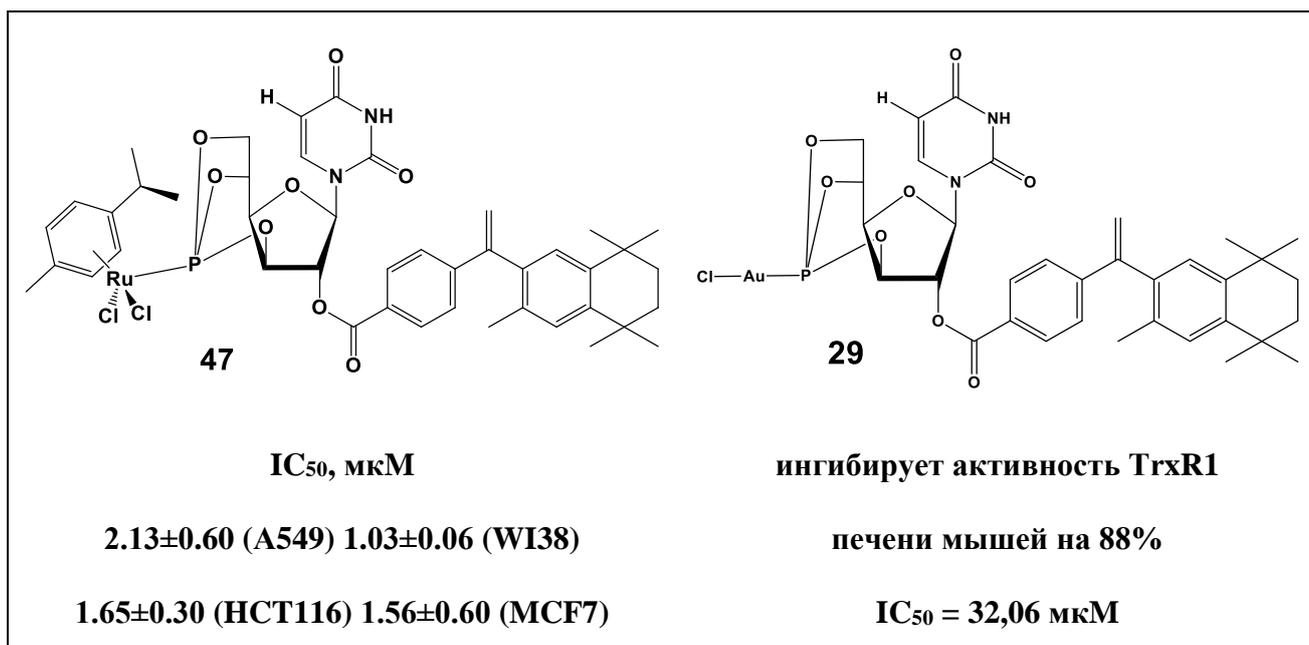
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа зависимости «структура-активность» можно сделать вывод о том, что на проявление цитотоксичности по отношению к клеткам рака человека оказывают влияние природа всех структурных компонентов молекул комплексов металлов: природа металла, природа азотистого основания, наличие остатка глюкозы, а также наличие фрагмента противоопухолевого препарата бексаротена.

Для полученных соединений с лигандами на основе бициклофосфитов выявлены следующие зависимости «структура-активность»:

- введение биологически активного лиганда бексаротена в структуру комплексов Ru(II) и Au(I) приводит к увеличению антипролиферативной активности;
- замена хлоридных лигандов в металлоорганических соединениях Ru(II) на иодные или бромные лиганды приводит к повышению устойчивости полученных комплексов в водных растворах;
- наличие метильной группы в пиримидиновом основании, связанном с бициклофосфитом, значительно увеличивает стабильность комплексов в водных растворах;
- замена металла рутения или золота на иридий в комплексах аналогичной структуры приводит к значительной потере антипролиферативной активности.

По результатам проведенных исследований определены соединения – лидеры: комплекс рутения (II) – **47** и комплекс золота (I) – **29**, содержащие в качестве лиганда бициклофосфит глюкозы с урацилом и фрагментом лекарственного препарата бексаротен.



ВЫВОДЫ

- 1) Впервые предложен синтетический подход и получены серии комплексов Au(I), Ru(II) и Ir(III) с лигандами на основе бициклофосфитов глюкозы, содержащих фрагмент азотистых оснований (тимин, урацил) или 5-фторурацил, а также лекарственного препарата – бексаротена.
- 2) Методом МТТ с использованием клеточных линий немелкоклеточного рака легкого A549, фибробластов человека WI38, карциномы толстой кишки человека HCT-116 и аденокарциномы молочной железы человека MCF7 было установлено, что цитотоксичность комплексов зависит в первую очередь от природы металла.
- 4) Методом МТТ-теста было показано, что цитотоксичность полученных комплексов зависит также от природы уходящей группы, пиримидинового основания, бициклофосфита и наличия биологически активного фрагмента бексаротена.
- 5) Природа металла и пиримидинового основания в фрагменте бициклофосфита влияют на стабильность соединений в водных растворах. Комплексы Ir(III) наиболее устойчивы в реакциях лигандного обмена. Наличие метильной группы в пиримидиновом основании значительно повышает стабильность комплексов.
- 6) Наличие различных галогенов (Cl, Br, I) в качестве уходящих групп для комплексов рутения существенно влияет на их стабильность – наибольшую устойчивость проявляют комплексы с бромом и иодом.
- 7) Введение фрагмента противоопухолевого препарата бексаротена в структуру комплексов Ru(II) и Au(I) приводит к значительному возрастанию антипролиферативной активности.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях

Публикации в журналах Scopus, Web of Science, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационных советах МГУ

1. **Gonchar Maria R.**, Ninin Fedor S., Mazur Dmitrii M., Lyssenko Konstantin A., Milaeva Elena R., Nazarov Alexey A., Organometallic Iridium Complexes with Glucose Based Phosphite Ligands // Inorganics, MDPI. – 2023. – Vol 11. – P. 124. DOI: 10.3390/inorganics11030124. **Impact Factor: 2.5 (Web of Science, Q2 (2023)). Доля вклада 70%.**
2. **Gonchar Maria R.**, Matnurov Egor M., Burdina Tatiana A., Zava Oliver, Ridet Tina, Milaeva Elena R., Dyson Paul J., Nazarov Alexey A., Ruthenium(II)–arene and triruthenium-carbonyl cluster complexes with new water-soluble phosphites based on glucose: Synthesis, characterization and antiproliferative activity // Journal of Organometallic Chemistry, Elsevier

BV. – 2022. – Vol. 919. – P. 121312. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2020.121312. **Impact Factor: 2.345 (Web of Science, Q2 (2022)). Доля вклада 60%.**

3. **Gonchar M.R.**, Ninin F.S., Milaeva E.R., Nazarov A.A., Hydrolytically stable organometallic ruthenium complexes with glucose-based phosphite ligands // Russian Chemical Bulletin, Springer Nature. – 2022. – Vol. 71, no. 5. – P. 962-966. DOI: 10.1007/s11172-022-3497-z. **Impact Factor: 1.704 (Web of Science, Q3(2022)). Вклад автора 65%.**

Другие публикации (тезисы докладов)

1. Назаров А.А., Шутков И.А., **Гончар М.Р.**, Антонец А.А., Милаева Е.Р. Противоопухолевые комплексы рутения с лигандами на основе лонидамин и бексаротена // Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений (KOST2021) Сборник тезисов — Сочи, Россия, 2021. — С. 124.
2. Назаров А.А., Шутков И.А., **Гончар М.Р.**, Антонец А.А., Противоопухолевые соединения рутения с мишень-ориентированными лигандами // 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» Сборник тезисов – Волгоград, Россия, 2021. – С. 113.
3. Матнуров Е.М., **Гончар М.Р.**, Милаева Е.Р., Назаров А.А. Соединения золота и рутения с фосфитными лигандами на основе глюкозы как перспективные антипролиферативные агенты // Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2021» Материалы – Москва, Россия, 2021.
4. **Gonchar M.R.**, Shutkov I.A., Milaeva E.R., Nazarov A.A. Ru(II)-arene oxalate complexes with bexarotene and lonidamine ligands // Mendeleev 2019, the XI International Conference on Chemistry for Young Scientists. Book of abstracts — Saint Petersburg, Russia, 2019. — P. 257.
5. Shutkov I.A., **Gonchar M.R.**, Milaeva E.R., Nazarov A.A. Influence of ligand environment on the stability and activity of Ru(II)-arene anticancer compounds with targeting ligands // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry. Abstract book — Ekaterinburg, Russia, 2019. — P. 286.
6. Shutkov I.A., **Gonchar M.R.**, Milaeva E.R., Nazarov A.A. Influence of structural variation of Ru(II/III) compounds with lonidamine and bexarotene ligands on antiproliferative activity // The Russian Cluster of Conferences on Inorganic Chemistry “InorgChem 2018” — Vol. 1 — Astrakhan, Russia, 2019. — P. 209-210.
7. Nazarov A.A., **Gonchar M.R.**, Matnurov E.M., Milaeva E.R. Ruthenium and Gold Anticancer Complexes Based on Glucose Phosphites // 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15). Book of Abstracts – Osaka, Japan, 2019. – P. OP02.
8. **Гончар М.Р.**, Милаева Е.Р., Назаров А.А. Получение новых соединений Ru(II) с бициклофосфитными лигандами // XXII Международная Черняевская конференция по химии, аналитике и технологии платиновых металлов "Черняев 2019" Сборник тезисов – Москва, Россия, 2019 – С. 69.