


МІНІСТРЕСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. Каразіна

Кафедра органічної хімії

УДК 541.35

 До захисту допускаю
Завідувач кафедри
«__» _____ 2023 д.х.н., проф. А.О. Дорошенко

**БОЛАСЦИДИНИ А-D ВІД СЕРЕДЗЕМНОМОРСЬКОЇ АСЦИДІАНСЬКОЇ
ПОЛІСИНКРАЦІЇ: НОВИЙ КЛАС ОКСИЛІПНІВ**

Кваліфікаційна робота магістра
2 курсу хімічного факультету
ЗАБЕЛІНОЇ ДАР'І СЕРГІЇВНИ

Науковий керівник,
к.х.н., доцент



Л.В. Чепелєва

ХАРКІВ 2023

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота розміщена на 38 сторінках, складається з 2 розділів, містить 26 зображень, 20 джерел згідно з переліком посилань.

Мета роботи: розробити методики одержання боласцидинів. Під час роботи було використано класичні методи органічного синтезу та фізичні методи аналізу.

Об'єкт дослідження: Боласцидини А-Д.

Результати роботи можуть бути використані в процесі пошуку нових біологічно-активних речовин. Отримані речовини можуть бути досліджені на наявність біологічної активності.

Перелік ключових слів: МЕТАБОЛІТ, АСЦИДІЯ, БОЛАСЦИДИНИ А-Д, БОЛААМФІЛ, БОЛА РЕТРОСИНТЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ

ABSTRACT

The Master thesis contains 38 pages, 2 chapters, 26 images, 20 sources according to the bibliography.

The purpose of the work: to develop methods of obtaining bolascidins. Classical methods of organic synthesis and physical methods of analysis were used during the work.

The object of research: Bolascidins A-D.

The results of the work can be used in the process of searching for new biologically active substances. The obtained substances can be tested for biological activity.

Keywords: METABOLITES, ASCIDIA, BOLASCIDINS A-D, BOLAAMPHIPHIL, BOLA RETROSYNTHETIC ANALYSIS

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	2
ЗМІСТ	4
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ	6
ВСТУП	7
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	8
1.1 Загальна інформація про асцидії	8
1.2 Метаболізм представників роду <i>Polysyncrator</i>	9
1.3 Екстракція, фракціонування та виділення	11
1.4 Структурне визначення	12
1.5 Гіпотеза біосинтезу	14
1.6 Боли	15
1.7 Біологічна активність	17
1.7.1 Протимікробна дія	17
1.7.2. Антикіназна активність	18
1.7.3 Протизапальна активність	19
1.7.4 Цитотоксичність	19
1.8 Ретросинтетичний аналіз	19
1.8.1 Синтон А	20
1.8.2 Синтон В	21
1.8.3 Синтон блоку А + В	22
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	23
2.1 Прилади та матеріали	23
2.2 БЛОК А: Синтез похідної Боре	23
2.2.1 Гідроборування алкінів	23
2.2.2 Первинний захист алкоголю	24
2.3 БЛОК В: Стереокерований синтез проміжної сполуки В.....	24
2.3.1 Синтез (R)-гліцидола та (S)-гліцидола	24
2.3.2 Захист первинного спирту за допомогою TBS-Cl	25
2.3.3 Відкриття (R)-гліцидолу та (S)-гліцидолу	26
2.3.4 Захист вторинного спирту TBS-Cl	27
2.3.5 Селективні зняття захисту з первинного спирту	28

2.3.6	Окислення первинного спирту: SWERN	28
2.3.7	Зчеплення Такаї.....	29
2.2	БЛОК С: Синтез ліпідного ланцюга С.....	2930
2.4.1	Монобромовання діолу	31
2.4.2	Приєднання трифенілфосфіну.....	31
2.4.3	Зняття захисту бромоацетальдегід діетиловим ефіром.....	32
2.4.4	Селективне гідрування подвійного зв'язку.....	33
2.5	Обговорення результатів	33
	ВИСНОВКИ	36
	СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	37

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

COSY	Correlation Spectroscopy
CSA	камфорсульфонова кислота
DCM	Дихлорметан
DMAP	4-диметиламінопіридин
DMSO	Диметилсульфоксид
Et	Етил
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Me	метил
MOM-Cl	хлорметилметиловий ефір
n-BuLi	бутиллітій
NOESY	Nuclear Overhauser Spectroscopy
Ppm	Partie par millions
TBS-Cl	трет-бутилдиметилсилілхлорид
TIPS-Cl	триізопропілсиліл хлорид
TMS acetylene	триметилсилілацетилен
TFA	трифлуороцтова кислота
ВЕРХ	Високоєфективна рідинна хроматографія
ТГФ	тетрагідрофуран
ЯМР	Ядерно Магнітний Резонанс

ВСТУП

Морське середовище є домом для багатьох видів, які через умови навколишнього середовища виробляють специфічні молекули, часто відмінні від наземного середовища, що позначаються терміном спеціалізовані метаболіти. Останні, зокрема через умови підводного життя, представляють численні біологічні дії: боротьба з хижакami, конкуренція та між- та внутрішньовидове спілкування. Крім того, більшість морських макроорганізмів живе в більш-менш тісному зв'язку з мікроорганізмами. Декілька досліджень виявили, що певні мікроорганізми є фактичними виробниками метаболітів, екстрагованих і виділених із глобально вивчених морських макроорганізмів.

У Середземному морі, поверхня якого становить лише 0,8% поверхні океанів, міститься від 4 до 18% світового морського біорізноманіття, з яких чверть видів є ендеміками [1]. Існує кілька сотень випадково інтродукованих морських видів, таких як певні молюски або членистоногі, зокрема з Індійського чи Тихого океанів. У Середземному морі зареєстровано понад 17 000 морських видів, у тому числі 190 видів зелених водоростей (7% світової кількості), 681 вид губок (12% світової кількості) і 229 видів асцидій (5% світової кількості). Еукаріотичні та прокаріотичні мікроорганізми складають більше чверті середземноморських морських видів.

В останні десятиліття молекули, що виробляються середземноморськими морськими організмами, були предметом численних досліджень. Таким чином, між 1965 і 2014 роками було описано понад 2358 нових природних продуктів. Багато цих отриманих сполук проявляють різні лікувальні властивості.

Основною метою цієї роботи є розробка методів синтезу молекул Боласцединів A-D, які були виділені з асцидії *Polysyncraton sp.* для подальшого вивчення їх біологічної активності.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Загальна інформація про асцидії

Асцидії – морські хордові, що належать до класу покривників. Мають розміри до 40 см. Існує понад 2000 сучасних видів [2].

Родина *Didemnidae* ряду *Aplousobranchia* налічує дев'ять родів: *Atrium*, *Clitella*, *Coelocormus*, *Didemnum*, *Diplosoma*, *Leptoclinides*, *Lissoclinum*, *Polysyncrator* і *Trididemnum*. Серед останніх рід *Polysyncrator* (табл. 1.1) є другим за представленістю родом (98 видів) після *Didemnum* (237 видів) [3].

Таблиця 1.1 Класифікація *Polysyncrator*

Царство тварин	
Тип	Хордові
Клас	Асцидії
Ряд	<i>Aplousobranchia</i>
Родина	<i>Didemnidae</i>
Рід	<i>Polysyncrator</i>

Асцидії є джерелом різних класів молекул з біологічними властивостями, що представляють інтерес у галузі протипухлинних, протівірусних та протимікробних засобів.

Серед асцидій було описано дуже мало метаболітів з видів родини *Polysyncrator* (рис 1.1), хоча це другий найбільш представлений рід серед *Didemnidae*. Група, яка займається вивченням морських натуральних продуктів Університета Лазурного Узбережжя впродовж багатьох років займається

вивченням метаболітів морських безхребетних. В одному з досліджень було досліджено метаболіти середземноморської асцидії, *Polysyncraton* sp., яка не була предметом жодного попереднього хімічного дослідження. Робота була проведена на зразку *Polysyncraton* sp., які були зібрані в Іспанії в 2012 році. Було виявлено наявність кількох потенційно нових метаболітів.



Рисунок 1.1 Фотографія *in situ* *Polysyncraton* (©Philippe Amade)

1.2 Метаболізм представників роду *Polysyncraton*

Лише в трьох дослідженнях було описано деякі метаболіти у видів роду *Polysyncraton*, хоча це другий найбільш представлений рід у *Didemnidae*. Серед цих метаболітів існує велика невідповідність у ідентифікованих хімічних групах.

Робота, проведена на *Polysyncraton lithostrotum*, зібраному на островах Фіджі, призвела до виділення двох метаболітів, які зазвичай ідентифікуються з

мікроорганізмів, з протипухлинними властивостями: нанаміцину [4], ендіїнової сполуки, та вітілевуаміду [5] (рис. 1.2), біциклічний депсипептид.

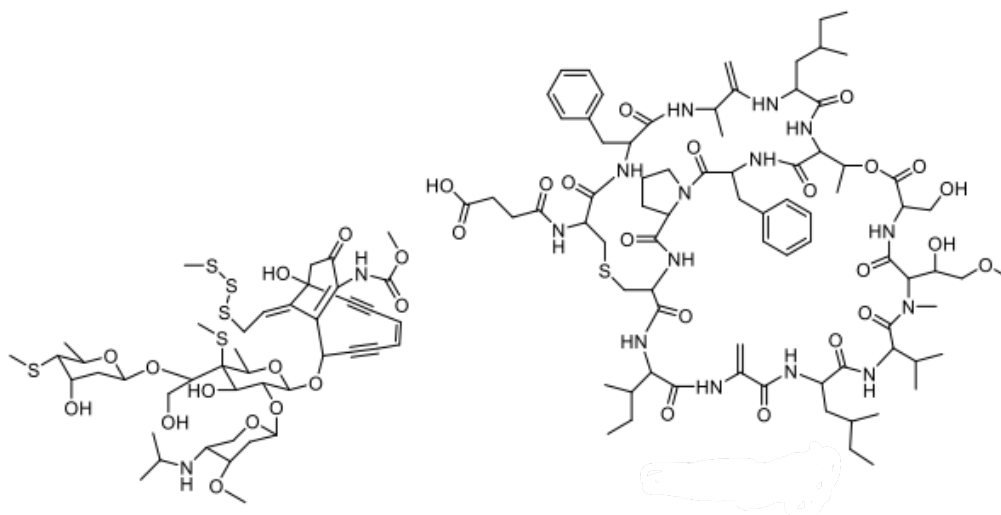


Рисунок 1.2 Структури виділені з *P. lirhostrotum* [4,5]

Крім того, із зразка *Polysyncraton echinatum*, зібраного в Австралії в 2004 році, було виділено три алкалоїди піридоакридинового типу з антитрипаносомальними властивостями [6]. Це 12-дезоксискидиден, виділений вперше, і два інших аналогів, асцидиден і ейлатин (рис. 1.3), раніше описаний з асцидій *Didemnum sp.* і *Eudistoma sp.* [7].

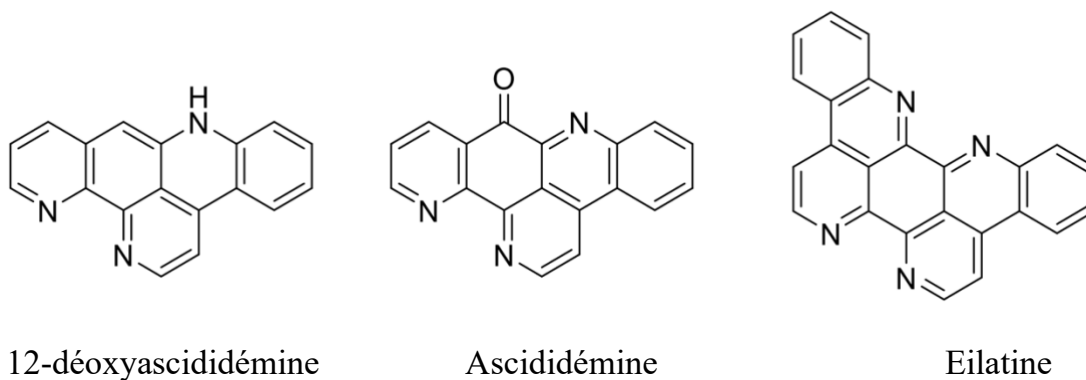


Рисунок 1.3 Структури піридоакридинів, виділених з *P. Echinatum* [6]

Нарешті, дослідження екземпляра *Polysyncraton* sp. Зразки, відібрані в 2008 році біля острова Уруп, привели до виділення мікаламиду А[8], раніше виділеного з губки роду *Muscile* [9], який має хороші протипухлинні властивості (рис. 1.4).

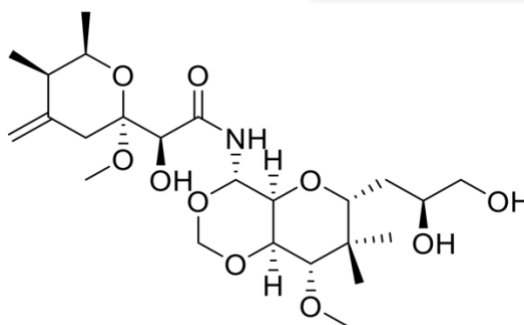


Рис. 1.4 Структура мікаламиду А.

1.3 Екстракція, фракціонування та виділення

Асцидію, попередньо висушену сублімацією, кілька разів екстрагували метанолом під ультразвуком. Метанольний екстракт фракціонували рідинною хроматографією для отримання фракцій.

Фракції були проаналізовані за допомогою протонного ЯМР. Попередній аналіз спектру ^1H ЯМР виявив наявність груп, характерних для поліненасичених ліпідів: кілька сигналів, характерних для метиленів одного або кількох довгих насичених аліфатичних ланцюгів, кілька неекраниваних сигналів, що відповідає етиленовим протонам, і сигнали, характерні для протонів поблизу гетероатомів [10].

Попередній аналіз за допомогою мас-спектрометрії з низькою роздільною здатністю виявив наявність сполук із середньою молекулярною масою від 650 до 725 а.е.м. Крім того, аналіз спектрів фрагментації за допомогою мас-спектрометрії

дозволив припустити, що це, швидше за все, фосфоліпіди. Дійсно, більш детальне вивчення мас-спектрів, пов'язаних із цими сполуками, дає змогу знайти характерні фрагменти функції фосфохоліну, зокрема з присутністю наступних іонів: дуже інтенсивний сигнал m/z 184.0, характерний для іон фосфохоліну $[\text{Me}_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{PO}_3\text{OH}]^+$, сигнал m/z 104.1, що свідчить про присутність холіну $[\text{Me}_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OH}]^+$, і, нарешті, сигнал m/z 86.1, що відповідає іону $[\text{Me}_3\text{NCH}_2=\text{CH}]^+$. За допомогою ^{31}P ЯМР підтвердити наявність фосфору для сполук.

Згодом фракції фракціонували за допомогою рідинної хроматографії на C18 щепленому силікагелі (SPE) шляхом послідовних проходжень двох розчинників або сумішей розчинників із зменшенням полярності. Потім, цікаві метаболіти, очищали напівпрепаративною ВЕРХ.

1.4 Структурне визначення

Загалом було виділено 4 сполуки. За допомогою мас-спектрометрії з високою роздільною здатністю були отримані їх молекулярні формули. Метаболіти, що належать до виділеного сімейства сполук, називаються «боласцидини». Їх структури були визначені за допомогою одно- та двовимірних аналізів ЯМР (експерименти ^1H , ^{13}C ЯМР, COSY ^1H - ^1H і HMBSC ^1H - ^{13}C).

Першу сполуку виділили у вигляді білої твердої речовини. Її молекулярну формулу, $\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}_2$, було отримано з аналізу за допомогою мас-спектрометрії високої роздільної здатності в позитивному режимі HRESI(+)-SM (псевдомолекулярний іон $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 721,4301). Вивчення спектральних даних (SMHR, ЯМР) дозволило ідентифікувати структуру боласцидину С (рис. 1.5).

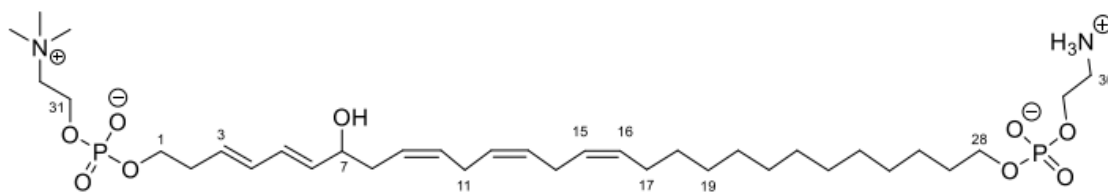


Рисунок 1.5 Структура боласцидину С

Другу сполуку виділили також у вигляді білої твердої речовини. Його формулу, $C_{32}H_{60}N_2O_9P_2$, було отримано з аналізу мас-спектрометрії (псевдомолекулярний іон $[M+H]^+$ m/z 679,3836). Дослідження спектральних даних привело до структури боласцидину D (рис. 1.6).

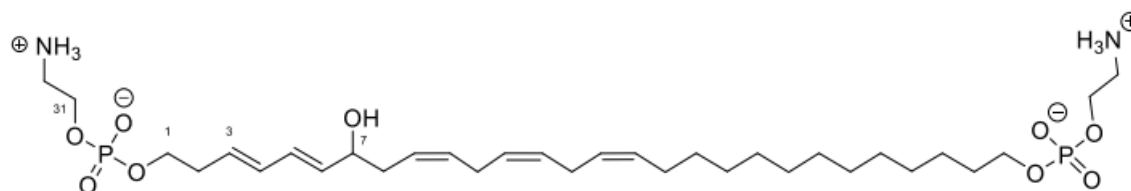


Рисунок 1.6 Структура боласцидину D

Це метаболіти болаамфільного типу, виділені вперше.

Ідентичні першим двом сполукам були виділені 3 і 4 виділили у вигляді білих твердих речовин. Їх молекулярні формули, $C_{33}H_{65}N_2O_9P_2$ і $C_{30}H_{58}N_2O_9P_2$, було отримано з аналізу за допомогою мас-спектрометрії (псевдомолекулярний іон $[M+H]^+$ m/z 695,4148; і m/z 653,3681).

$C_{33}H_{65}N_2O_9P_2$ дозволило ідентифікувати структуру боласцидину А (рис. 1.7).

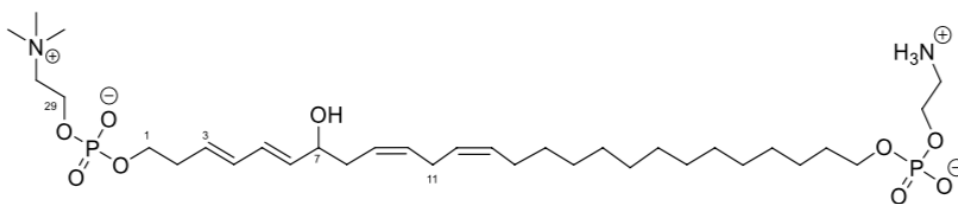


Рисунок 1.7 Структура Боласцидину А.

$C_{30}H_{58}N_2O_9P_2$ відповідає боласцидину В (рис. 1.8).

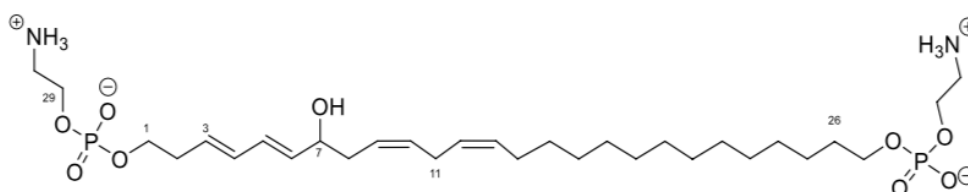


Рисунок 1.8 Структура боласцидину В

1.5 Гіпотеза біосинтезу

Боласцидини А-D, виділені з *Polysyncraton* sp. це фосфоліпіди, що складаються з двох ідентичних або різних полярних головок типу фосфохоліну або фосфоетаноламіну та центрального моногідроксильованого та поліненасиченого алкільного ланцюга. Це болаамфіфіли (або бола) типу болаліпідів. Це перший випадок, коли болаамфіфіли були виділені з асцидії.

Їх біосинтез, ймовірно, близький до біосинтезу похідних оксиліпіну для моногідроксильованого та поліненасиченого центрального ланцюга та фосфатидилхоліну або етаноламіну для обох кінців.

Гіпотетичний шлях біосинтезу для сполук запропоновано на рисунку 1.9.

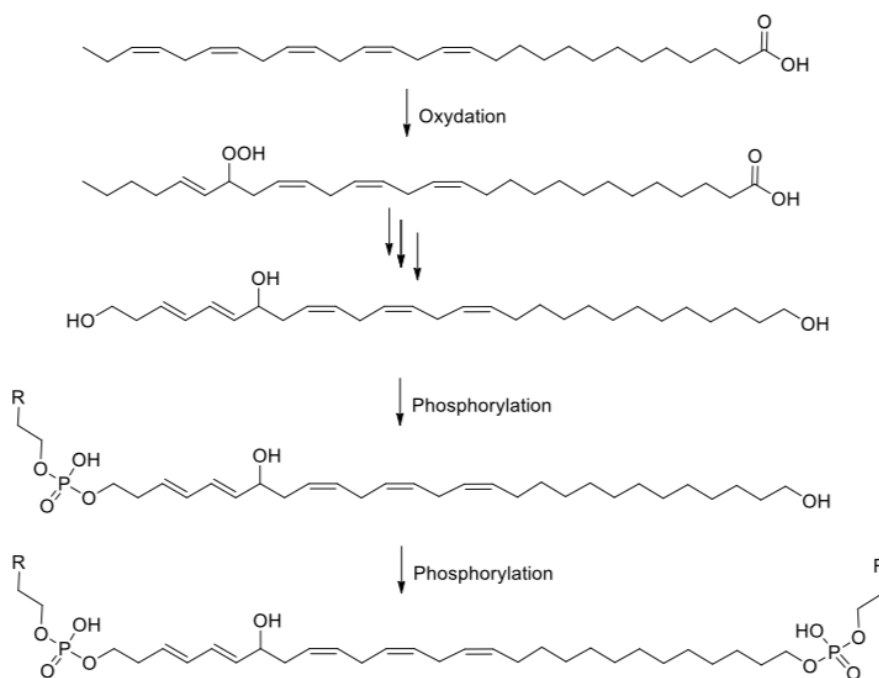


Рисунок 1.9 Запропонований гіпотетичний шлях біосинтезу метаболітів, виділених з *Polysyncraton sp.* (R = +NMe₃ або NH₂).

1.6 Боли

Бола — це природні або синтетичні поверхнево-активні речовини, що складаються з двох гідрофільних головок (однакових або різних, заряджених або незаряджених) і гідрофобного центрального ланцюга, часто довгого, з дуже різноманітними характеристиками (насиченими або ненасиченими, заміщеними або незаміщеними)[11] (рис. 1.10).

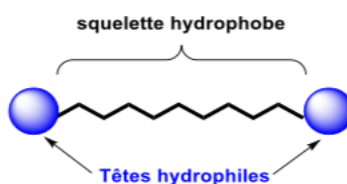


Рисунок 1.10 Схематичне зображення боли

Боли самозбираються при чітко визначеній концентрації залежно від центрального алкільного ланцюга (міцели, одношарові ліпідні мембранні везикули, волокна тощо) [12] (рис. 1.11).

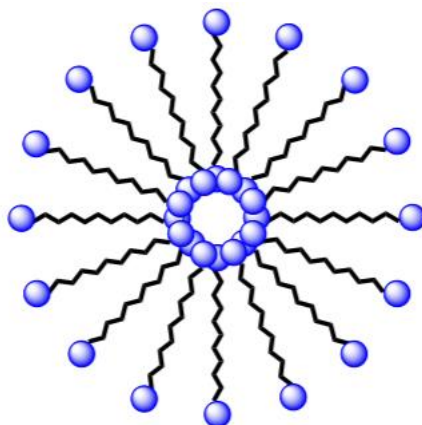


Рисунок 1.11 Схематичне зображення міцелярної організації бола.

Ліпідні мембрани архей складаються з болаамфіфілів. Вони є основним природним джерелом цього сімейства молекул [11]. Це дозволяє їм протистояти екстремальним умовам температури та кислотності середовища, в якому вони живуть.

Загалом, фосфоліпіди є переважаючим класом ліпідів, що виробляються асцидіями. Для деяких видів частка фосфоліпідів може складати від 30 до 90% загальної кількості ліпідів [13].

Серед нетрадиційних похідних фосфоліпідів з асцидії одне дослідження, проведене на виді сімейства *Didemnidae*, до якого належить рід *Polysyncraton*, повідомляє про виробництво силаденосеринолів A-L, сульфованих серинолів, що складаються з групи фосфохоліну або кінцевого фосфоетаноламіну [14]. Останні беруть участь у взаємодії, яка важлива для терапії раку.

Кілька бола також були розроблені, синтезовані та оцінені на їх фізико-хімічні властивості (інкапсуляція, транспорт іонів, провідні поверхні тощо)[11], але вони не були предметом біологічної оцінки.

1.7 Біологічна активність

Лише перші дві сполуки були оцінені на їх антимікробні, антикіназні, протизапальні та цитотоксичні властивості. Пошук антибактеріальних властивостей проводився у співпраці з командою доктора Гаєтана Бургауда з Університетської лабораторії біорізноманіття та мікробної екології (LUBEM) Університету Західної Бретані (UBO), що базується в Плузані [10].

Антикіназні, протизапальні та цитотоксичні властивості були оцінені у співпраці з платформою молекулярного скринінгу «KISSf» («Спеціалізована установа скринінгу інгібіторів кінрази») Station Biologique de Roscoff. В даний час проводиться оцінка антиацетилхолінестеразних і антифосфоліпазних властивостей [10].

1.7.1 Протимікробна дія

Попередній антимікробний тест проводили в рідкому середовищі в мікропланшетах, для різних концентрацій. Ці сполуки виявилися неактивними проти *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella*

oxytoci, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* і *Listeria monocytogenes*. З іншого боку, на відміну від боласцидину С, боласцидин D має легкий пригнічуючий ефект на *Streptococcus equinus*. Через низьку отриману антимікробну активність антимікробні випробування не проводились широко.

1.7.2 Антикіназна активність

Кінази — це ферменти, що забезпечують фосфорилювання кількох субстратів АТФ. Існує дуже велика кількість кіназ. Серед останніх протеїнкінази дозволяють фосфорилювати-дефосфорилювати амінокислоти, що мають гідроксильну групу (серин, треонін, тирозин), з метою регуляції метаболічних процесів клітин. Ці кінази беруть участь у багатьох патологіях. Вони залучені до паразитарних захворювань [15], до багатьох захворювань людини (переважно раку [16]), до загибелі клітин [85], залучена до трисомії 21 і раннього розвитку хвороби Альцгеймера [17].

Відсотки залишкової активності кіназ оцінювали в присутності кожної сполуки, у рідкому середовищі.

Сполуки не виявляють впливу на активність досліджуваних кіназ і навіть індукують підвищення активності в деяких випадках [10].

1.7.3 Протизапальна активність

Запалення – це комплекс захисних реакцій, що генеруються імунною системою організму у відповідь на внутрішню (рак) або зовнішню (фізичного, хімічного, біологічного походження тощо) агресію. Протизапальні властивості сполук були оцінені. Вони проявляють незначну протизапальну активність.

1.7.4 Цитотоксичність

Сполуки оцінювали на їх цитотоксичність щодо двох ліній пухлинних клітин: остеосаркома і лейкемія. Отримані результати показують, що вони не виявляють цитотоксичної активності.

1.8 Ретросинтетичний аналіз

На прикладі болісцидину С провели ретросинтетичний аналіз. На рисунку 1.12 показано на які синтони можна розділити цільову молекулу.

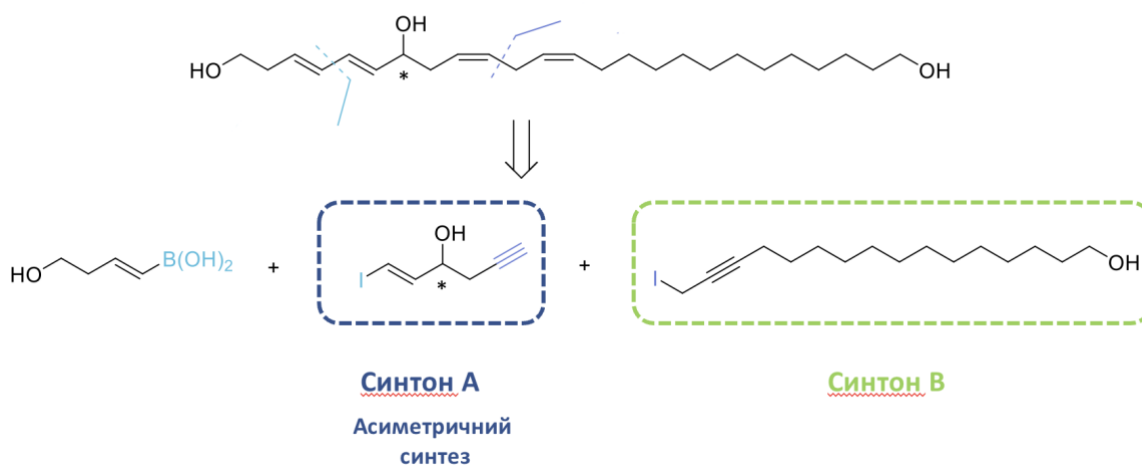


Рисунок 1.12 Ретросинтетичний аналіз болісцидину С

1.8.1 Синтон А

На основі синтону, який був описаний під час тотального синтезу Resolvine D3 (рис 1.13.) [20], була розроблена стратегія синтезу синтону А (рис 1.14).

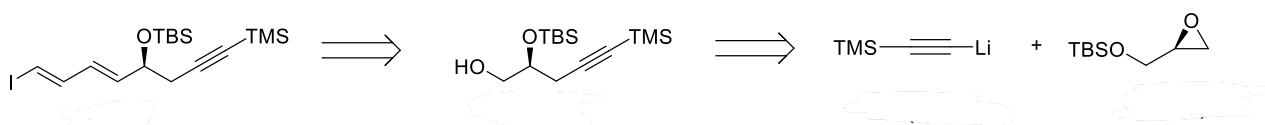


Рисунок 1.13. Синтон з тотального синтезу Resolving D3

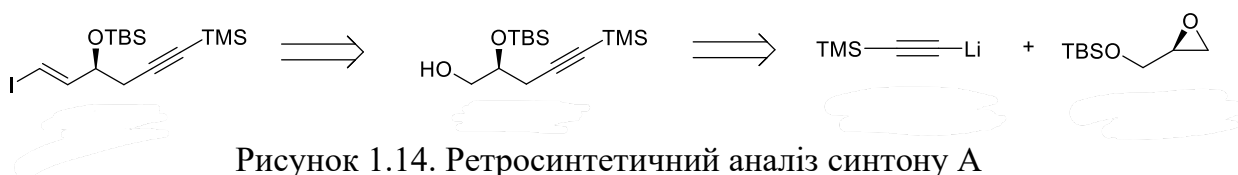


Рисунок 1.14. Ретросинтетичний аналіз синтону А

На рисунку 1.15 зображено запропонований синтез синтону А.

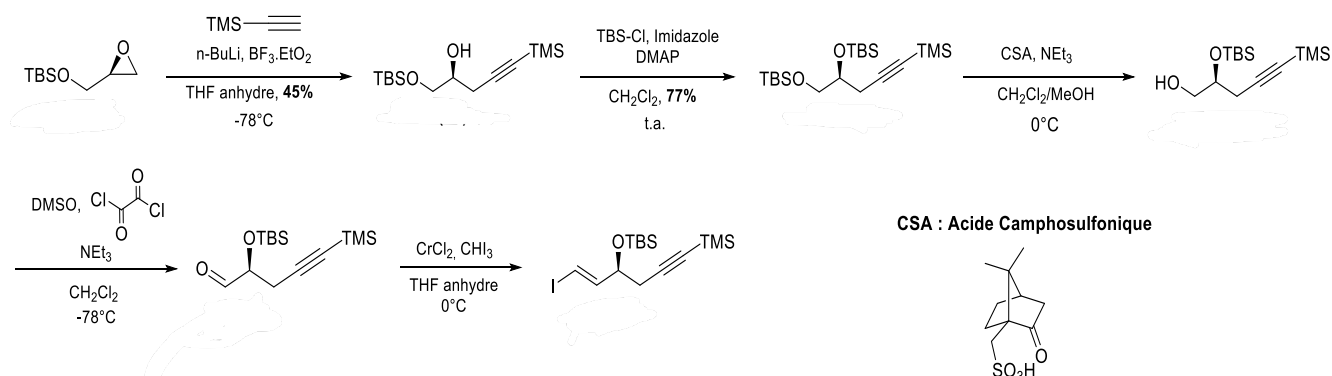


Рисунок 1.15 Синтез синтону А

1.8.2 Синтон В

На рисунку 1.16 зображено запропонований синтез синтону В.

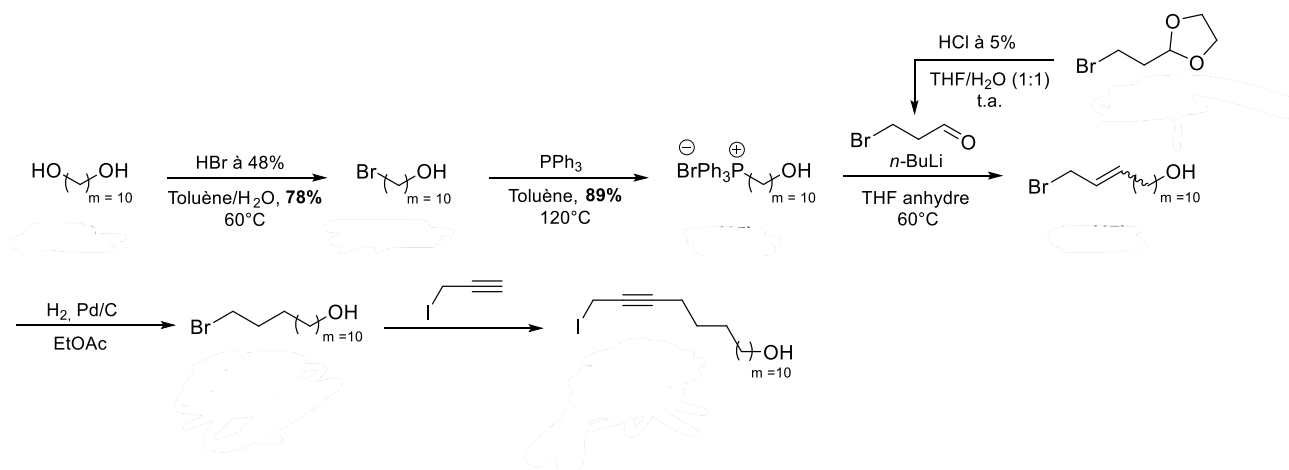


Рисунок 1.16 Синтез синтону В

1.8.3 Синтез блоку A+B

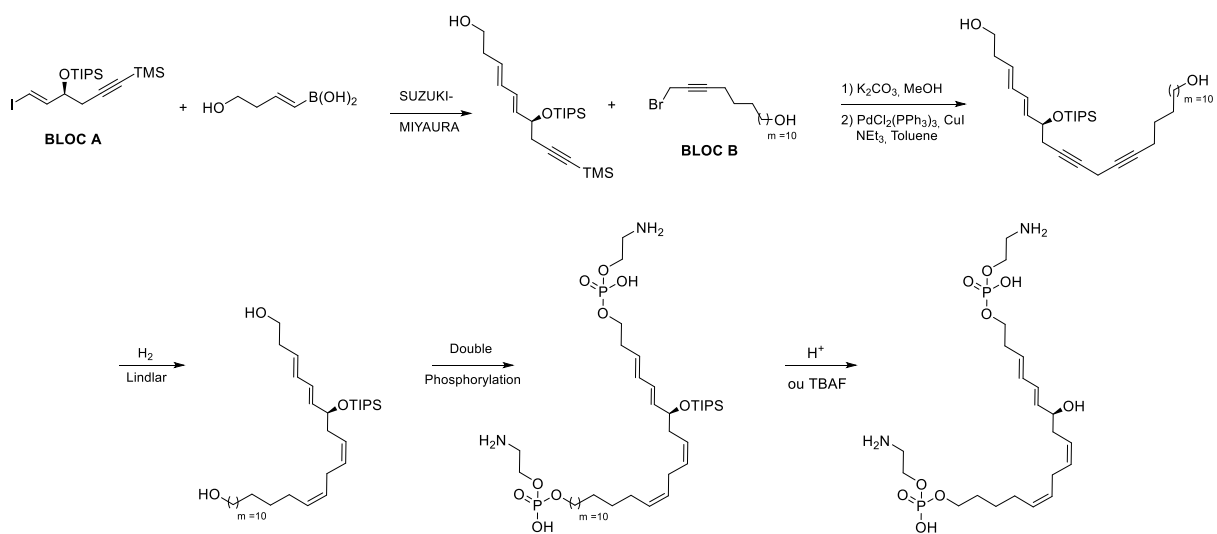


Рисунок 1.17 З'єднання двох синтонів

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Прилади та матеріали

Якщо не зазначено інше, комерційні реагенти та розчинники використовували без додаткового очищення. Для спектрів ЯМР використовували спектрометр Bruker AVANCE (Brüker, Rheinstetten, Німеччина) при 400 МГц (^1H) або 101 МГц (^{13}C). Хімічні зсуви були вказані в дельта-одинацях (δ) частин на мільйон (ppm) нижче поля від тетраметилсилану (TMS) як внутрішнього стандарту. Шаблони піків позначаються наступним чином: s, синглет; d, дублет; t, триплет; m, мультиплет; q, квартет. Константи зв'язку були вказані в Герцах (Гц). 1D спектри обробляли за допомогою програмного забезпечення TOPSPIN 2.1 NMR (BRUKER). Аналітичну тонкошарову хроматографію (ТШХ) проводили на силікагелі з попереднім покриттям Sigma Aldrich, а сполуки візуалізували УФ-опроміненням (254 нм) та/або фарбуванням розчином PMA та 2,4-DNPH (реактив Брейді). Колонкову флеш-хроматографію проводили на колонках з силікагелем (Interchim Puriflash silica HP 15 мкм) на системі Puriflash XS420.

2.2 БЛОК А: Синтез похідної Боре (Сузукі-Міяура)

2.2.1 Гідроборування алкінів

До перемішаного розчину 3-бутин-1-олу (0,748 мл, 10 ммоль) у ТГФ (3 мл) додавали по краплях катехолборан (20 мл, 1,0 М розчин у ТГФ, 20 ммоль) при кімнатній температурі. Після припинення виділення газу суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 5 годин і давали охолонути до кімнатної температури. До охолодженої реакційної суміші додавали воду (10 мл). Потім

суміш перемішували протягом 2 годин при 20°C. Розчинник випарювали і водний шар промивали ефіром (3×15 мл). Воду сушили сублімацією, і отриману речовину використовували без додаткового очищення.

2.2.2 Первинний захист алкоголю

До розчину продукту (5,7 г, 19,9 ммоль) у безводному CH_2Cl_2 (30 мл) додають TBS-Cl (3,6 г, 23,9 ммоль), імідазол (1,6 г, 23,9 ммоль) і DMAP (243 мг, 1,99 ммоль) при 0°C. Реакційну суміш залишали перемішуватися при кімнатній температурі протягом ночі. Потім її гасили насиченим водним розчином NH_4Cl (30 мл) і екстрагували Et_2O (3 × 30 мл). Об'єднаний екстракт сушили MgSO_4 , фільтрували та випарювали, отримуючи неочищену прозору олію, яку потім хроматографували на силікагелі, використовуючи суміш EtOAc /гексан як елюент, щоб отримати продукт.

2.3 БЛОК В: Стереокерований синтез проміжної сполуки В

2.3.1 Синтез (R)-гліцидолу и (S)-гліцидолу

У висушену в печі круглодонну колбу на 500 мл, оснащену перегородкою та мішалкою, завантажували порошкоподібні молекулярні сита 3 А (3,5 г) і дихлорметан (190 мл). В атмосфері азоту додавали R,R-(+)-діізопропілтарtrat (1,25 мл, 5,95 ммоль) і аліловий спирт (6,8 мл, 0,1 моль) і розчин охолоджували до -5°. Додали титан(IV) ізопропоксид (1,5 мл, 5,0 ммоль) і суміш перемішували при -5±2°C. протягом 10-30 хв. Комерційний 80% гідропероксид кумолу (0,2 моль, висушений над порошкоподібним ситом 3 А) додавали повільно протягом 30 хв.

Суміш перемішували в атмосфері азоту при $-3\pm 2^{\circ}$, поки аналіз за допомогою GPLC (карбоваксовий капіляр, 70°) не показав $>95\%$ реакції (5 годин). Реакцію гасили додаванням лимонної кислоти (1 г) в ефірі (100-200 мл). Охолоджуючу баню видаляли і суміш перемішували протягом 20-30 хв. Після фільтрування через шар діатоміт фільтрат концентрували та переганяли при зниженому тиску, отримуючи (S)-гліцидол (0,065 моль 65%, що містить невелику кількість кумолу). Вихід: 65% від теоретичного.

2.3.2 Захист первинного спирту за допомогою TBS-Cl

До розчину продукту (5,7 г, 19,9 ммоль) у безводному CH_2Cl_2 (30 мл) додають TBS-Cl (3,6 г, 23,9 ммоль), імідазол (1,6 г, 23,9 ммоль) і DMAP (243 мг, 1,99 ммоль).) при 0°C . Реакційну суміш залишали перемішуватися при кімнатній температурі протягом ночі. Потім її гасили насиченим водним розчином NH_4Cl (30 мл) і екстрагували Et_2O (3×30 мл). Об'єднаний екстракт сушили MgSO_4 , фільтрували та випарювали, отримуючи неочищену прозору олію, яку потім хроматографували на силікагелі, використовуючи суміш EtOAc/гексан (1:24) як елюент, щоб отримати продукт.

2.3.3 Відкриття (R)-гліцидолу та (S)-гліцидолу

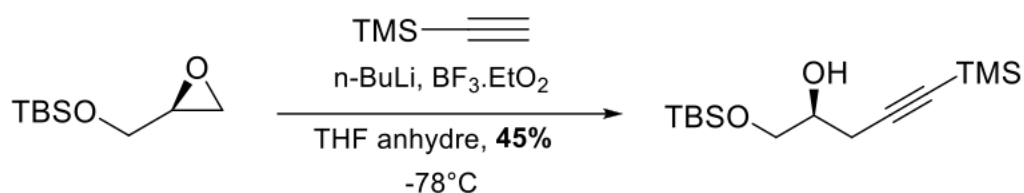


Рисунок 2.1 Відкриття гліцидолу

До розчину TMS ацетилену (5,6 мл, 39,8 ммоль) у ТГФ (40 мл) додавали 2,5М n-BuLi (15,9 мл, 39,8 ммоль) при -78°C . Через 0,25 години $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (5,0 мл, 39,8 ммоль) додавали по краплях при -78°C . До реакційної суміші додавали (R)-О-*t*-бутилдиметилсилилгліцидол (5,0 г, 26,5 ммоль) і перемішували протягом 3 годин при -78°C . Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури, гасили насиченим водним розчином NH_4Cl (45 мл) і екстрагували Et_2O (3×45 мл). Органічний шар сушили MgSO_4 , фільтрували і розчинник видаляли у вакуумі. Неочищену реакційну суміш очищали на силікагелі, використовуючи EtOAc-гексан (4%) як елюент, щоб отримати 2R,1, (трет-бутилдиметил-силілокси)-5-триметилсиліл-пент-4-ін-2-ол (5,5 г, 73%) у вигляді прозорої безбарвної олії. Вихід: 73% від теоретичного.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.78 (dt, $J = 11.1, 5.9$ Hz, 1H), 3.72 (dd, $J = 10.0, 4.1$ Hz, 1H), 3.63 (dd, $J = 10.0, 5.6$ Hz, 1H), 2.51 – 2.41 (m, 2H), 1.64 (s, 1H), 0.91 (s, 11H), 0.14 (s, 2H), 0.09 (s, 5H), 0.08 (s, 6H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 102.96, 87.19, 70.32, 65.60, 26.03, 24.67, 18.48, 0.17, -5.24, -5.28.

2.3.4 Захист вторинного спирту TBS-Cl

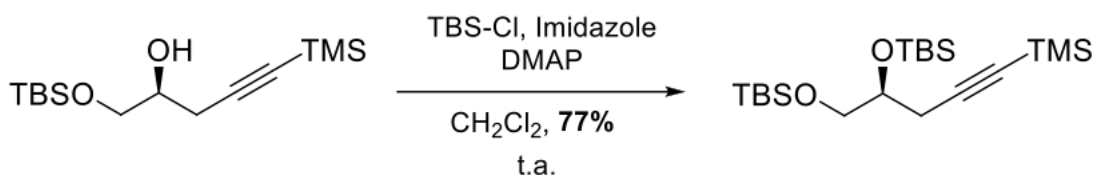


Рисунок 2.2 Захист вторинного спирту

До розчину продукту (5,7 г, 19,9 ммоль) у безводному CH_2Cl_2 (30 мл) додають TBS-Cl (3,6 г, 23,9 ммоль), імідазол (1,6 г, 23,9 ммоль) і DMAP (243 мг, 1,99 ммоль).) при 0°C . Реакційну суміш залишали перемішуватися при кімнатній температурі протягом ночі. Потім її гасили насиченим водним розчином NH_4Cl (30 мл) і екстрагували Et_2O (3×30 мл). Об'єднаний екстракт сушили MgSO_4 , фільтрували та випарювали, отримуючи сиру прозору олію, яку потім хроматографували на силікагелі, використовуючи суміш EtOAc /гексан (1:24) як елюент, щоб отримати продукт у вигляді в'язкої та безбарвної олії (7,5 г, 94%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.86 – 3.75 (m, 1H), 3.60 – 3.47 (m, 2H), 2.50 (dd, $J = 16.8, 5.3$ Hz, 1H), 2.30 (dd, $J = 16.8, 6.5$ Hz, 1H), 0.89 (s, 18H), 0.14 (s, 9H), 0.11 (s, 3H), S7 0.08 (s, 3H), 0.05 (s, 3H), 0.02 (s, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 104.86, 85.95, 72.25, 66.83, 26.13, 26.01, 18.53, 18.29, 0.23, -2.78, -4.29, -4.44, -5.18, -5.24

2.3.5 Селективні зняття захисту з первинного спирту

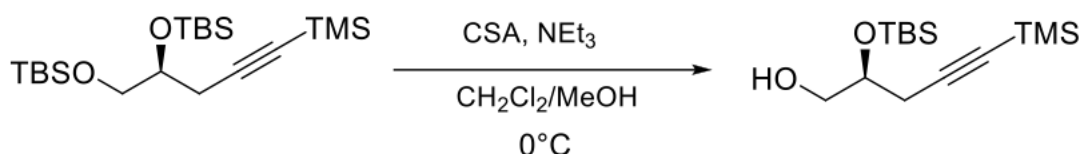


Рисунок 2.3 Зняття захисту

До розчину захищеного діолу (3,4 г, 8,5 ммоль) у суміші 1:1 сухого $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20 мл) додавали камфорну сульфонову кислоту (1,0 г, 4,2 ммоль) при 0°C . Реакційну суміш залишали перемішуватися протягом 0,5 год і гасили Et_3N (1,2 мл, 8,5 ммоль). Розчинник видаляли у вакуумі без обробки та очищали на силікагелі, використовуючи суміш EtOAc -гексан (7%) як елюент, отримуючи продукт у вигляді в'язкої та безбарвної олії (1,9 г, 77%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.13 – 3.84 (m, 1H), 3.67 (ddd, $J = 11.2, 5.8, 3.8$ Hz, 1H), 3.57 (ddd, $J = 11.2, 5.8, 3.8$ Hz, 1H), 2.51 – 2.33 (m, 3H), 1.88 (dd, $J = 7.1, 6.0$ Hz, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.14 (s, 9H), 0.13 (s, 4H), 0.11 (s, 4H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 103.47, 86.91, 71.64, 66.04, 25.94, 25.52, 18.20, 0.16, -4.34, -4.59.

2.3.6 Окислення первинного спирту: SWERN

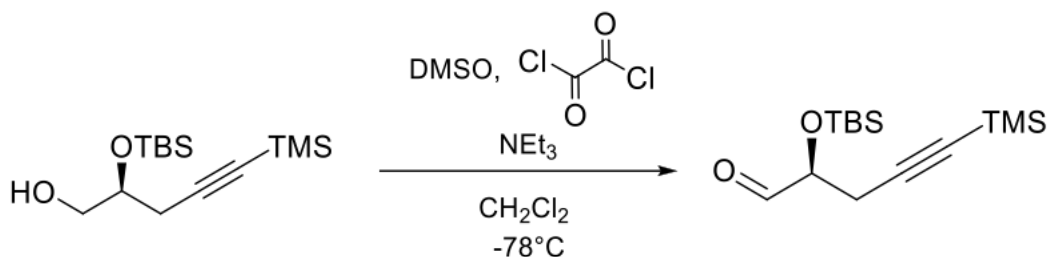


Рисунок 2.4 окислення первинного спирту

До розчину ДМСО (1,3 мл, 18,5 ммоль) у безводному CH_2Cl_2 (40 мл) при -78°C по краплях додавали оксалілхлорид (1,1 мл, 12,3 ммоль). Через 0,25 години додавали спирт (1,58 г, 6,2 ммоль) і перемішували протягом 1 години при -78°C . До реакційної суміші додавали Et_3N (4,3 мл, 30,8 ммоль) і перемішували ще 3 години при -78°C . Реакційній суміші давали нагрітися до кімнатної температури, гасили насиченим водним розчином NH_4Cl (45 мл) і екстрагували Et_2O (3×45 мл). Об'єднаний екстракт сушили Na_2SO_4 і випарювали, отримуючи сиру прозору олію, яку потім хроматографували на силікагелі, використовуючи суміш EtOAc -гексан (1:20) як елюент, щоб отримати альдегід 21 у вигляді в'язкої безбарвної олії (1,6 г), 92%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,63 (д, $J = 1,3$ Гц, 1H), 4,17 – 4,05 (м, 1H), 2,64 (дд, $J = 17,0, 5,0$ Гц, 1H), 2,48 (дд, $J = 17,0, 7,8$ Гц, 1H), 0,94 (с, 9H), 0,14 (с, 12H), 0,13 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 202,25, 101,99, 87,54, 76,25, 31,08, 25,87, 24,65, 18,39, 0,08, -4,57

2.3.7 Зчеплення Takai

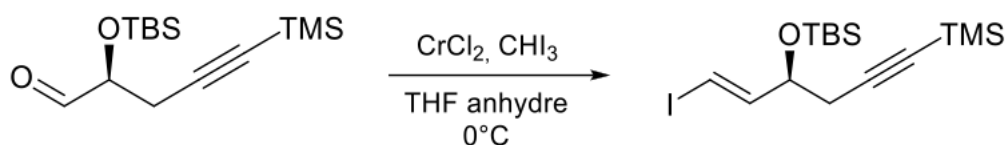


Рисунок 2.5 Зчеплення

До розчину CrCl_2 (2,0 г, 16,1 ммоль), розчиненого в ТГФ (загальний об'єм 65 мл), додали через канюлю суміш альдегіду (560 мг, 1,8 ммоль) і CHI_3 (3,2 г, 8,05 ммоль), розчинених у безводному ТГФ (10 мл).) під аргонем при 0°C . Реакційну суміш перемішували при 0°C протягом 3 годин і ще 1 годину при кімнатній температурі. Реакційну суміш гасили водою (80 мл), екстрагували Et_2O (3×80 мл),

промивали розсолон і сушили над MgSO_4 . Органічну фазу фільтрували та розчинник видаляли у вакуумі, отримуючи сиру олію, яку очищали на силікагелі, використовуючи спочатку чисті пентани, а потім EtOAc-гексан (1:24) як елюент, отримуючи суміш 9:1 сполуки 10 і його E, Z стереоізомер (див. вставку) у вигляді прозорої безбарвної олії (660 мг, 84%). Потрібний продукт вдалося виділити, але не без деякої втрати у виході.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.02 (dd, $J = 14.5, 10.7$ Hz, 1H), 6.32 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 6.15 (ddd, $J = 15.2, 10.8, 1.2$ Hz, 1H), 5.78 (dd, $J = 15.2, 5.7$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 2.49 – 2.29 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.14 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), 0.05 (s, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 144.72, 136.49, 129.69, 103.74, 86.78, 79.23, 71.48, 29.90, 25.97, 18.39, 0.20, -4.42, -4.60.

2.4 БЛОК C: Синтез ліпідного ланцюга C

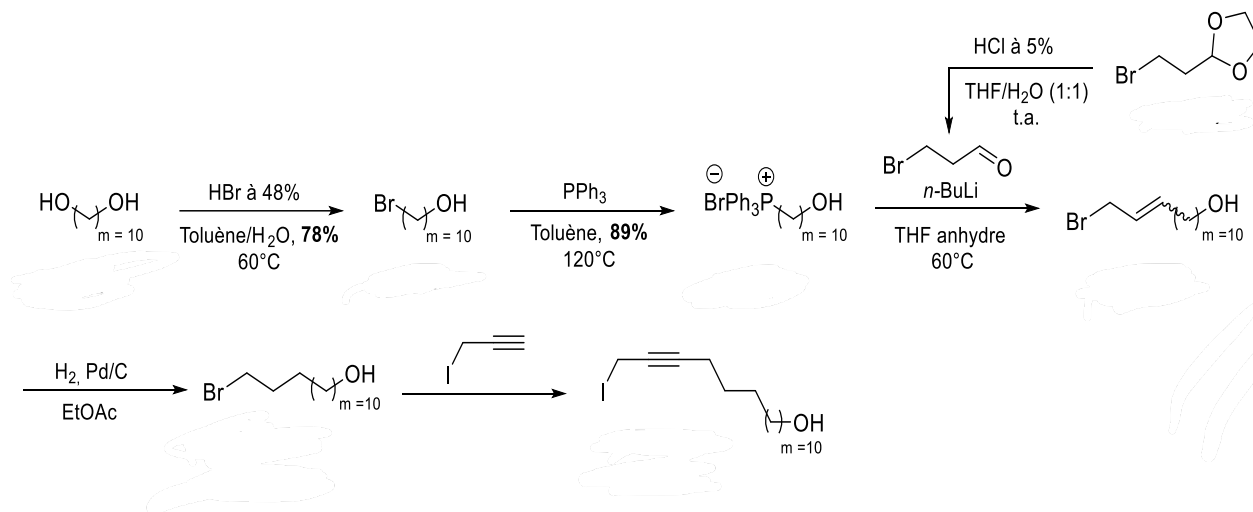


Рисунок 2.6 Синтез ліпідного ланцюга

2.4.1 Монобромовання діолу

До розчину 1,10-декандіолу (3) (34,8 г, 0,2 моль, 1 екв.) у толуолі (400 мл) по краплях при перемішуванні додають 48% HBr (22,6 мл, 0,2 моль, 1 екв.) і кип'ятять із зворотним холодильником при 180°C з використанням пастки Діна-Старка протягом 24 годин. Суміш охолоджували до кімнатної температури і промивали 6N NaOH (150 мл), 10% HCl (150 мл), H₂O (2×250 мл) і розсолем (200 мл). Органічний шар сушили над Na₂SO₄, концентрували та хроматографували на силікагелі, елюючи циклогексаном/етилацетатом (4:1), отримуючи 43,5 г (92%) 10-бром-1-деканолу у вигляді безбарвної рідини.

¹H NMR δ 3.65 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H-1), 3.43 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H-10), 1.87 (m, 2H, H-9), 1.57 (m, 2H, H-2), 1.43 (m, 2H, H-3), 1.26-1.41 (m, 10H, H-4-8). ¹³C NMR δ 63.0 (C1), 34.1 (C10), 32.8, 32.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.6, 28.2, 25.6.

2.4.2 Приєднання трифенілфосфіну

PPh₃ (1,0 екв.) у толуолі (0,35 M) і відповідний заміщений 10-бром-1-деканол (1,0 екв.) додавали до висушеної колби Шленка. Колбу оснастили зворотним холодильником і реакційну суміш нагрівали до 120°C протягом 48 годин. Ми спостерігали утворення масла при високій температурі. Суміш нагрівали до кімнатної температури, потім видаляли додатковий агент і колбу промивали циклогексаном (3 × 10 мл). Розчинник видаляли під вакуумом і продукт залишали на 1 год.

2.4.3 Зняття захисту бромоацетальдегід діетиловим ефіром

Умова А. До круглодонної колби, що містить ацеталь або кеталь (10 ммоль) у хлороформі (20 мл), повільно додають трифтороцтову кислоту (6 еквівалентів) при температурі навколишнього середовища. Отриманий розчин залишали перемішуватися протягом 20 годин, а потім суміш гасили водою (20 мл) і екстрагували EtOAc (3×30 мл). Органічний шар промивали сольовим розчином (2×40 мл) і сушили над Mg_2SO_4 . Розчинники видаляли при зниженому тиску з отриманням бажаних альдегідів (вихід як зазначено).

Умова Б. До круглодонної колби, що містить ацеталь або кеталь (10 ммоль) у 20 мл хлороформу, повільно додають трифтороцтову кислоту (20 еквівалентів) при кімнатній температурі. Отриманий розчин залишали перемішуватися протягом 5 годин, а потім суміш гасили водою (30 мл) і екстрагували EtOAc (3×40 мл). Органічний шар промивали сольовим розчином (2×40 мл) і сушили над Mg_2SO_4 . Розчинники видаляли при зниженому тиску з отриманням бажаних альдегідів (вихід як зазначено).

Умова С. До круглодонної колби, що містить ацеталь або кеталь (10 ммоль) у 20 мл хлороформу, повільно додають трифтороцтову кислоту (4 еквіваленти) при кімнатній температурі. Отриманий розчин нагрівали при 75°C протягом 2 годин, а потім суміш гасили водою (20 мл) і екстрагували EtOAc (3×30 мл). Органічний шар промивали сольовим розчином (2×30 мл) і сушили над Mg_2SO_4 . Розчинники видаляли при зниженому тиску з отриманням бажаних альдегідів (вихід як зазначено).

Реакцію проводили в обох умовах А і В окремо. Для умови В діетилацеталь 17 (1,97 г, 10,0 ммоль) у DCM (30 мл) обробляли TFA (22,4 г, 200 ммоль) при кімнатній температурі протягом 6 годин, щоб отримати відомий альдегід (1,23 г, 100%).

1 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.97 (b, 2 H), 8.82 (b, 1 H).

2.4.4 Селективне гідрування подвійного зв'язку

Заміщений кетон розчиняють в ЕА (3,0 М). Реакцію проводили в круглодонній колбі в атмосфері H_2 при кімнатній температурі. Використовували картридж з 2 мол.% Pd/C (10 мас.%). Для обробки була необхідна фільтрація на Celite® з ЕА, і розчинник видаляли під вакуумом. Очищення проводилося у флеш-комбі XS з градієнтом (Су/АЕ).

2.5 Обговорення результатів

Основною метою практичної частини роботи був синтез нової молекули, яка була попередньо виділена з асцидинії. Боласцидії є потенційно біологічно активними сполуками.

Хоча перевірка біологічної активності згаданих речовин – задача, яка виходить за межі даної роботи, тим не менш може бути предметом подальших досліджень.

Синтезу цільової речовини передувало отримання багатьох інших сполук і ретросинтетичний аналіз.

Під час зняття захисту зі спирту, було утворено три сполуки. Тому були проведені різні експерименти для знаходження найкращих умов для отримання цільової молекули. Було протестовано 4 різні типи умов, які можна побачити в таблиці 2.1.

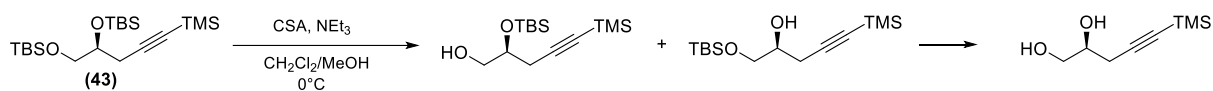


Рисунок 2.7 Зняття захисту зі спирту

Таблиця 2.1 Умови зняття захисту

Маса початкової речовини (мг)	CSA (екв)	Час реакції (хв)	Концентрація (моль/л)	Співвідношення мас (%)		
				Продукт А	Продукт В	Продукт С
100	0,2	15 хв	0,5	31	2	67
100	0,2	60 хв	0,5	4	0	96
100	0,2	60 хв	0,25	74	3	23
100	0,1	60 хв	0,25	85	3	12

Так як нас цікавить продукт А, ми обрали останні умови. Також спробували інші захисні групи приведені на рисунку 2.8.

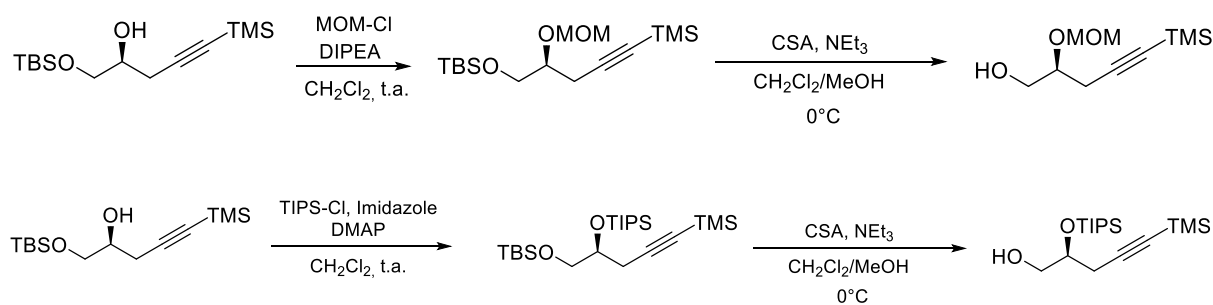


Рисунок 2.8 Реакції захисту спирту

Вихід реакції із захисною групою MOM – склав 87% від теоретичного. Із захисною групою TIPS – 68%. Отже зміна захисних груп допоможе в данному випадку збільшити вихід.

При синтезі синтону В зіштовхнулись з летючістю 3-бромпропаналю, тому в майбутньому запропонована інша стратегія синтезу (рис 2.9).

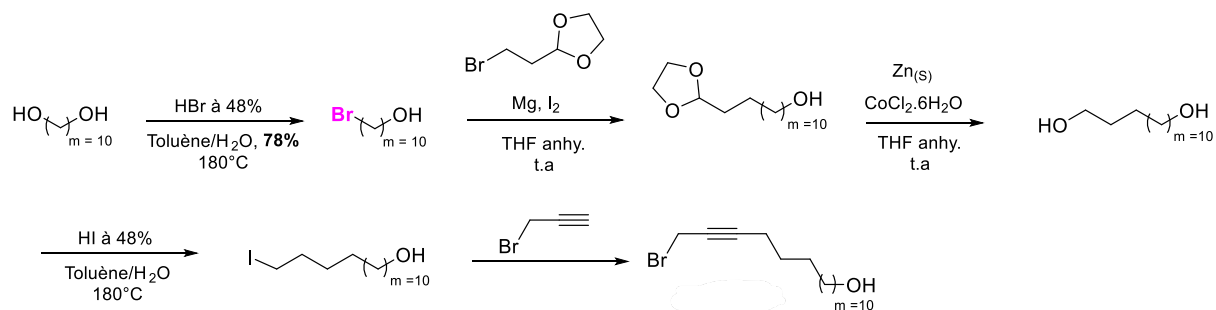


Рисунок 2.9 Синтез синтону В

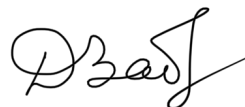
ВИСНОВКИ

Асцидії є джерелом різноманітних біоактивних молекул, які виявляють хороші протипухлинні, противірусні та антимікробні властивості. Серед асцидій було описано дуже мало метаболітів з видів роду *Polysyncrator*, хоча це другий найбільш представлений рід у *Didemnidae*. Було виділено та характеризовано чотирьох нових молекул, боласцидинів А, В, С і D. Вони складаються з однакових або різних полярних головок типу фосфохоліну або фосфостаноламіну та моногідроксильованого та поліненасиченого центрального алкільного ланцюга. Це болаамфіфілоподібні метаболіти, виділені вперше, для яких, наскільки нам відомо, немає природного чи синтетичного еквівалента.

Був проведений ретросинтетичний аналіз босцидин. На основі якого був розроблений і проведений успішний синтез частин молекули.

Наступним етапом буде з'єднання цих частин.

В подальшому потрібно провести більше аналізів на біологічну активність цих сполук, які згодом можна буде використовувати в різних галузях, наприклад, в медицині або косметології.



СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bianchi C.N., Morri C. Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research. *Mar. Poll. Bull.* 2000, 40, 367-376.
2. Проценко Ю.В., Горобець Л.В., Лопарев С.О., Основи систематики та різноманіття хордових. *Основи порівняльної анатомії та екології хордових тварин* [Електронне видання]; 2019, с 153-158.
3. База даних WoRMS: <https://www.marinespecies.org>
4. McDonald L. A., Capson T. L., Krishnamurthy G., Ding W.-D., Ellestad G. A., Bernan V. S., Maiese W. M., Lassota P., Discafani C., Kramer R. A., Ireland C. M. Namenamecin, a new enediyne antitumor antibiotic from the marine ascidian *Polysyncraton lithostrotum*. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10898–10899.
5. Ireland C. M., Fernandez A. Cyclic peptide antitumor agent from an ascidian. US Pat. US5830996A, 1998.
6. Feng Y., Davis R. A., Sykes M. L., Avery V. M., Carroll A. R., Camp D., Quinn R. J. Antitrypanosomal pyridoacridine alkaloids from the Australian ascidian *Polysyncraton echinatum*. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 2477–2479.
7. a) Kobayashi J., Cheng J.-F., Nakamura H., Ohizumi Y., Hirata Y., Sasaki T., Ohta T., Nozoe S. Ascidiemin, a novel pentacyclic aromatic alkaloid with potent antileukemic activity from the okinawan tunicate *Didemnum* sp. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29 (10), 1177–1180. b) Rudi M., Kashman Y. Six new alkaloids from the purple Red Sea tunicate *Eudistoma* sp. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5331–5337.
8. Dyshlovoy S. A., Fedorov S. N., Kalinovskiy A. I., Shubina L. K., Bokemeyer C., Stonik V. A., Honecker F. Mycalamide A shows cytotoxic properties and prevents EGF-induced neoplastic transformation through inhibition of nuclear factors. *Mar. Drugs* **2012**, 10, 1212–1224.
9. Perry N. B., Blunt J. W., Munro M. H. G., Pannell L. K. Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 4850–4851.
10. Sfecci E. Valorisation de biocides d'invertebres marins Mediterraneens. Ph.D. Dissertation, Institut de Chimie de Nice, Nice, 2018.
11. Fuhrhop J. -H., Wang T. Bolaamphiphiles. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2901–2937.

12. Blume A., Drescher S., Graf G., Köhler K., Meister A. Self-assembly of different single-chain bolaphospholipids and their miscibility with phospholipids or classical amphiphiles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, *208*, 264–278.
13. Dagorn F., Dumay J., Wielgosz-Collin G., Rabesaotra V., Viau M., Monniot C., Biard J.-F., Barnathan G. Phospholipid distribution and phospholipid fatty acids of the tropical tunicates Eudistoma sp. and Leptoclinides uniorbis. *Lipids* **2010**, *45*, 253–261.
14. Nakamura Y., Kato H., Nishikawa T., Iwasaki N., Suwa Y., Rotinsulu H., Losung F., Maarisit W., Mangindaan R. E. P., Morioka H., Yokosawa H., Tsukamoto S. Siladenoserinols A- L: New sulfonated serinol derivatives from a tunicate as inhibitors of p53-Hdm2 interaction. *Org. Lett.* **2013**, *15* (2), 322–325.
15. Doerig C., Billker O., Haystead T., Sharma P., Tobin A. B., Waters N. C. Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol.* **2008**, *24* (12), 570–577.
16. Sánchez-Martínez C., Gelbert L. M., Lallena M. J., de Dios A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 3420–3435.
17. Newton K. RIPK1 and RIPK3: critical regulators of inflammation and cell death. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25* (6), 347–353.
18. Ferrer I., Barrachina M., Puig B., Martinez de Lagran M., Marti E., Avila J., Dierssen M. Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 392–400.
19. Warfel N. A., Kraft A. S. PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *151*, 41–49.
20. Winkler J.W., Uddin J., Serhan Ch.N., Petasis N.A. Stereocontrolled Total Synthesis of the Potent Anti-inflammatory and Pro-resolving Lipid Mediator Resolvin D3 and Its Aspirin-Trigged 17*R*-Epimer. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 7, 1424–1427.