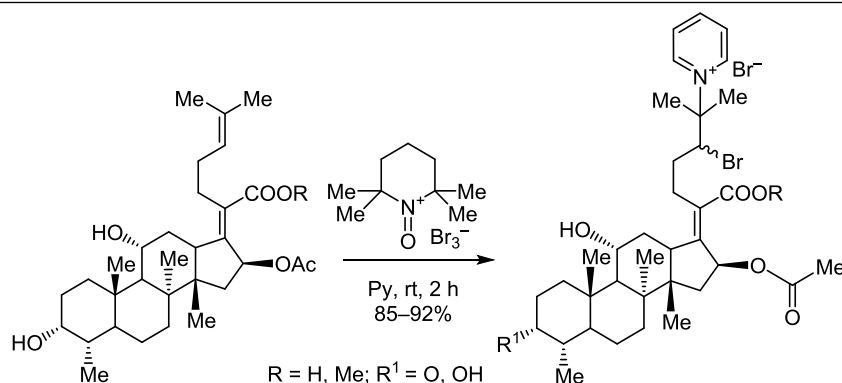


Однореакторный синтез четвертичных пиридиниевых солей и тетрагидропиридиновых производных фузидановых тритерпеноидов

Эльвира Р. Шакурова¹, Елена В. Салимова¹,
Екатерина С. Мещерякова¹, Людмила В. Парфёнова^{1*}

¹ Институт нефтехимии и катализа
Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
пр. Октября, 141, Уфа 450075, Россия; e-mail: luda_parfeno@ipc-ras.ru

Поступило 1.08.2019
Принято после доработки 29.10.2019



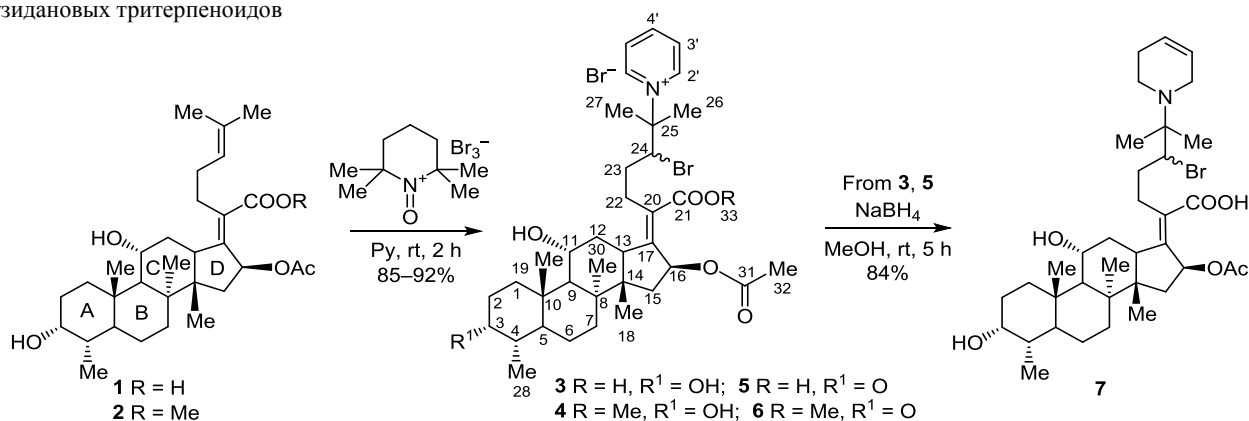
Разработан эффективный однореакторный метод получения четвертичных пиридиниевых солей и тетрагидропиридиновых производных тритерпеноидов фузиданового ряда, основанный на использовании Tempo⁺Br₃⁻ в качестве галогенирующего агента и пиридина как реагента и растворителя.

Ключевые слова: Tempo⁺Br₃⁻, фузидовая кислота, четвертичные пиридиниевые соли, противомикробная активность.

Создание новых антибактериальных препаратов как одна из мер преодоления устойчивости патогенных микроорганизмов к антибиотикам является важным направлением исследований медицинской химии. С появлением резистентных бактериальных штаммов наблюдается снижение эффективности антибиотиков в лечении различных инфекционных заболеваний: пневмонии, туберкулеза, гонореи и сальмонеллеза.^{1,2} В связи с этим возникает необходимость в разработке новых противомикробных препаратов, обладающих высокой антибактериальной эффективностью, низкой токсичностью и широким спектром действия.^{3–5} Привлекательным объектом для направленных химических модификаций является фузидовая кислота (ФК), которая представляет собой тетрациклический тритерпеноид, продуцируемый грибами *Fusidium coccineum*, являющийся единственным используемым в клинической практике представителем класса фузиданов – небольшого семейства природных антибиотиков. Клиническая значимость ФК определяется высокой

степенью проникновения сквозь клеточный барьер, эффективным распределением в различных тканях, низким уровнем токсичности и аллергических реакций, а также отсутствием перекрестной резистентности с другими используемыми антибиотиками. ФК проявляет бактериостатическое, а в очень высоких дозах и бактерицидное действие и используется при лечении тяжелых стафилококковых инфекций, в том числе вызванных и метициллинрезистентными штаммами.⁶ Антибактериальный эффект ФК основан на ингибировании синтеза бактериальных белков посредством связывания с фактором элонгации G (EF-G) – жизненно важным для бактериальной клетки белком, участвующим в процессе транслокации рибосомы.⁷ Помимо антибактериальной активности, ФК обладает слабым иммуномодулирующим действием, а в высоких концентрациях способна *in vitro* подавлять репликацию некоторых вирусов, включая ВИЧ.^{8–10}

Известно, что четвертичные аммониевые соли в большинстве случаев усиливают противомикробные

Схема 1. Синтез четвертичных пиридиниевых солей **3–6** и 1,2,3,6-тетрагидропиридинового производного **7** фузидановых тритерпеноидов

или противоопухолевые свойства ковалентно связанных с ними биологически активных молекул,^{11,12} они вызывают общую потерю структурной организации и нарушают целостность цитоплазматической мембраны в бактериях наряду с другими повреждающими эффектами.^{13–15} Четвертичные соли пиридина обладают высокой противомикробной активностью¹⁶ и являются привлекательным фармакофором для медицинской химии. Так, в исследованиях тритерпеноидов лупанового ряда пиридиниевые соли на основе бетулина показали противомикробную активность на уровне известных препаратов сравнения.¹⁷

В связи с этим представляет интерес разработка и получение новых амфифильных производных фузиданового ряда, противомикробное действие которых может быть одновременно направлено на различные биологические мишени. Предполагается, что положительно заряженный атом азота пиридина, анионный противоион и липофильный тритерпеновый каркас будут оказывать липидоподобное действие, а именно связываться с клеточной стенкой и активными сайтами ферментов¹⁸ и, как следствие, проявлять выраженную противомикробную активность. Введение пиридиниевого фрагмента в молекулу тритерпеноида позволит увеличить растворимость целевых соединений, тем самым повысив их биологическую доступность.

Нами разработан эффективный одnoreакторный метод получения новых четвертичных пиридиниевых солей тритерпеноидов фузиданового ряда **3–6** с высокими выходами (85–92%). Метод основан на взаимодействии исходных субстратов тритерпеноидов **1** или **2** с реагентом $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$ при использовании пиридина в качестве реагента и реакционной среды. Проведена функционализация ФК **1**¹⁹ и метилового эфира ФК **2**¹⁹ путем их ковалентного связывания с пиридином в положении C-25 молекулы в присутствии катиона $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$ (схема 1, табл. 1). Образование соответствующих четвертичных солей **3–6** происходит в результате бромирования двойной связи в положении C-24 на начальной стадии реакции.

Оптимизация условий реакции показала, что использование различного количества $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$ в пиридине приводит к образованию разных продуктов реакции.

Таблица 1. Оптимизация условий реакций синтеза соединений **3–6***

Тритерпеноид	$\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$, экв.	Продукт	Выход, %
1	0.25	3	85
2	0.25	4	87
1	1	3 + 5 (1:1)	86
2	1	4 + 6 (1:1)	87
1	2	5	75
2	2	6	76
1	2.5	5	89
2	2.5	6	92

* Условия реакции: 1 экв. тритерпеноида, 225 экв. Ру, 2 ч при комнатной температуре.

Так, в присутствии 0.25 экв. $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$ образуются 3,11-дигидроксипроизводные **3** или **4**, в случае использования 1 экв. $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$ наблюдалось образование смеси 3,11-дигидрокси- и 11-гидрокси-3-кетопроизводных в соотношении 1:1 (соединения **3** и **5** или **4** и **6**), в случае использования 2.5 экв. $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$ образуются только 11-гидрокси-3-кетопроизводные **5** или **6** (табл. 1). Следует отметить, что, благодаря особенностям структуры исходной природной молекулы, в ходе реакции реагент $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$ воздействовал на определенные функциональные группы, бромлируя одну из двойных связей боковой цепи в положении C-24 и избирательно окисляя гидроксильную группу в положении C-3 до кетона (при использовании 2–2.5 экв. $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$). Электрофильное присоединение брома к двойной связи происходит с образованием катионного интермедиата – мостикового иона бромония, переходящего затем в открытый β-бромкарбокатион, который взаимодействует с пиридином с образованием соответствующих продуктов **3–6**.

С целью изучения возможности получения тетрагидропиридиновых производных ФК пиридиниевые соли **3, 5** подвергались восстановлению в присутствии NaBH_4 .²⁰ Синтез 1,2,3,6-тетрагидропиридинового производного **7** проходил в сухом MeOH в течение 5 ч при комнатной температуре с выходом 84%. В случае соединения **3** эффективным было использование 2-кратного избытка NaBH_4 , в случае производного **5** –

3-кратного избытка восстанавливающего агента. При этом реакция сопровождалась восстановлением не только пиридинового цикла, но и кетогруппы в положении С-3.

Соединения **3–6** представляют собой смеси эпимеров, образование которых происходит за счет формирования в ходе реакции стереоцентра при С-24 с соотношением диастереомеров 24*R*:24*S* = (2–3):1.

Структура соединения **4** (24*R*-эпимера) подтверждена данными рентгеноструктурного анализа (рис. 1а). Соединение **4** представляет собой конденсированную тетрациклическую систему, состоящую из циклов А, В, С и D. Циклы А и С принимают конформацию "кресло", тогда как цикл В имеет конформацию "ванна". Следует отметить, что тетрациклический каркас с последовательностью конформаций циклов "кресло–ванна–кресло" наблюдается и для других соединений с тетраметилтетрациклопептадекан-5,17-диоловым каркасом.^{21–23}

Сочленение циклов А и В относится к *транс*-типу, где атомы С(19) и Н(5) *анти*-ориентированы, а торсионный угол С(19)–С(10)–С(5)–Н(5) составляет $-179.7(8)^\circ$. Цикл D принимает конформацию "конверт", о чем свидетельствует отклонение атома С(14) от средней плоскости на 0.613(2) Å. Стереогенные центры при атомах С(4), С(5), С(8), С(9), С(13) и С(14) имеют *S*-конфигурацию, а при атомах С(3), С(10), С(11) – *R*-конфигурацию, что согласуется с данными эксперимента NOESY. В тритерпеноидном каркасе молекулы **4** имеется 10 асимметричных углеродных атомов: 3 α -СНОН, 4 α -СН₃, 5 α -СН, 8 α -СН₃, 9 β -СН, 10 β -СН₃, 11 α -СНОН, 13 α -СН, 14 β -СН₃ и 16 β -ОСОСН₃. Длина связи С(25)–Br(1) составляет 1.947(11) Å, что короче в сравнении с литературными данными, где связь С–Br имеет длину 1.966(5) Å.²⁴ Также наблюдается образование внутримолекулярных водородных связей, длина которых меньше суммы вандерваальсовых радиусов атомов кислорода и водорода (2.6 Å). Так, длины водородных связей С(18)–Н(18)A···O(3) и С(1)–Н(1)B···O(2) составляют 2.534(7) и 2.506(7) Å соответственно (рис. 1б).

Структуры синтезированных соединений подтверждены с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF/TOF, одно- и двумерной (COSY, NOESY, ¹H–¹³C HSQC, ¹H–¹³C HMBC) спектроскопии ЯМР. Так, в спектрах ЯМР ¹³C пиридиниевых производных **3–6** сигнал атома С-24 находится в области 63.4–65.6 м. д. и коррелирует с сигналом протона 24-СН при 4.64–4.88 м. д. в спектрах ¹H–¹³C HSQC. Присутствие пиридиниевого фрагмента в молекуле тритерпена приводит к сдвигу сигнала С-25 в слабое поле до 74.8–76.1 м. д. Кроме того, в спектрах ¹H–¹³C HMBC содержатся кросс-пики протонов пиридинового цикла в *орто*-положении с *sp*³-гибридизованным четвертичным атомом С-25, а также кросс-пики этих же протонов с протонами метильных групп 26,27-СН₃ в спектрах NOESY. В восстановленном продукте **7** атом С-24 становится более дезэкранированным, в результате чего его сигнал сдвигается в слабое поле до 82.2 м. д., тогда как атом С-25 резонирует в более сильном поле при 58.1 м. д.

Результаты исследований антибактериальной и противогрибковой активности четвертичных пириди-

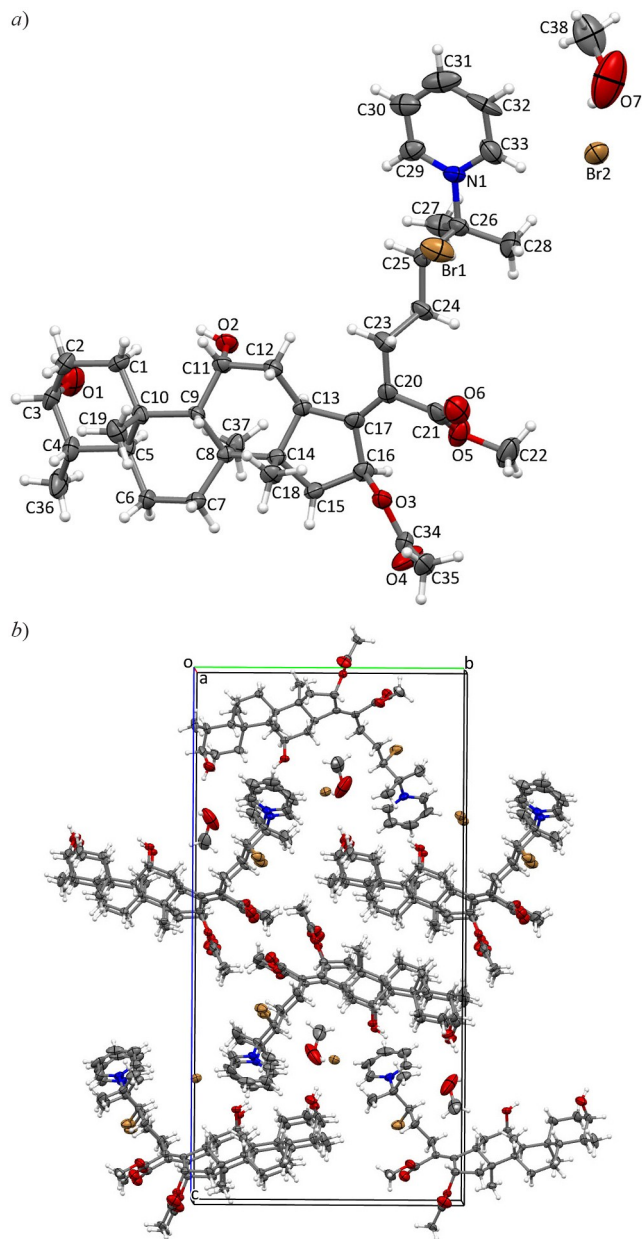


Рисунок 1. Молекулярная структура соединения **4** в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний с 30% вероятностью. б) Фрагмент кристаллической упаковки соединения **4** вдоль оси *a*.

ниевых производных **5**, **6** и 1,2,3,6-тетрагидропиридинового продукта **7** представлены в табл. 2. Образцы с долей ингибирования, равной или превышающей 80%, были классифицированы как активные, а образцы с показателями ингибирования от 40 до 80% – как частично активные соединения. Отрицательные значения ингибирования указывают, что скорость роста микроорганизмов в лунке с исследуемым веществом выше по сравнению с отрицательным контролем (лунка, в которой находится только среда). Сравнивая тестируемые продукты **5–7**, можно сделать вывод, что соединения **5**, **6** показали противомикробную активность с незначительными показателями ингибирования (менее 40%) в отношении всех тестируемых бактериальных

Таблица 2. Доля ингибирования роста микроорганизмов соединениями 5–7 в концентрации 32 мкг/мл, %

Соединение	Бактерии					Грибы	
	Грамположительные		Грамотрицательные			<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
5	–6.74	23.55	–3.41	1.16	6.15	8.38	8.35
6	11.08	21.18	7.57	28.67	7.68	6.16	13.78
7	4.57	21.25	–2.26	0.94	12.75	49.75	–40.50

штаммов и грибов, а соединение 7 проявило себя как частично активное при ингибировании роста грибов рода *Candida albicans*.

Таким образом, мы продемонстрировали первый пример однократного получения ранее неизвестных четвертичных пиридиниевых солей фузидановых тритерпеноидов с использованием катиона $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$. Применение катиона $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$ обеспечивает бромирование субстрата *in situ*. Это позволяет избежать дополнительной стадии галогенирования, что сокращает стадийность процесса, а также увеличивает выходы продуктов реакции. Полученные данные биологических испытаний свидетельствуют, что синтезированные пиридиниевые соли и продукты их восстановления проявляют лишь умеренную противомикробную активность и что требуется дальнейшая структурная оптимизация молекулы.

Экспериментальная часть

ИК спектры записаны на спектрометре Bruker Vertex 70V в суспензии в вазелиновом масле. Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C (500, 125 МГц соответственно) и COSY, NOESY, ^1H – ^{13}C HSQC, ^1H – ^{13}C HMBC зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance II 500 HD Ascend в CD_3OD (соединения 3–6), CDCl_3 (соединение 7), внутренний стандарт ТМС. Масс-спектры MALDI TOF/TOF положительных ионов (матрица – синапиновая кислота) записаны на масс-спектрометре Bruker AutoflexTM III Smartbeam. Подготовка проб для регистрации масс-спектров проведена по методике "сухая капля": в отдельной пробирке смешивают растворы матричного и анализируемого веществ (50:1–100:1), после этого каплю раствора наносят на мишень и высушивают потоком теплого воздуха. Пробу с мишени переводят в газовую фазу с помощью лазерных импульсов (200 импульсов с частотой 100 Гц). В качестве источника лазерного излучения применяют твердотельный УФ лазер с длиной волны излучения 355 нм. Температуры плавления определены на приборе РНМК 80/2617. Контроль за ходом реакций осуществлен методом ТСХ на пластинках Sorbfil (Сорбполимер, Краснодар, Россия), проявление анисовым альдегидом в EtOH . Для колоночной хроматографии использован силикагель L марки КСКГ, размер частиц 50–160 мкм.

Использованные в работе реагенты приобретены в компаниях Sigma-Aldrich и Acros Organics. $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$ синтезирован согласно известной методике.²⁵

Синтез четвертичных пиридиниевых производных 3–6 (общая методика). К раствору 0.5 ммоль

(1 экв.) тритерпеноида 1 или 2 в 2 мл пиридина добавляют 0.25, 1 или 2.5 экв. $\text{Tempo}^+\text{Br}_3^-$. Затем реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре (контроль методом ТСХ). По окончании реакции смесь упаривают при пониженном давлении, многократно разбавляя EtOAc , сушат при пониженном давлении. Полученный остаток хроматографируют на силикагеле, элюент гексан– EtOAc , градиент от 30:1 до 1:1; CHCl_3 ; MeOH . Соединения 3–6 выделяют в виде бежевых кристаллов. Соединения 3–6 получают в виде смеси диастереомеров, сигналы минорного 24*S*-диастереомера в спектрах ЯМР обозначены звездочкой (*).

Бромид 1-{6-[(1*Z*,2*S*,3*aS*,3*bS*,6*S*,7*R*,9*aS*,10*R*)-2-(ацетокси)-7,10-дигидрокси-3*a*,3*b*,6,9*a*-тетраметилгексадекагидро-1*H*-циклопента[*a*]фенантрен-1-илиден]-3-бром-6-карбокси-2-метилгексан-2-ил}-1-пиридиния (3). Смесь диастереомеров 24*R*/24*S* = 75:25. Выход 322 мг (85%), т. пл. 188–190 °C, $[\alpha]_D^{19} +12.1^\circ$ (*c* 1.77, CHCl_3). ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3440, 2941, 1593, 1454, 1336, 1292. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д.: 0.91 (3H, д, $J = 6.5$, 28- CH_3); 0.97 (3H, с, 18- CH_3); 1.01 (3H, с, 19- CH_3); 1.05–1.17 (2H, м, 6,7- CH_2); 1.23 (1H, д, $^2J = 14.0$, 15- CH_2); 1.38 (3H, с, 30- CH_3); 1.42–1.65 (4H, м, 1,6- CH_2 , 4,9- CH); 1.66–1.90 (5H, м, 2,7,12,23- CH_2); 2.00 (3H, с, 27- CH_3); 2.01 (3H, с, 26- CH_3); 2.04 (3H, с, 32- CH_3); 2.09–2.20 (2H, м, 5- CH , 15- CH_2); 2.21–2.31 (2H, м, 1,23- CH_2); 2.23–2.33* (2H, м, 12- CH_2); 2.50 (1H, д, $^2J = 12.9$, 12- CH_2); 2.65–2.77 (1H, м, 22- CH_2); 2.81–2.94 (1H, м, 22- CH_2); 3.02 (1H, д, $^3J = 11.9$, 13- CH); 3.63–3.70 (1H, м, 3- CH); 4.26–4.31 (1H, м, 11- CH); 4.31–4.36* (1H, м, 11- CH); 4.64 (1H, д, $^3J = 11.0$, 24- CH); 4.66–4.75* (1H, м, 24- CH); 5.85 (1H, д, $^3J = 8.5$, 16- CH); 8.17 (2H, т, $^3J = 6.9$, H-3',5'); 8.64 (1H, т, $J = 7.5$, H-4'); 9.33 (2H, д, $^3J = 6.5$, H-2',6'). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 15.1 (C-28); 16.4 (C-18); 19.6 (C-32); 20.8 (C-27); 21.0 (C-6); 22.3 (C-19,30); 25.4 (C-26); 26.8 (C-22); 29.5 (C-23); 29.6 (C-1,2); 31.5 (C-7); 35.4 (C-5); 36.3 (C-12); 36.4 (C-10); 36.8 (C-4); 38.6 (C-15); 39.3 (C-8); 42.6 (C-13); 48.8 (C-14); 49.2 (C-9); 63.1* (C-24); 63.4 (C-24); 67.2* (C-11); 67.3 (C-11); 71.0 (C-3); 74.3 (C-16); 74.6* (C-25); 74.8 (C-25); 127.9 (C-3',5'); 133.8 (C-20); 141.3 (C-17); 142.4 (C-2',6'); 145.9 (C-4'); 175.9 (C-21); 171.8 (C-31). Найдено, *m/z*: 674.2862 $[\text{M}-\text{Br}]^+$. $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{BrNO}_6$. Вычислено, *m/z*: 674.3050.

Бромид 1-{6-[(1*Z*,2*S*,3*aS*,3*bS*,6*S*,7*R*,9*aS*,10*R*)-2-(ацетокси)-7,10-дигидрокси-3*a*,3*b*,6,9*a*-тетраметилгексадекагидро-1*H*-циклопента[*a*]фенантрен-1-илиден]-3-бром-7-метокси-2-метил-7-оксогептан-2-ил}-1-пиридиния (4). Смесь диастереомеров 24*R*/24*S* = 62:38. Выход 334 мг (87%), т. пл. 200–202 °C, $[\alpha]_D^{21} +25.2^\circ$

(с 0.44, MeOH). ИК спектр, ν , cm^{-1} : 2923, 1716, 1462, 1377.

24R-Диастереомер. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.91 (3H, д, $^3J = 6.7$, 28- CH_3); 0.94 (3H, с, 18- CH_3); 1.02 (3H, с, 19- CH_3); 1.07–1.20 (2H, м, 6,7- CH_2); 1.26 (1H, д, $^2J = 14.0$, 15- CH_2); 1.40 (3H, с, 30- CH_3); 1.44–1.93 (9H, м, 1,2,6,7,12,23- CH_2 , 4,9- CH); 1.97 (3H, с, 32- CH_3); 2.04 (3H, с, 26- CH_3); 2.09–2.34 (7H, м, 27- CH_3 , 1,15,23- CH_2 , 5- CH); 2.46–2.52 (1H, м, 12- CH_2); 2.65–2.74 (1H, м, 22- CH_2); 2.78–2.89 (1H, м, 22- CH_2); 3.13 (1H, д, $^3J = 11.9$, 13- CH); 3.65–3.72 (1H, м, 3- CH); 3.68 (3H, с, 33- OCH_3); 4.39 (1H, м, 11- CH); 4.80–4.84 (1H, м, 24- CH); 5.85 (1H, д, $^3J = 8.5$, 16- CH); 8.24 (2H, т, $^3J = 7.1$, Н-3',5'); 8.72 (1H, т, $^3J = 7.6$, Н-4'); 9.43 (2H, д, $^3J = 6.0$, Н-2',6'). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 15.3 (C-28); 16.9 (C-18); 19.8 (C-32); 21.0 (C-6); 21.3 (C-26); 22.5 (C-19); 22.7 (C-30); 25.4 (C-27); 27.6 (C-22); 29.7 (C-1); 29.8 (C-2); 31.6 (C-7); 33.9 (C-23); 35.5 (C-5); 36.1 (C-12); 36.5 (C-10); 36.8 (C-4); 38.7 (C-15); 39.3 (C-8); 44.1 (C-13); 48.7 (C-14); 49.2 (C-9); 51.0 (C-33); 63.6 (C-24); 66.9 (C-11); 70.9 (C-3); 74.3 (C-16); 74.8 (C-25); 128.0 (C-20); 128.1 (C-3',5'); 142.5 (C-2',6'); 146.2 (C-4'); 150.9 (C-17); 170.2 (C-21); 170.6 (C-31).

24S-Диастереомер. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.93 (3H, с, 18- CH_3); 1.28 (1H, д, $^2J = 14.1$, 15- CH_2); 1.38 (3H, с, 30- CH_3); 1.57 (1H, м, 9- CH); 1.72–1.83 (1H, м, 12- CH_2); 1.91–1.98 (1H, м, 23- CH_2); 1.97 (3H, с, 32- CH_3); 2.06 (3H, с, 26- CH_3); 2.08–2.14 (1H, м, 23- CH_2); 2.12 (3H, с, 27- CH_3); 2.40–2.46 (1H, м, 12- CH_2); 2.58–2.65 (1H, м, 22- CH_2); 3.07 (1H, д, $^3J = 11.8$, 13- CH); 3.68 (3H, с, 33- CH_3); 4.37 (1H, м, 11- CH); 5.87 (1H, д, $^3J = 7.9$, 16- CH); 8.25 (2H, т, $^3J = 7.0$, Н-3',5'). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 17.2 (C-18); 20.9 (C-6); 21.7 (C-26); 22.5 (C-19); 22.8 (C-30); 25.0 (C-27); 27.8 (C-22); 31.7 (C-7); 34.3 (C-23); 35.6 (C-5); 36.0 (C-12); 36.5 (C-10); 36.7 (C-4); 38.7 (C-15); 39.4 (C-8); 48.8 (C-14); 51.0 (C-33); 63.6 (C-24); 66.9 (C-11); 74.4 (C-16); 74.9 (C-25); 128.1 (C-3',5'); 146.3 (C-4'); 151.6 (C-17); 170.3 (C-21). Найдено, m/z : 690.3311 $[\text{M}-\text{Br}]^+$. $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{NO}_6$. Вычислено, m/z : 690.3369.

Бромид 1-{6-[(1Z,2S,3aS,3bS,6S,9aS,10R)-2-(ацетокси)-10-гидрокси-3а,3b,6,9а-тетраметил-7-оксогексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-1-илиден]-3-бром-6-карбокситетрагидропиридин-1-ил}гептановая кислота (5). Смесь диастереомеров 24R/24S = 66:34. Выход 337 мг (89%), т. пл. 178–179 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +0.4^\circ$ (с 0.51, MeOH). ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3437, 2923, 2854, 1637, 1458, 1378. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.98 (3H, д, $^3J = 6.7$, 28- CH_3); 1.00 (3H, с, 18- CH_3); 1.12–1.20 (1H, м, 7- CH_2); 1.21 (3H, с, 19- CH_3); 1.24–1.34 (1H, м, 15- CH_2); 1.28–1.34 (4H, м, 30- CH_3 , 6- CH_2); 1.63–1.73 (2H, м, 6- CH_2 , 9- CH); 1.80–1.91 (4H, м, 7,12,23- CH_2 , 5- CH); 2.01–2.14 (1H, м, 1- CH_2); 2.02–2.15 (10H, м, 15- CH_2 , 26,27,32- CH_3); 2.25–2.48 (4H, м, 1,2,23- CH_2 , 4- CH); 2.49–2.61 (2H, м, 2,12- CH_2); 2.73–2.86 (2H, м, 22- CH_2); 2.96* (1H, д, $^3J = 11.7$, 13- CH); 3.05 (1H, д, $^3J = 11.7$, 13- CH); 4.35–4.41 (1H, м, 11- CH); 4.78–4.88 (1H, м, 24- CH); 5.93 (1H, д, $^3J = 8.0$, 16- CH); 8.21 (2H, т, $^3J = 6.8$, Н-3',5'); 8.68 (1H, т, $^3J = 7.7$, Н-4'); 9.43 (2H, д, $^3J = 6.0$, Н-2',6'). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 12.8 (C-28); 18.5 (C-18); 21.4 (C-32); 22.2 (C-26); 23.2

(C-19); 23.3 (C-6); 25.1 (C-30); 27.3 (C-27); 29.3 (C-22); 29.5* (уш. с, C-22); 34.6 (C-7); 34.7 (C-23); 36.9 (C-1); 37.8 (C-12); 38.1 (C-10); 39.2 (C-2); 40.3 (C-8); 40.4* (C-8); 40.7 (C-15); 40.8 (C-15); 44.1* (C-13); 44.3 (C-13); 47.0 (C-4); 47.2 (C-5); 49.8 (C-9); 50.3 (C-14); 50.4* (C-14); 65.2* (C-24); 65.6 (C-24); 68.3 (C-11); 75.9 (C-25); 76.1* (C-25); 76.3 (C-16); 76.4* (C-16); 129.4 (C-3',5'); 129.5* (C-3',5'); 136.5 (C-20); 143.1 (C-17); 144.0 (C-2',6'); 147.6 (C-4'); 173.4 (C-31); 179.6 (C-21); 217.2 (C-3). Найдено, m/z : 752.1067 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{Br}_2\text{NO}_6$. Вычислено, m/z : 752.2161.

Бромид 1-{6-[(1Z,2S,3aS,3bS,6S,9aS,10R)-2-(ацетокси)-10-гидрокси-3а,3b,6,9а-тетраметил-7-оксогексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-1-илиден]-3-бром-7-метокси-2-метил-7-оксогептан-2-ил}-1-пиридиния (6). Смесь диастереомеров 24R/24S = 73:27. Выход 352 мг (92%), т. пл. 196–198 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +17.3^\circ$ (с 0.33, MeOH). ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3427, 2924, 2854, 1630, 1462, 1377. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.97 (3H, с, 18- CH_3); 1.00 (3H, д, $^3J = 6.5$, 28- CH_3); 1.13–1.42 (9H, м, 6,7,15- CH_2 , 19,30- CH_3); 1.61–1.80 (3H, м, 9- CH , 6,23- CH_2); 1.81–1.99 (3H, м, 7,12- CH_2 , 5- CH); 2.01 (3H, с, 32- CH_3); 2.03 (3H, с, 26- CH_3); 2.06–2.29 (6H, м, 27- CH_3 , 1,15,23- CH_2); 2.31–2.40 (1H, м, 4- CH); 2.36–2.61 (4H, м, 1,2,12- CH_2); 2.68–2.90 (2H, м, 22- CH_2); 3.14 (1H, д, $^3J = 11.1$, 13- CH); 3.70 (3H, с, 33- CH_3); 4.42–4.50 (1H, м, 11- CH); 4.86 (1H, д, $^3J = 11.1$, 24- CH); 5.89 (1H, д, $^3J = 8.05$, 16- CH); 8.24 (2H, т, $^3J = 6.8$, Н-3',5'); 8.67 (1H, т, $^3J = 7.5$, Н-4'); 9.52 (2H, д, $^3J = 6.1$, Н-2',6'). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 12.4 (C-28); 18.3 (C-18); 21.1 (C-32); 22.2 (C-6,26); 23.0 (C-19); 24.7 (C-30); 27.0 (C-27); 28.3 (C-22); 33.7 (C-7); 34.0 (C-23); 35.9 (C-1); 36.8 (C-12); 37.2 (C-10); 38.7 (C-2); 39.47 (C-15); 39.9 (C-8); 44.6* (C-13); 44.7 (C-13); 46.1 (C-5); 46.3 (C-4); 48.7 (C-9); 52.0* (C-33); 52.1 (C-33); 63.6* (C-24); 64.1 (C-24); 67.1 (C-11); 67.3* (C-11); 75.1 (C-16); 75.6* (C-25); 75.7 (C-25); 128.8 (C-3',5'); 143.2 (C-2',6',20); 146.7 (C-4'); 151.7 (C-17); 170.8 (C-21); 171.5 (C-31); 216.9 (C-3). Найдено, m/z : 606.3591 $[\text{M}-2\text{Br}-2\text{H}]^+$. $\text{C}_{37}\text{H}_{52}\text{NO}_6$. Вычислено, m/z : 606.3789.

2-[(1Z,2S,3aS,3bS,6S,7R,9aS,10R)-2-(Ацетокси)-7,10-дигидрокси-3а,3b,6,9а-тетраметилгексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-1-илиден]-5-бром-6-метил-6-(1,2,3,6-тетрагидропиридин-1-ил)гептановая кислота (7). К раствору 100 мг (0.13 ммоль) соединения 3 или 5 в 6 мл MeOH порционно добавляют 10 мг (0.26 ммоль) или 15 мг (0.39 ммоль) NaBH_4 соответственно. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 5 ч. Затем раствор упаривают при пониженном давлении, добавляют 5 мл H_2O и экстрагируют CH_2Cl_2 (3 \times 10 мл). Комбинированные органические фракции сушат над Na_2SO_4 и упаривают при пониженном давлении, остаток хроматографируют на силикагеле, элюент CHCl_3 , CHCl_3 –MeOH, 40:1. Смесь диастереомеров 24R/24S = 70:30. Выход 75 мг (84%), т. пл. 187–188 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -19.7^\circ$ (с 0.36, CHCl_3). ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3394, 2929, 2871, 1724, 1637, 1438, 1374. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.91–0.97 (7H, м, 18,28- CH_3 , 6- CH_2); 1.02 (3H, с, 19- CH_3); 1.09–1.19 (7H, м, 26,27- CH_3 ,

7-CH₂); 1.34 (3H, с, 30-CH₃); 1.35–1.48 (2H, м, 15-CH₂, 4-CH); 1.49–2.27 (17H, м, 32-CH₃, 1,2,5',6,7,12,15,23-CH₂, 5,9-CH); 2.33–2.42 (1H, м, 12-CH₂); 2.52–2.61 (1H, м, 22-CH₂); 2.62–2.74 (2H, м, 6'-CH₂); 2.75–2.88 (1H, м, 22-CH₂); 3.08–3.15 (1H, м, 13-CH); 3.10–3.26 (3H, м, 3-CH, 2'-CH₂); 4.20 (1H, д, ³J = 10.9, 24-CH); 4.34–4.40 (1H, м, 11-CH); 5.64–5.71 (1H, м, 3'-CH); 5.72–5.79 (1H, м, 4'-CH); 6.04 (1H, д, ³J = 8.5, 16-CH). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 15.4 (C-28); 18.2 (C-27); 18.3 (C-18); 20.4 (C-26); 20.6 (C-32); 20.9 (C-6); 23.6 (C-23); 23.6 (C-1); 23.7 (C-19,22); 24.3 (C-30); 27.4* (C-5'); 27.5 (C-5'); 32.8 (C-2,7); 36.8 (C-10); 38.9 (C-15); 39.4 (C-4); 39.5 (C-8); 42.9 (C-5); 43.4 (C-6'); 45.1 (C-13); 46.1 (C-2'); 48.6 (C-14); 49.0 (C-9); 58.1 (C-25); 68.0* (C-11); 68.2 (C-11); 73.7 (C-16); 73.8* (C-16); 76.5 (C-3); 82.1 (C-24); 82.2* (C-24); 123.5 (C-20); 125.2 (C-4'); 126.3 (C-3'); 154.3 (C-17); 168.2 (C-21); 170.4 (C-31). Найдено, m/z: 594.3507 [M–C₅H₉N–2H]⁺. C₃₁H₄₇BrO₆. Вычислено, m/z: 594.2556.

Рентгеноструктурное исследование соединения 4 проведено при 20–24 °С на автоматическом четырехкружном дифрактометре Agilent Xcalibur (Eos, Gemini) (графитовый монохроматор, MoKα-излучение, λ 0.71073 Å, ω-сканирование, 2θ_{макс} 62°). Монокристаллы соединения 4 получены из раствора MeOH при медленном испарении. Независимая часть элементарной ячейки содержит одну молекулу соединения 4, MeOH и анион Br⁻. Кристаллы соединения 4 (C₃₈H₆₀Br₂NO₇) орторомбические, пространственная группа P2₁2₁2₁; a 7.0862(5), b 16.8037(14), c 33.1106(18) Å; V 3942.6(5) Å³; Z 4; d_{выч} 1.352 г/см⁻³; μ 2.102 см⁻¹. Структура расшифрована прямым методом и уточнена с использованием комплекса программ SHELX. Окончательные значения факторов расходимости R₁ 0.0654, wR₂ 0.1476 (3461 по отражениям с I > 2σ(I)) и R₁ 0.1698, wR₂ 0.2220 для всех 8737 отражений. Полная кристаллографические данные депонированы в Кембриджском банке структурных данных (депонент CCDC 1940009).

Исследования биологической активности. Противомикробный скрининг проведен в Университете Квинсленда (Австралия) в рамках программы CO-ADD (The Community for Antimicrobial Drug Discovery, <https://www.co-add.org>), финансируемой Wellcome Trust (Великобритания) на пяти бактериальных штаммах: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Противогрибковую активность определена на двух грибковых штаммах: *Candida albicans* ATCC 90028 и *Stryptosoccus neoformans* ATCC 208821. Для испытаний использованы растворы соединений 5–7 в ДМСО. Растворитель ДМСО не оказывает негативного воздействия на развитие исследуемых бактерий и грибов. Доля ингибирования роста рассчитана для каждой лунки, используя отрицательный контроль (только среда) и положительный контроль (бактерии без ингибиторов). Все тесты продублированы.

Оценка антибактериальной активности соединений 5–7. Оценку антибактериальной активности проводят методом серийных разведений. Все бактерии

культивируют в модифицированном агаре Мюллера–Хинтона при 37 °С в течение 16 ч. Образец каждой культуры затем разводят в 40 раз в свежем агаре и инкубируют при 37 °С в течение 1.5–3 ч. Полученные культуры добавляют в каждую лунку 384-луночного планшета, содержащую исследуемый образец в ДМСО в тестовой концентрации 32 мкг/мл (плотность клеток 5 × 10⁵ КОЕ/мл и общий объем 50 мл). Все планшеты накрывают и инкубируют при 37 °С в течение 18 ч без встряхивания. Ингибирование роста бактерий определяют измерением поглощения при 600 нм (OD₆₀₀) с использованием монохромного считывателя микропланшетов Tecan M1000 Pro. Долю ингибирования роста рассчитывают для каждой лунки с использованием отрицательного контроля (только для среды) и положительного контроля (бактерии без ингибиторов на той же пластине). Значения ингибирования определяют с помощью модифицированных Z-показателей, рассчитанных с использованием медианы и медианного абсолютного отклонения (MAD) образцов (без контроля) на той же пластине. Образцы с долей ингибирования выше 80% и Z-оценкой выше 2.5 для обеих реплик классифицируют как активные соединения. Образцы с показателями ингибирования от 50 до 80% и Z-оценкой выше 2.5 для обеих реплик классифицируют как частично активные соединения.

Оценка противогрибковой активности соединений 5–7. Грибковые штаммы культивируют в течение 72 ч на питательной среде YPD (дрожжевой экстракт – пептон – декстроза) при 30 °С, дрожжевая суспензия 1 × 10⁶ – 5 × 10⁶ КОЕ/мл (установлено OD₅₃₀) подготовлена из пяти колоний. Суспензию добавляют в каждую лунку, содержащую исследуемые соединения, доводя конечную плотность клеток суспензии грибов до 2.5 × 10³ КОЕ/мл и общий объем до 50 мл. Все планшеты накрывают и инкубируют при 35 °С в течение 36 ч без встряхивания.

Файл сопроводительных материалов, содержащий спектры ЯМР ¹H, ¹³C соединений 3–7 и PCA соединения 4, доступен на сайте журнала <http://hgs.osi.lv>.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 17-43-020021 p_a). Часть исследований выполнена в соответствии с федеральной программой №АААА-А19-119022290012-3.

Структурные исследования соединений проводились в Центре коллективного пользования "Агидель" в Институте нефтехимии и катализа Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

Список литературы

1. Wright, G. D. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 862.
2. Vardanyan, R.; Hruby, V. *Antibiotics. Synthesis of Best-seller Drugs*; Elsevier, 2016, p. 868.
3. Tenover, F. C. *Am. J. Med.* **2006**, *119*, S3.
4. Denny, B. J.; Novotny, L.; West, P. W. J.; Blesova, M.; Zamocka, J. *Med. Princ. Pract.* **2005**, *14*, 377.

5. Ng, C. K. L.; Obando, D.; Widmer, F.; Wright, L. C.; Sorrell, T. C.; Jolliffe, K. A. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 811.
6. Sundararaman, M.; Kumar, R.R.; Venkatesan, P.; Ilangoan, A. *J. Med. Microbiol.* **2013**, 62, 241.
7. *The Use of Antibiotics*; Kucers, A.; Bennett, N. McK.; Bennet, M., Eds.; Butterworth-Heinemann Ltd., 1987, p. 1696.
8. Tanaka, N.; Kinoshita, T.; Masukawa, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 30, 278.
9. Bendtzen, K.; Diamant, M.; Faber, V. *Cytokine* **1990**, 2, 423.
10. Nicoletti, F.; Zaccone, P.; Di Marco, R.; Magro, G.; Grasso, S.; Morrone, S.; Santoni, A.; Tempera, G.; Meroni, P. L.; Bendtzen, K. *Immunology* **1995**, 85, 645.
11. Faber, V.; Newell, A.; Dalglish, A. G.; Malkovsky, M. *Lancet* **1987**, 330, 827.
12. Obando, D.; Pantarat, N.; Handke, R.; Koda, Y.; Widmer, F.; Djordjevic, J. T.; Ellis, D. H.; Sorrell, T. C.; Jolliffe, K. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6329.
13. Kataev, V. E.; Strobukina, I. Yu.; Zakharova, L. Ya. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2014**, 63, 1884. [Изв. АН, Сер. хим. **2014**, 1884.]
14. Tischer, M.; Pradel, G.; Ohlsen, K.; Holzgrabe, U. *ChemMedChem* **2012**, 7, 22.
15. Arning, J.; Stolte, S.; Bösch, A.; Stock, F.; Pitner, W.-R.; Welz-Biermann, U.; Jastorffa, B.; Ranke, J. *Green Chem.* **2008**, 10, 47.
16. Madaan, P.; Tyagi, V. K. *Surf. Rev. Lett.* **2008**, 15, 531.
17. Shakurova, E. R.; Pozdnyakova, D. A.; Tretyakova, E. V.; Parfenova, L. V. *Lett. Drug Des. Discovery*. DOI: 10.2174/1570180816666181217123629.
18. Madaan, P.; Tyagi, V. K. *J. Oleo Sci.* **2008**, 57, 197.
19. Salimova, E. V.; Mamaev, A. G.; Tretyakova, E. V.; Kukovinets, O. S.; Mavzyutov, A. R.; Shvets, K. Yu.; Parfenova, L. V. *Russ. J. Org. Chem.* **2018**, 54, 141. [Журн. орган химии **2018**, 54, 1395.]
20. Tang, Z.; Mayrargue, J.; Alami, M. *Synth. Commun.* **2007**, 37, 3367.
21. Cooper, A. *Tetrahedron* **1966**, 22, 1379.
22. Sotofte, I.; Duvold, T. *Acta Crystallogr., Sect. E: Crystallogr. Commun.* **2001**, E57, o829.
23. Cooper, A.; Hodgkin, D. C. *Tetrahedron* **1968**, 24, 909.
24. Castro-Mendez, A.; Sandoval-Ramirez, J.; Bernes, S. *Acta Crystallogr., Sect. E: Crystallogr. Commun.* **2002**, E58, o606.
25. Zhdanov, R. I.; Golubev, V. A.; Rozantsev, É. G. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* **1970**, 19, 188. [Изв. АН СССР, Сер. хим. **1970**, 186.]