

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
“ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ”

УДК 547.9 : 577.1

**РАЙМАН**  
Михаил Эдуардович

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ  
28-ГОМОБРАССИНОСТЕРОИДОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

по специальности 02.00.03 – Органическая химия

Минск, 2009

Работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

**Научный руководитель:** **Литвиновская Раиса Павловна,**  
доктор химических наук,  
главный научный сотрудник лаборатории  
химии стероидов  
Института биоорганической химии  
НАН Беларуси

**Официальные оппоненты:** **Ковганко Николай Владимирович**  
доктор химических наук,  
заведующий лабораторией химии  
экдистероидов Института биоорганической  
химии НАН Беларуси

**Матюшенко Евгений Александрович**  
кандидат химических наук, доцент,  
заведующий кафедрой органической химии  
химического факультета Белорусского  
государственного университета

**Оппонирующая организация:** Институт физико-органической химии  
НАН Беларуси

Защита состоится 9 февраля 2010 г. в 13-00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 2200141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2 в зале заседаний ученого совета, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел. (017) 267-85-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я.Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «    » января 2010 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций Д 01.21.01  
кандидат химических наук

С.В.Бабицкая

## ВВЕДЕНИЕ

Брассиностероиды (БС) представляют собой класс растительных гормонов, необходимых для роста, развития и адаптации растений в окружающей среде. Брассиностероиды инициируют множество процессов в растительной клетке, усиливают клеточное деление, элонгацию, биосинтез протеинов, совместно с другими фитогормонами воздействуют на основные физиологические процессы, которые определяют продуктивность и качественные параметры растений. Применение брассиностероидов таких как брассинолид, 24-эпибрассинолид, 28-гомобрассинолид в количествах 5-20 мг на гектар приводит к значительному увеличению урожая пшеницы, риса, картофеля, ячменя и других сельскохозяйственных культур. Растения, обработанные брассиностероидами, оказываются более устойчивыми к засухе, экстремальным температурным условиям и засоленности почвы.

28-Гомобрассинолид является одним из наиболее активных и перспективных для использования в сельском хозяйстве брассиностероидов. Он присутствует во многих растительных объектах и обладает ростомодулирующим и адаптогенным действием, при этом в ряде тестов превосходит по своей активности брассинолид и 24-эпибрассинолид. В настоящее время на основе 28-гомобрассинолида в ИБОХ НАН Беларуси создан и проходит регистрацию в Республике Беларусь препарат для сельского хозяйства Эпин-плюс. Известно также, что некоторые синтетические аналоги брассиностероидов проявляют заметную биологическую активность, сопоставимую или превышающую активность природных брассиностероидов. Эти факторы обуславливают научный и практический интерес к синтезу и исследованию производных 28-гомобрассиностероидов, а также к разработке удобных, высокочувствительных и быстрых методов их анализа.

Диссертационная работа посвящена разработке методов синтеза новых производных 28-гомобрассиностероидов, перспективных в качестве биологически активных соединений, синтезу компонентов иммунохимической тест-системы для определения 28-гомобрассиностероидов, а также проведению предварительной оценки биологической активности полученных соединений.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами.** Тема диссертации соответствует приоритетному направлению фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006-2010 годы: «Физические, химические, биологические и генетические

методы и технологии получения новых веществ, материалов, модифицированных биологических форм, наноматериалов и нанотехнологий» в части 3.5 Органический синтез новых веществ. Диссертационная работа является частью плановых исследований лаборатории химии стероидов ИБОХ НАН Беларуси, выполняемых в соответствии с заданиями 2.12 «Осуществить синтез новых физиологически активных соединений ряда стероидов и изучить возможность их практического использования в качестве основы препаратов медицинского и сельскохозяйственного назначения» (№ ГР 20061543) ГПОФИ «Физиологически активные вещества» на 2006-2010 гг. и 1.01 «Разработка конвергентного метода синтеза брассинолида и исследование возможности применения гормона и его аналогов в качестве основы новых агропрепаратов» (№ ГР 20052813) ГПОФИ «Биорациональные пестициды» на 2004-2008 гг., по проекту Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований № Х07К-045 «Брассиностероиды в регуляции клеточного метаболизма у растений в условиях низкотемпературного стресса» (2007-2009 гг., № ГР 20071687).

**Цель и задачи исследования.** Основная цель данного исследования заключается в разработке методов синтеза неизвестных ранее производных 28-гомобрассиностероидов. Интерес представляет их исследование как потенциальных биологически активных соединений, а также в качестве компонентов набора реактивов тест-системы для иммунохимического анализа 28-гомобрассиностероидов. Для достижения поставленной цели в рамках диссертационной работы было необходимо решить следующие задачи:

- 1) осуществить синтез 6-(О-карбоксиметил)оксимных производных 28-гомобрассиностероидов;
- 2) получить иммуноген и меченый антиген на основе 28-гомокастастерона для разработки тест-системы по иммунохимическому определению 28-гомобрассиностероидов;
- 3) разработать методы синтеза 22- и 23-оксопроизводных 28-гомобрассиностероидов и изучить их в реакции с О-карбоксиметилгидроксиламином;
- 4) разработать схему синтеза и получить  $C^{26}$ -модифицированные 28-гомобрассиностероиды;
- 5) осуществить синтез эфиров индолилуксусной кислоты на основе 28-гомобрассиностероидов;
- 6) провести предварительную оценку биологической активности полученных соединений.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Методы синтеза 6-О-карбоксиметилоксида 28-гомокастастерона и ряда его эфирных производных, обладающих ростстимулирующей активностью.

2. Методы синтеза иммуногена и меченого антигена на основе гаптена 28-гомокастастерона и разработка тест-системы для иммуноферментного анализа 28-гомобрассиностероидов.
3. Синтез 26-модифицированных 28-гомобрассиностероидов, в качестве ключевой стадии включающий перегруппировку Кляйзена стероидного 22-гидрокси-23-олефина.
4. Синтез 22- и 23-оксопроизводных 28-гомокастастерона (аналогов природного брассиностероида криптолида) путём окисления по Дессу-Мартину соответствующих ацетоксиспиртов, полученных избирательным снятием ацетатой защиты 22,23-диацетокси-28-гомосекастерола или реакцией переацилирования 22-гидрокси-23-ацетоксипроизводных.
5. Метод синтеза индолилацетоксипроизводных 28-гомобрассиностероидов, включающий синтез ангидрида индолилуксусной кислоты и взаимодействие его с соответствующим брассиностероидом.

**Личный вклад соискателя** заключается в проведении экспериментальной работы по синтезу и установлению структуры полученных соединений, аналитическом обзоре литературы. Разработка иммуноферментной тест-системы для определения 28-гомобрассиностероидов проводилась совместно с к.х.н. С.В.Драч, к.б.н. А.Г.Прядко и н.с. Т.В.Новик. Проведение первичных биологических испытаний проводилось совместно с н.с. В.И.Аникеевым. Постановка задач, подготовка материалов и интерпретация результатов для научных публикаций осуществлялась совместно с чл.-корр. НАН Беларуси, д.х.н., проф. В.А. Хрипачом и д.х.н. Р.П.Литвиновской.

**Апробация результатов диссертации.** Материалы диссертационной работы представлены на научных конференциях: II International Symposium “Plant growth substances: intracellular hormonal signaling and applying in agriculture” (Kyiv, 2007); V Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2007); III Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2008); Международной конференции, посвященной 50-летию юбилею создания Института химии академии наук Молдовы (Кишинёв, 2009); Всероссийской конференции по органической химии, посвященной 75-летию со дня основания Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва, 2009).

**Опубликованность результатов диссертации.** Изложенные в диссертации результаты составили предмет 5 статей в научных изданиях, что соответствует 3 авторским листам, а также тезисов 8 докладов, 4 патентов РБ и 1 заявки на изобретение РБ.

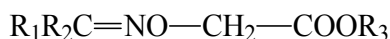
**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы по теме

диссертации (глава 1), обсуждения результатов собственных исследований (глава 2), экспериментальной части (глава 3), заключения и библиографического списка, который насчитывает 154 источника. Работа изложена на 100 страницах, содержит 3 таблицы, которые занимают 2 страницы, и 1 приложение, которое занимает 3 страницы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Синтез 6-(О-карбоксиметил)оксима 28-гомокастастерона и его производных

Известно, что некоторые О-алкилоксимные производные общей формулы **1** могут быть использованы для регуляции биосинтеза одного из фитогормонов растения – этилена.

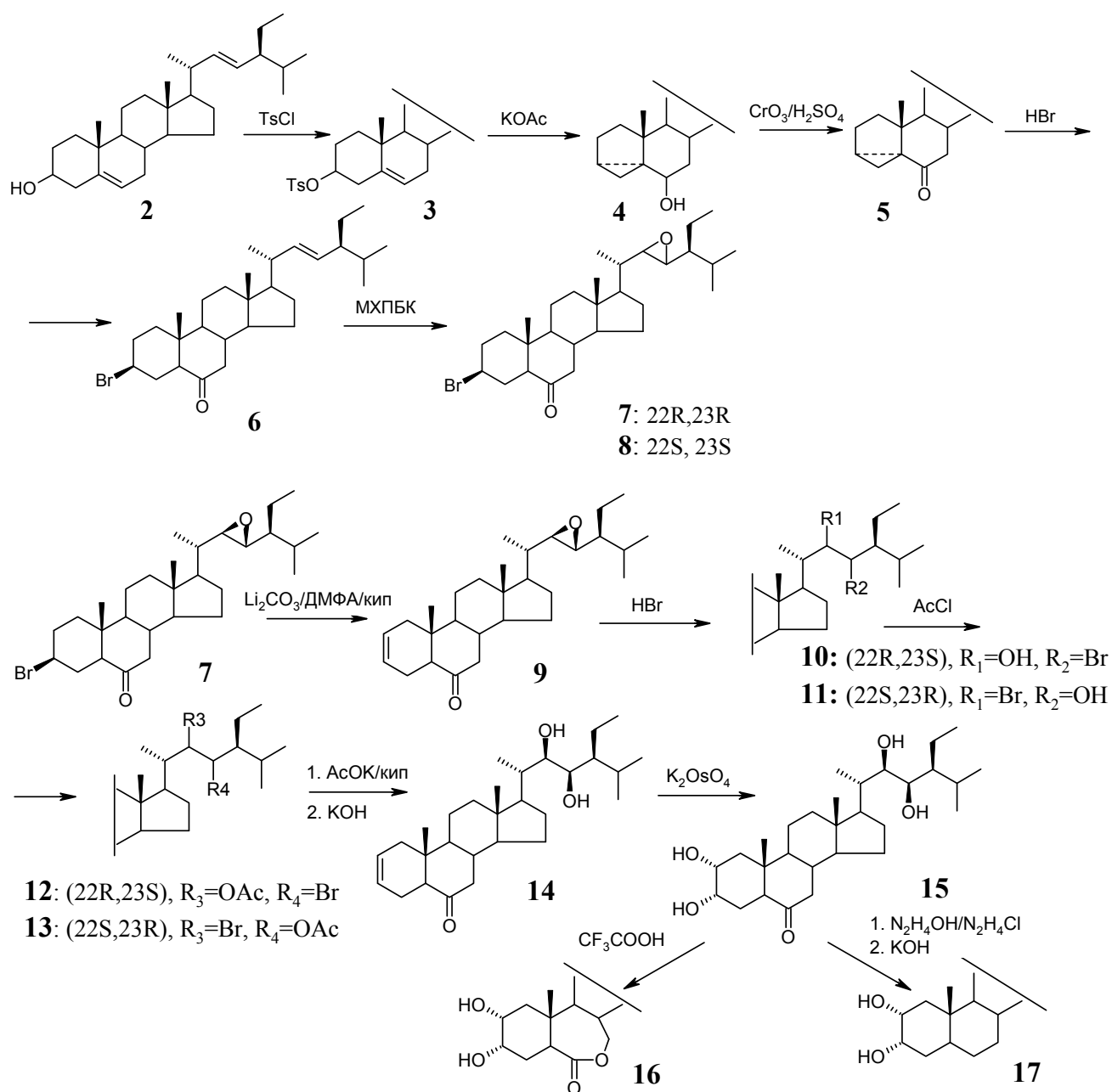


**1**

Принимая во внимание способность brassinosteroidов воздействовать на гормональный баланс растений, изменяя, в частности, этиленовый компонент гормонального спектра, представляло интерес синтезировать подобные производные на основе 28-гомобраassinosteroidов ( $R_1, R_2 = BC$ ). С этой целью был получен 6-(О-карбоксиметил)оксим 28-гомокастастерона, который далее был превращен в замещенные оксимы с терминальной кислотной или сложноэфирной группой и различной длиной цепи при  $C^6$ .

Наработка 28-гомобраassinosteroidов, необходимых для дальнейших модификаций и исследований, осуществлена из циклокетона **5**, полученного из доступного  $C_{29}$ -стерина – стигмастерина **2** по известной методике через 3-тозилоксипроизводное **3**, путём изо-стероидной перегруппировки последнего и окисления образовавшегося циклоспирта **4**. Региоизбирательное присоединение бромистого водорода при обработке циклокетона **5** бромистоводородной кислотой в уксусной кислоте привело к образованию 3-бром-22-ен-6-кетона **6** с выходом, близким к количественному. Окисление 22-олефина **6** м-хлорнадбензойной кислотой дало смесь эпоксидов в соотношении 22R,23R- (**7**) и 22S,23S- (**8**) изомеров 2:1 с суммарным выходом около 80%.

Кипячение 3β-бром-22,23-эпокси-6-кетона **7** в диметилформамиде с карбонатом лития привело к продукту дегидробромирования –  $\Delta^2$ -стероиду **9**. Раскрытие эпоксидного цикла 22R,23R-эпоксида **9** при обработке бромистоводородной кислотой дало смесь бромгидринов **10** и **11**, которую без разделения ацетилировали ацетилхлоридом. Кипячение полученных бромацетатов **12** и **13** в водной уксусной кислоте в присутствии ацетата калия с последующим омылением ацетатных групп позволило получить 22R,23R-дигидроксипроизводное **14**.

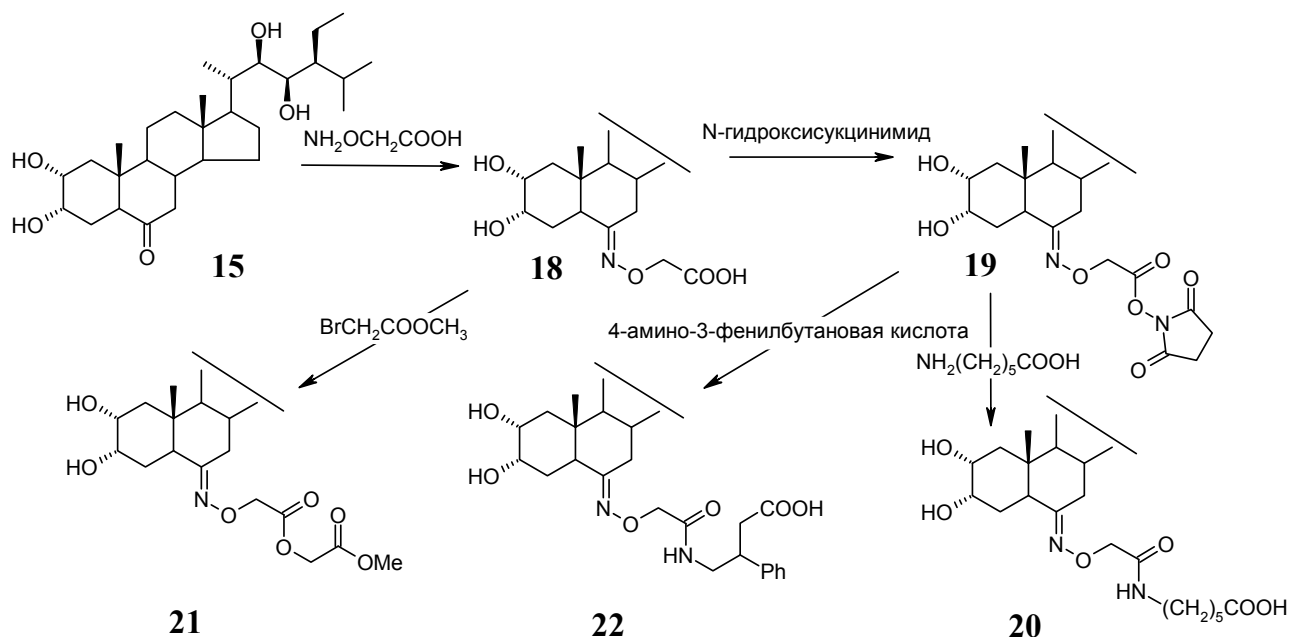


Введение 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -диолевой группировки осуществляли *цис*-гидроксилированием  $\Delta^2$ -связи под действием осмата калия. В результате был выделен 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22R,23R-тетраол **15** (28-гомокастастерон), который окисляли по Байеру-Виллигеру в 28-гомобрассинолид **16**.

На основе 28-гомокастастерона осуществлён синтез 6-дезоксо-28-гомокастастерона **17** путём восстановления 6-кетогруппы по Вольфу-Кижнеру-Хуанг-Минлону. Полученное соединение было применено в дальнейшем при изучении перекрёстных реакций антител к 28-гомобрассинолиду.

Исследование реакции 28-гомокастастерона **15** с гидрохлоридом *O*-карбоксиметилгидроксиламина в водном пиридине показало, что образование 6-(*O*-карбоксиметил)оксима **18** протекает с выходом 96% и даёт только один изомер с *E*-геометрией C=N связи.

Синтез других 6-О-алкилоксимных производных 28-гомокастастерона, содержащих, в частности, концевую карбоксильную группу, осуществлён с использованием активированного эфира **19**. N-сукцинимидный эфир **19** синтезирован реакцией производного **18** с N-оксисукцинимидом в присутствии дициклогексилкарбодиимида. Взаимодействие эфира **19** с ω-аминокапроновой кислотой в безводном диоксане при температуре 5-7°C приводит к производному **20** с выходом 90%. При взаимодействии сукцинимидного эфира **19** с 4-амино-3-фенилбутановой кислотой в диоксане с выходом 67% получено производное **22**. Взаимодействием кислоты **18** с метиловым эфиром бромуксусной кислоты в диметилформамиде при 50°C с выходом 72% привело к образованию эфира **21**.



Таким образом, впервые были синтезированы 6-оксиминопроизводные 28-гомокастастерона, перспективные в качестве регуляторов роста растений.

## 2. Синтез 6,22- и 6,23-диоксо-28-гомобраassinостероидов и их трансформации в 6-(О-карбоксиметил)оксимины

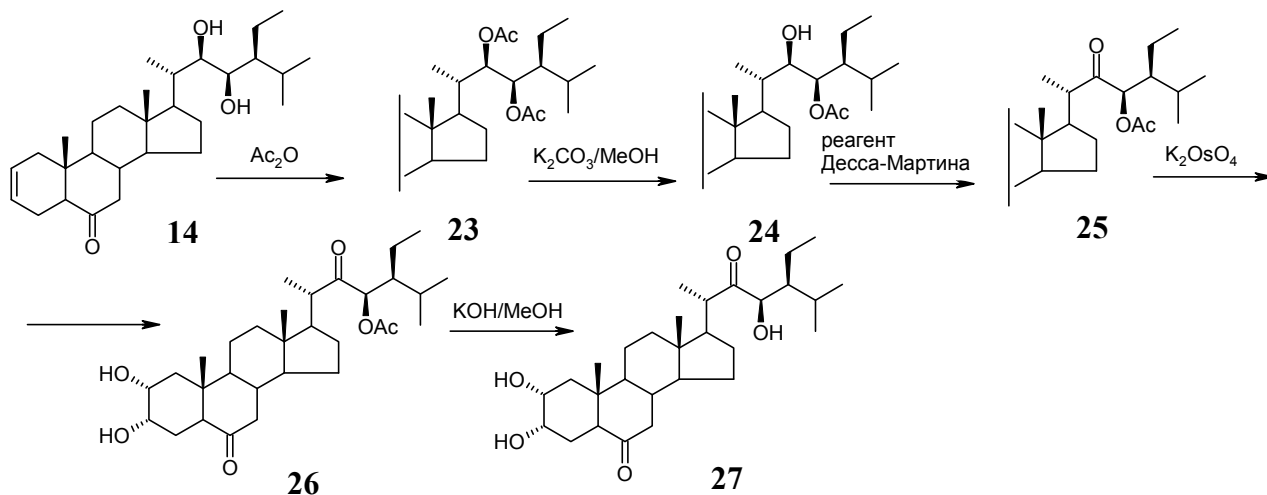
Недавно из пыльцы японского кедра *Cryptomeria japonica* выделен новый брассиностероид – криптолид, представляющий собой аналог брассинолида и содержащий в боковой цепи кетогруппу при  $\text{C}^{23}$ . Интересными представлялись разработка методики селективного введения оксогруппы в боковую цепь брассиностероидов для получения 22- и 23-кетоаналогов 28-гомобрассиностероидов. Можно ожидать, что подобные брассиностероиды ещё будут открыты в природных объектах.

В качестве основы в разработанной нами схеме синтеза целевых соединений предложена избирательная постановка защитной группы на 22- или 23-гидроксигруппы.



Попытка избирательного ацетилирования одной из гидроксигрупп 22,23-диола **14** уксусным ангидридом в пиридине не привела к желаемому результату – практически одновременно происходит ацетилирование обеих гидроксильных групп с образованием смеси 22- и 23-ацетоксипроизводных, которые далее превращаются в 22,23-диацетокси-28-гомосекастерол **23**.

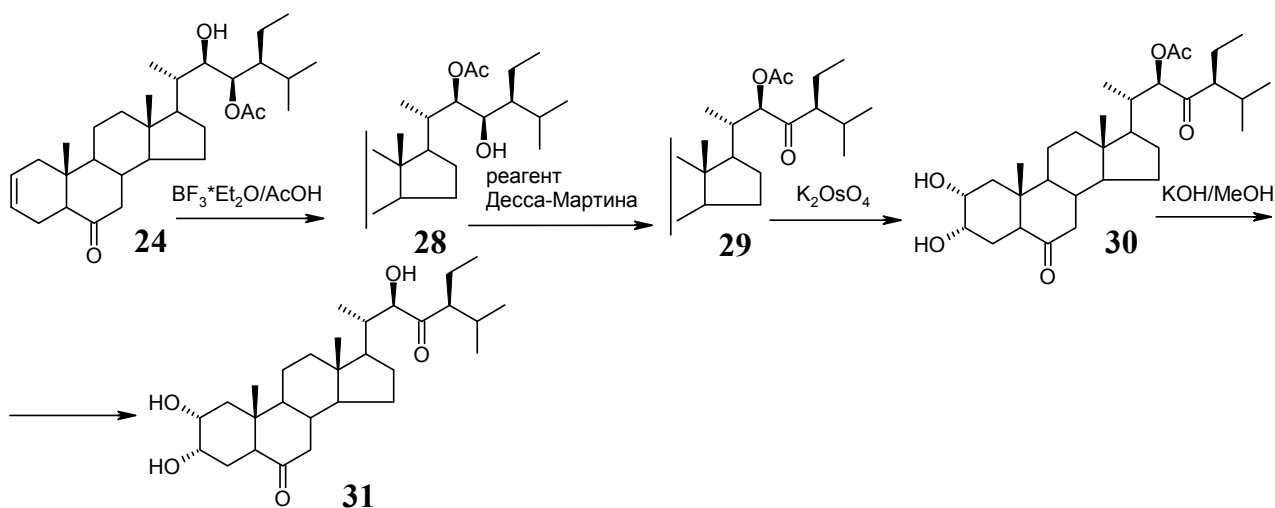
Предпринято избирательное дезацетилирование 22,23-диацетата 28-гомосекастерола **23** под действием 5%-ного раствора карбоната калия в метаноле при комнатной температуре. Частичное дезацетилирование, контролируемое во времени методом тонкослойной хроматографии, протекает с первоначальным снятием 22-ацетоксигруппы. Установлено, что через 2-2,5 ч образуется только 22-моногидроксипроизводное **24**, которое далее превращается в 22,23-диол **14**.



Прекращая реакцию через 2-2,5 ч, удалось выделить до 40% моноацетата **24** при 53%-ном возврате исходного соединения **23**. 23-Моноацетат 28-гомосекастерола **24** окисляли в мягких условиях по Дессу-Мартину с образованием 23-ацетата 22-оксо-28-гомосекастерола **25**. Для введения 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -диольной группировки было использовано *цис*-гидроксилирование  $\Delta^2$ -связи соединения **25** дигидратом осмата калия с образованием 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -диола **26**. Последующее снятие ацетатной защиты под действием метанольного раствора гидроксида калия привело к целевому 22-оксо-28-гомокастастерону **27**.

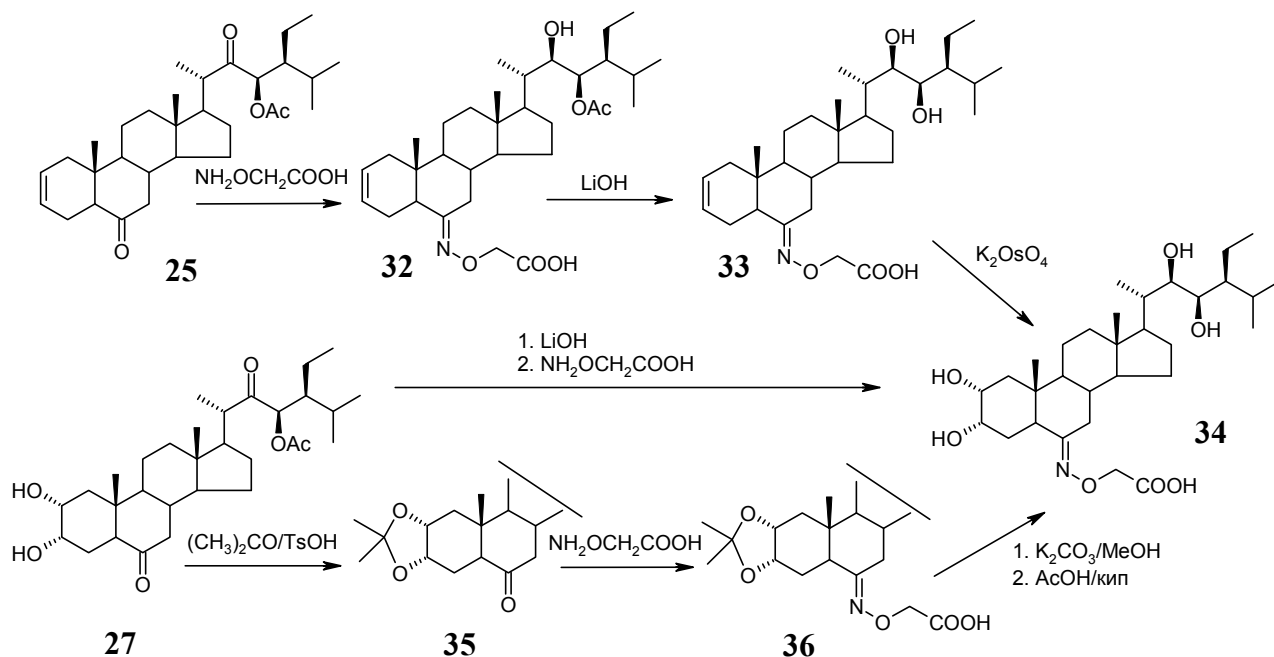
Ключевой стадией получения 23-оксопроизводных стало обнаруженное нами переацелирование 23-ацетокси-22-гидроксипроизводного **24**. Как оказалось, кипячение соединения **24** в уксусной кислоте в присутствии эфирата трехфтористого бора с выходом 48% приводит к образованию 22-ацетокси-23-гидроксипроизводного **28**, окисление которого в условиях, аналогичных окислению соединения **25**, дает 23-кетон **29** – региомер соединения **25**.

Введение 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -диольной группировки и снятие ацетатной защиты в образовавшемся соединении **30** дало 2,3,23-триол **31** - 23-кетоаналог 28-гомокастастерона.



Полученный 23-ацетат 22-оксо-28-гомосекастерола **25** стал основой для синтеза новых 6-(О-карбоксиметил)оксимов 28-гомобрассиностероидов. Изучение его в реакции с гидрохлоридом О-карбоксиметилгидроксиламина в водном пиридине показало, что при использовании даже трехкратного избытка реагента трансформации подвергается только 6-кетогруппа.

Гидролиз ацетатной группы с образованием 23-гидроксипроизводного **33** и последующее цис-гидроксилирование  $\Delta^2$ -связи дало 6-(О-карбоксиметил)оксим 22-оксо-28-гомокастастерона **34**. Региоселективность протекания реакции 6,22-дикето-28-гомобрассиностероидов с О-карбоксиметилгидроксиламином показана на примере 2,3-дигидрокси-23-ацетокси-6,22-диона **27** и его изопропилиденового производного **35**. В обоих случаях с высоким выходом удалось выделить только соединения, соответствующие трансформациям по 6-кетогруппе - О-карбоксиметилгидроксиламин 22-оксо-28-гомокастастерона **34** и его изопропилиденное производное **36**.



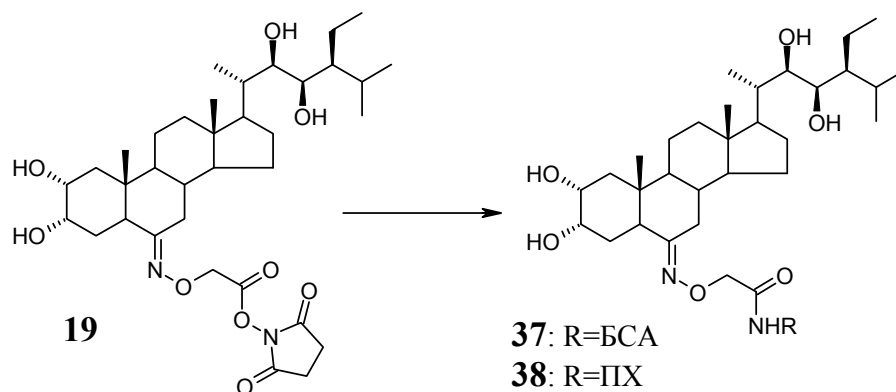
Таким образом, впервые получены 22- и 23-оксопроизводные 28-гомокастастерона. Установлено, что реакция 6,22-диоксопроизводного 28-гомокастастерона с O-карбоксиметилгидроксиламином протекает региоизбирательно с участием только карбонильной группы при C<sup>6</sup>.

### 3. Синтез конъюгатов 28-гомокастастерона с бычьим сывороточным альбумином и пероксидазой хрена и разработка на их основе тест-системы для иммуноферментного анализа 28-гомобрассиностероидов

28-Гомобрассинолид является основой нового агропрепарата ЭПИН-плюс, поэтому очень актуальна разработка методов анализа действующего вещества, а также его химического и биохимического предшественника 28-гомокастастерона. В качестве возможного пути решения проблемы нами предложен метод иммуноферментного анализа.

В результате взаимодействия раствора активированного эфира **19** в диоксане с водно-диоксановым раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА, 1:1, pH 8.3) и последующего диализа против дистиллированной воды в течение 36 ч и 1%-ной суспензии активированного угля в воде получен конъюгат **37** в виде аморфного порошка (после лиофилизации), который использовали далее в качестве иммуногена.

По аналогии с получением конъюгата гаптена с БСА осуществлен синтез меченого антигена **38** - 28-гомокастастерона, меченого пероксидазой хрена (ПХ). Для этого к раствору фермента в бикарбонатном буфере (pH 8.35) добавлен активированный эфир **19** в диметилформамиде. Продукт **38** подвергли очистке с помощью хроматографии на сефадексе G-25.



В лаборатории химии белковых гормонов НАН Беларуси с применением иммуногенного конъюгата 28-гомокастастерон-БСА **37** проведена иммунизация кроликов и получены образцы высокоспецифичной сыворотки крови. Специфичность антисыворотки оценивали по способности различных стероидов конкурировать с 28-гомокастастероном за связывание с антителами.

Изучены перекрестные реакции более 20 стероидов различных классов, в том числе ряда брассиностероидов. Характерно, что среди ближайших структурных аналогов 28-гомокастастерона сопоставимое значение кросс-

реактивности имеет только 28-гомобрассинолид, перекрестная реакция которого с антителами к 28-гомокастастерону составляет 100%.

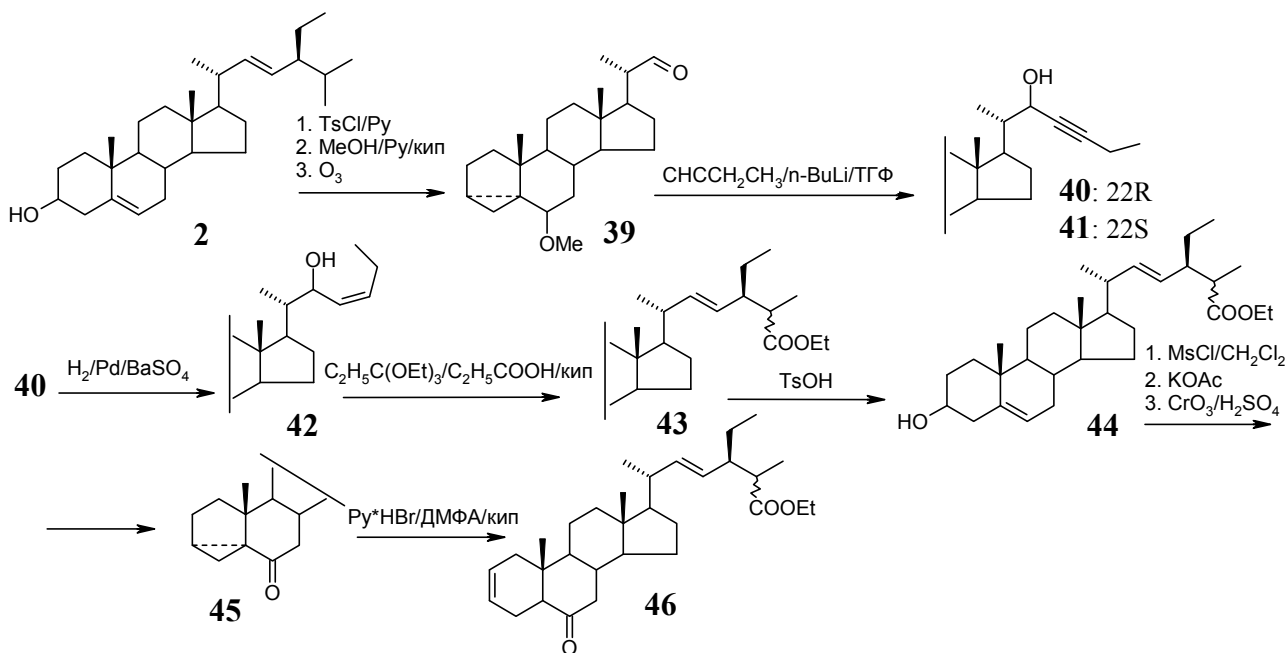
Чувствительность предложенной тест-системы высока - метод позволяет обнаружить 28-гомокастастерон и 28-гомобрассинолид в концентрации 0,2-0,3 нмоль/л или 5-7 пкг в 50 мкл образца.

Разработанная иммуноаналитическая система может быть применена для обнаружения фитогормонов в растительных объектах, изучения устойчивости препаративных форм и рабочих растворов препаратов на основе 28-гомобрассинолида и 28-гомокастастерона, а также при исследовании токсиколого-гигиенических характеристик препаратов (наличие остаточных количеств в продуктах питания, метаболизм у животных) и качества коммерческих форм.

#### 4. Синтез 26-модифицированных производных 28-гомобрассиностероидов

Продолжая изучение методов получения аналогов 28-гомобрассиностероидов, мы разработали схему синтеза их производных, функционально модифицированных в положении C<sup>26</sup> углеродного скелета. Такие производные могут быть использованы как для получения природных 28-гомобрассиностероидов, так и в качестве ключевых интермедиатов новых физиологически активных аналогов 28-гомобрассиностероидов.

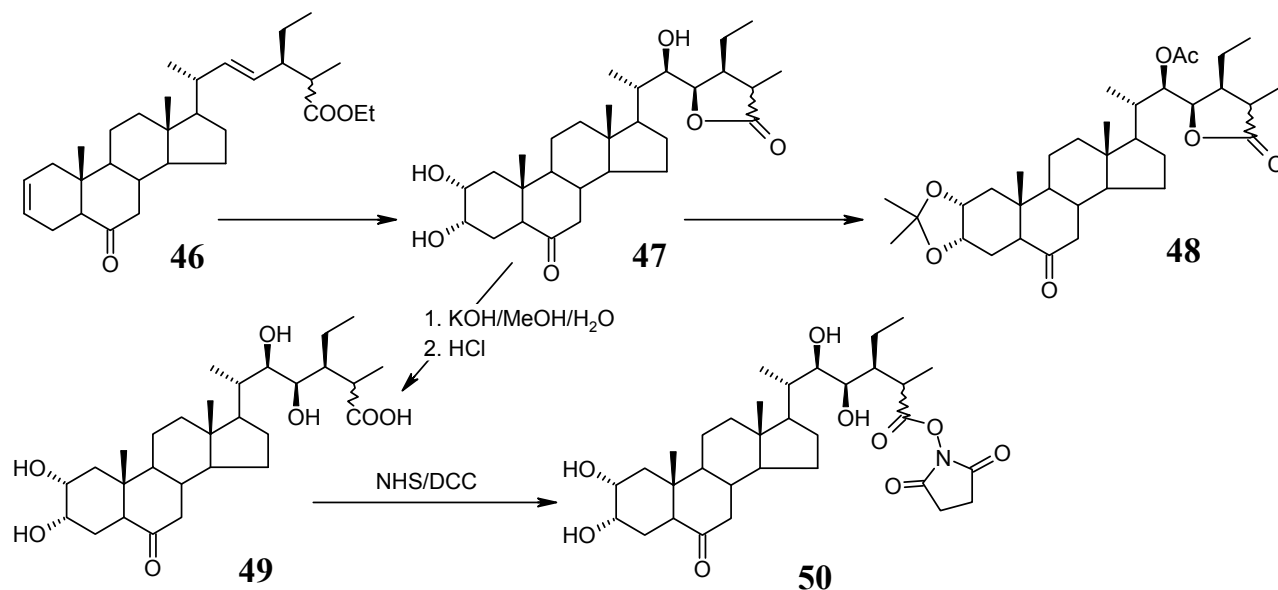
В качестве исходного соединения был выбран альдегид **39**, полученный в три стадии из стигмастерина **2**. Присоединение 1-бутиллития к альдегиду **39** в растворе тетрагидрофурана при -60°C приводит к образованию смеси двух эпимерных по C<sup>22</sup> ацетиленовых спиртов **40** и **41** в соотношении 4:3 с суммарным выходом 66%.



Ацетиленовый спирт **40** восстанавливали водородом над катализатором Линдлара в присутствии хинолина. При этом с выходом 90% получен *цис*-23-ен-22-ол **42**. Дальнейшее построение боковой цепи проводили с помощью перегруппировки Кляйзена. Так, кипячением аллилового спирта **42** в бензоле в присутствии триэтилортопропионата и пропионовой кислоты с выходом 69% получена эимерная смесь эфиров **43**.

Продолжением схемы стала функционализация циклов А и В стероидной молекулы. Регенерирование 3 $\beta$ -гидрокси- $\Delta^5$ -группировки путем кислотного гидролиза соединения **43** под действием *p*-толуолсульфокислоты в диоксане привело к продукту **44**. Дальнейшая трансформация включала мезилирование 3 $\beta$ -гидроксигруппы, изостероидную перегруппировку в присутствии ацетата калия и окисление 6-гидроксигруппы по Джонсу. При этом с выходом 50% образовался 3 $\alpha$ ,5-циклокетон **45**. Кипячением последнего с бромидом пиридиния в диметилформамиде с выходом 70% получен продукт перегруппировки -  $\Delta^2$ -6-кетон **46**.

Завершение схемы предполагает осуществление *цис*-гидроксилирования двойных связей соединения **46**. Мы остановились на использовании окислительной смеси на основе дигидрата осмата калия с хиральным катализатором ряда гидрохинидина, поскольку известно, что он является оптимальным для получения целевого 22R,23R-изомера. Неожиданно продуктом реакции оказался  $\gamma$ -лактон **47**, образование которого можно объяснить омылением сложноэфирной группы в щелочных условиях реакции с последующей внутримолекулярной циклизацией при кислотной обработке в процессе выделения продукта.



Доказательством образования циклического продукта **47**, наряду со спектральными характеристиками, служат проведенные трансформации гидроксильных групп при C<sup>2</sup>, C<sup>3</sup> и C<sup>22</sup>. Так, обработка соединения **47** ацетоном

в присутствии п-толуолсульфокислоты приводит к образованию 2,3-изопропилидендиоксипроизводного, дальнейшее ацетилирование 22-гидроксигруппы которого дает 22-ацетокси-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -изопропилидендиоксипроизводное **48**. Образование последнего свидетельствует о наличии в исходной молекуле одной вицинальной диольной группировки и одной вторичной гидроксильной группы.

Раскрытие лактона **47** метанольным раствором гидроксида калия с последующим осторожным подкислением 0.1 N раствором соляной кислоты до pH $\approx$ 6-7 приводит к образованию кислоты **49**, которая может быть использована в качестве гаптена с линкером в боковой цепи brassinостероида. Это подтверждено синтезом активированного сукцинимидного эфира **50** реакцией стероида **49** с N-оксисукцинимидом в присутствии дициклогексилкарбодиимида в безводном диоксане.

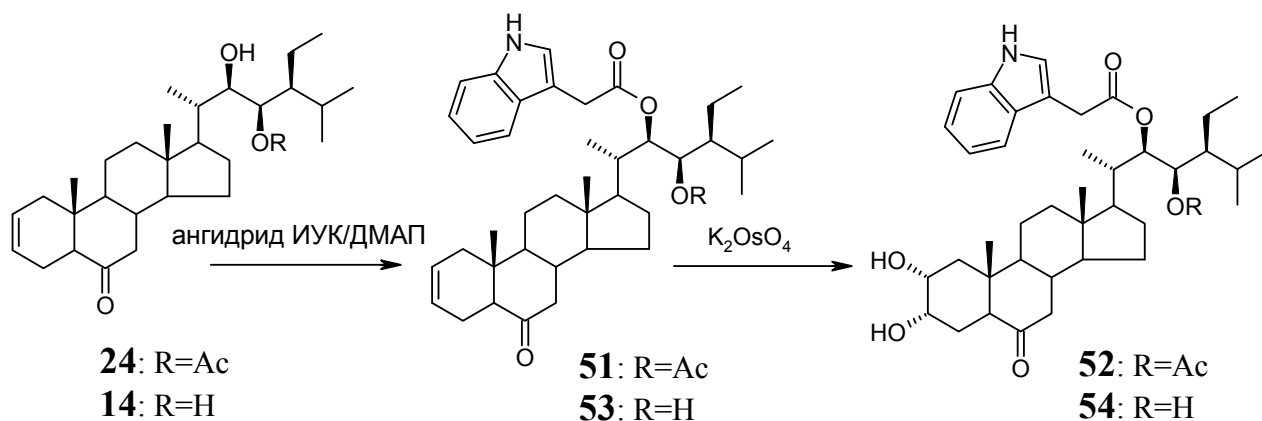
Таким образом, с использованием в качестве промежуточной стадии перегруппировки Кляйзена стероидного 22-гидрокси-23-олефина впервые получены 26-модифицированные 28-гомобраassinостероиды.

### **5. Синтез индолилацетоксипроизводных 28-гомобраassinостероидов**

Интерес к индолилацетоксипроизводным 28-гомобраassinостероидов обусловлен, главным образом, двумя причинами. Считается, что brassinостероиды усиливают чувствительность растения к ауксину и при совместной обработке усиливают физиологическое действие друг друга, проявляя синергизм. Кроме того, brassinостероиды, модифицированные остатком индолилуксусной кислоты, перспективны для использования в иммунофлуоресцентном анализе в качестве меченых антигенов.

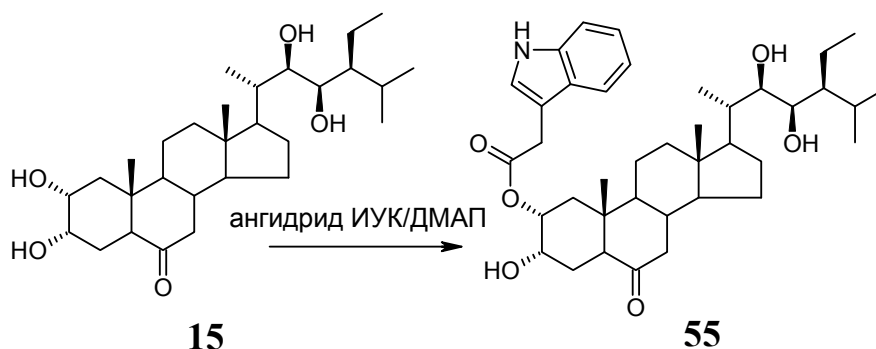
Для отработки методики получения brassinостероидных производных индолилуксусной кислоты мы использовали описанное выше 22-гидрокси-23-ацетоксипроизводное **24**. Установлено, что оптимальными условиями проведения реакции является использование в качестве ацилирующего агента ангидрида индолилуксусной кислоты в диоксане при нагревании реакционной смеси до 40 $^{\circ}$ C в присутствии N,N-диметиламинопиридина в качестве катализатора. Ангидрид получали взаимодействием индолилуксусной кислоты с дициклогексилкарбодиимидом в абсолютном диоксане.

Формирование 2,3-дигидроксифункциональности в цикле A соединения **51** осуществляли с использованием системы K<sub>2</sub>OsO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O-K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-метансульфонамид. В указанных условиях с выходом 69% образуется 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -дигидроксипроизводное **52**, являющееся эфиром индолилуксусной кислоты 23-ацетокси-28-гомокастастерона по C<sup>22</sup> положению.

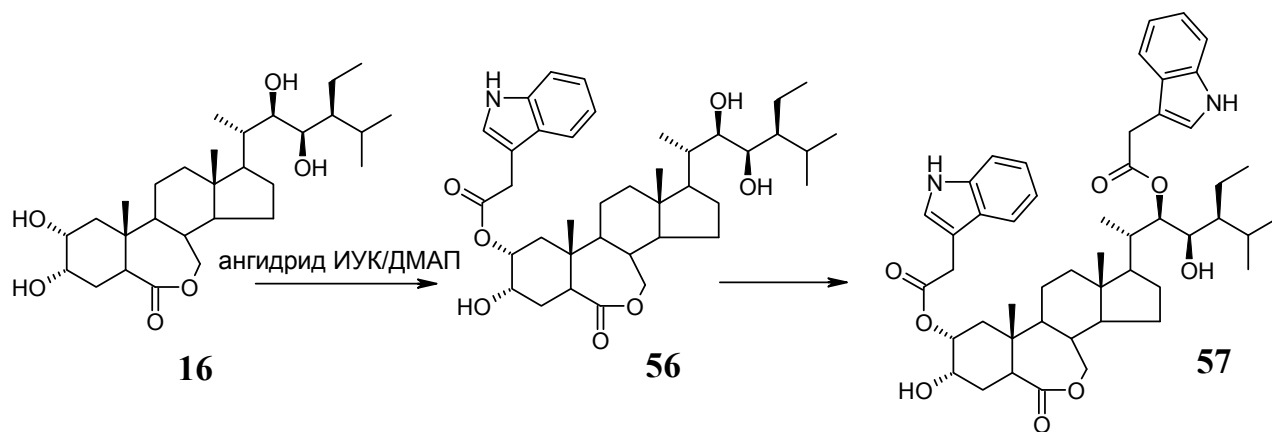


Исследование реакции ацилирования ангидридом индолилуксусной кислоты вицинального 22,23-диола – 28-гомосекастерола **14** показало, что образование эфира происходит только по гидроксильной группе при С<sup>22</sup>, приводя к 22-(3-индолилацетокси)производному **53**. Ацелирование соединения **53** уксусным ангидридом привело к 23-ацетокси-22-(3-индолилацетокси)-28-гомосекастеролу **51**, а *цис*-гидроксилирование Δ<sup>2</sup>-связи соединения **53** - к 23-ацетокси-22-(3-индолилацетокси)-28-гомокастастерону **54**.

При ацилировании избытком ангидрида индолилуксусной кислоты 28-гомокастастерона **15** в течение суток происходит преимущественное образование 2-(3-индолилацетокси)производного **55** (выход 58%).



Введение лактонной функции в цикл В окислением соединения **55** по Байеру-Виллигеру наряду с окислением привело к омылению сложноэфирной группировки с образованием 28-гомобрассинолида **16**. Поэтому была предпринята попытка прямой этерификации последнего ангидридом индолилуксусной кислоты. При использовании 2-х эквивалентов реагента в течение 3 часов с невысоким выходом (20%) наблюдается региоизбирательное образование производного **56** по гидроксильной группе при С<sup>2</sup>. При этом возврат исходного 28-гомобрассинолида составляет 60%. Более длительное выдерживание реакционной смеси или увеличение количества ангидрида индолилуксусной кислоты приводит к сложной смеси трудноразделимых продуктов, из которой удалось выделить 2,22-ди-(3'-индолилацетокси)производное **57** с выходом 44%.



Таким образом, взаимодействием 28-гомобраassinостероидов с ангидридом индолилуксусной кислоты впервые получены индолилацетоксипроизводные 28-гомобраassinостероидов.

### 6. Биологическая активность синтезированных соединений.

На базе Центрального ботанического сада изучено влияние ряда синтезированных 6-оксиминопроизводных 28-гомобраassinостероидов на ростмодулирующую активность. Действие веществ изучали по их влиянию на рост и развитие растений *Rhododendron maximum*. Проведенные тесты показали, что соединения **18** и **20** оказывают стимулирующее действие на рост растений. Важно отметить, что оксимные производные проявили также большее положительное воздействие в опытах на всхожесть семян по сравнению с 28-гомобраassinолоидом.

Полученные индолилацетоксипроизводные 28-гомобраassinостероидов исследованы нами в биотестах на проростках озимой пшеницы (табл.1).

Таблица 1 - Влияние модифицированных индолилуксусной кислотой браassinостероидов на длину стеблей проростков пшеницы.

Вещество	Концентрация	Длина стебля, % к контролю (5 суток)	Длина стебля, % к контролю (11 суток)
Контроль	-	100	100
<b>56</b>	$10^{-7}$ М	132,2	119,0
<b>56</b>	$10^{-9}$ М	112,9	101,2
<b>53</b>	$10^{-7}$ М	113,5	111,2
<b>54</b>	$10^{-7}$ М	118,7	116,0
<b>ГБ</b>	$10^{-7}$ М	109,4	102,9
<b>ГБ+ИУК</b>	$10^{-7}$ М	110,0	104,3

Результаты первичного тестирования показали, что обработка семян пшеницы индолилацетоксипроизводными 28-гомобраassinостероидов приводит к удлинению стебля на 10-30 % по сравнению с контролем, а также заметному превышению длины стебля по сравнению с образцами, обработанными



раствором смеси брассиностероида и индолилуксусной кислоты в исследуемой концентрации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Взаимодействием 28-гомокастастерона с гидрохлоридом O-карбоксиметилгидроксиламина в водном пиридине впервые осуществлен синтез 6-O-карбоксиметилоксима 28-гомокастастерона и ряда 6-оксиминопроизводных, проявивших фиторостстимулирующую активность [5 – 8].

2. Реакцией N-оксисукцинимидного эфира 6-O-карбоксиметилоксима 28-гомокастастерона с бычьим сывороточным альбумином и пероксидазой хрена получены, соответственно, иммуноген и меченый антиген, ставшие основой для разработки первой иммуноферментной тест-системы по определению 28-гомобрассиностероидов [2, 12, 14 – 17].

3. Разработан метод синтеза 26-модифицированных производных 28-гомобрассиностероидов, в качестве ключевой стадии включающий перегруппировку Кляйзена (22R,23Z)-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-26-нор-5 $\alpha$ -холест-23-ен-22-ола. Показано, что полученные производные могут служить удобными интермедиатами для синтеза брассиностероидов с гетероциклом в боковой цепи, а также гаптенами с линкером при C<sup>26</sup> [3, 10].

4. На основе реакции избирательного снятия ацетатной защиты 22,23-диацетокси-28-секастерола и обнаруженной реакции переацилирования 22-гидрокси-23-ацетоксипроизводных впервые осуществлены синтезы 22- и 23-оксопроизводных 28-гомокастастерона – аналогов природного брассиностероида криптолида [1, 9].

5. Установлено, что взаимодействие 28-гомобрассиностероидов с ангидридом индолилуксусной кислоты протекает региоселективно. На основе разработанного метода впервые получен ряд индолилацетоксипроизводных 28-гомобрассиностероидов. Среди синтезированных продуктов выявлены вещества, обладающие ростстимулирующей активностью [4, 11, 13, 18].

### Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Разработанная и запатентованная иммуноаналитическая система по определению 28-гомобрассиностероидов может быть применена для обнаружения фитогормонов в растительных объектах, изучения устойчивости препаративных форм и рабочих растворов препаратов на основе 28-гомобрассинолида и 28-гомокастастерона, а также при исследовании их токсиколого-гигиенических характеристик (наличие остаточных количеств в

продуктах питания, метаболизм у животных) и качества коммерческих форм (Лабораторный технологический регламент № 2/2008-ЛТР от 14.02.2008 г.).

2. Производные 28-гомокастастерона, модифицированные при C<sup>26</sup>, могут служить удобными интермедиатами для синтеза brassinosteroidов с гетероциклом в боковой цепи, а также гаптенами с линкером в соответствующем положении.

3. Индолилацетоксипроизводные 28-гомобраassinosteroidов могут использоваться в качестве ростстимулирующих средств в растениеводстве, а также в качестве флуоресцентных меток.

4. 6-Оксиминопроизводные 28-гомобраassinosteroidов могут использоваться в качестве ростстимулирующих средств, влияющих на прорастание семян.

### Список публикаций соискателя

#### Статьи:

1. Литвиновская, Р.П. Синтез 22- и 23-оксопроизводных 28-гомокастастерона / Р.П. Литвиновская, М.Э. Райман, В.А. Хрипач // Журнал органической химии. – 2008. – Т. 44, вып. 11. – С. 1638-1642.

2. Синтез и иммунохимическое определение 28-гомобраassinosteroidов / В.А.Хрипач, Р.П.Литвиновская, М.Э.Райман, С.В.Драч, В.Н.Жабинский, О.В.Свиридов, А.Г.Прядко, Т.В.Новик // Весці НАН Беларусі, сер.хім. навук. – 2008. – С. 47-58.

3. Литвиновская, Р.П. Синтез 26-модифицированных производных 28-гомобраassinosteroidов / Р.П. Литвиновская, М.Э. Райман, В.А. Хрипач // Химия природных соединений. – 2009. – № 5. – С. 544-548.

4. 28-Гомобраassinosteroidы, модифицированные остатком индолилуксусной кислоты / Р.П. Литвиновская, М.Э. Райман, В.И. Аникеев, В.А. Хрипач // Вестник БРФФИ. – 2009. – №3. – С. 50-56.

5. Литвиновская, Р.П. Синтез 6-О-алкилоксимных производных 28-гомобраassinosteroidов / Р.П. Литвиновская, М.Э. Райман, В.А. Хрипач // Весці НАН Беларусі, сер.хім. навук. – 2009. – №3. – С. 72-78.

#### Тезисы докладов:

6. Синтез новых производных 28-гомокастастерона / М.Э.Райман, Р.П.Литвиновская, С.В.Драч, В.А.Хрипач. // Химия, структура и функция биомолекул: тез. докл. II междунар. конф., Минск, 3-5 октября 2006 г. / НАН Беларуси, Ин-т биоорг. химии; редкол.: Н.Б. Хрипач [и др.]. – Минск, 2006. – PR-119.

7. Synthesis and study of novel of brassinosteroid derivatives / R.P. Litvinovskaya, M.E. Raiman, T.V. Kalenchuk, V.A. Khripach. / 2 International Symposium "Plantgrowth substances: intracellular hormonal signaling and applying

in agriculture”, Kyiv, 8-12 October 2007. / National Academy of sciences of Ukraine, Institute of Bioorg. Chem. and Petroleum Chem. – Kyiv, 2007. – P. 78.

8. Синтез и исследование новых производных брассиностероидов / М.Э. Райман, Р.П. Литвиновская, Т.В. Каленчук, В.А. Хрипач, И.К. Володько. / V Междун. научная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», Минск, 28-30 ноября 2007. / НАН Беларуси, Ин-т экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича. – Минск, 2008. – С. 168.

9. Райман, М.Э. Синтез 22- и 23- оксопроизводных 28-гомокастастерона / М.Э.Райман, Р.П.Литвиновская, В.А.Хрипач // Химия, структура и функция биомолекул: материалы III междунар. конф., посвящ. 80-летию НАН Беларуси и 95-летию академика А.А. Ахрема, Минск, 1-3 октября 2008 г. / НАН Беларуси, Ин-т биоорг. химии. – Минск, 2008. – С. 209.

10. Райман, М.Э. Синтез производных 28-гомокастастерона модифицированных по положению С-26 / М.Э.Райман, Р.П.Литвиновская, В.А.Хрипач // Химия, структура и функция биомолекул: материалы III междунар. конф., посвящ. 80-летию НАН Беларуси и 95-летию академика А.А. Ахрема, Минск, 1-3 октября 2008 г. / НАН Беларуси, Ин-т биоорг. химии. – Минск, 2008. – С. 210.

11. Synthesis of 28-homobrassinosteroids modified with indolylacetic acid / R.P. Litvinovskaya, M.E. Raiman, V.I. Anikeev, V.A. Khripach // The International Conference dedicated to the 50<sup>th</sup> anniversary from foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova, Chisinau, 26-28 May 2009. / Academy of Sciences of Moldova, Institute of Chemistry. – Chisinau, 2009. – PP 086.

12. Иммуноферментный метод определения 28-гомобрассиностероидов / Драч С.В., Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Райман М.Э., Жабинский В.Н., Свиридов О.В., Прядко А.Г., Новик Т.В. // Химия, структура и функция биомолекул: материалы III междунар. конф., посвящ. 80-летию НАН Беларуси и 95-летию академика А.А. Ахрема, Минск, 1-3 октября 2008 г. / НАН Беларуси, Ин-т биоорг. химии. – Минск, 2008. – С. 98.

13. Синтез и исследование производных брассиностероидов, модифицированных индолилуксусной кислотой / Литвиновская Р.П., Райман М.Э., Минин П.С., Анিকেев В.И., Хрипач В.А. // Всероссийская конференция по органической химии, посвящ. 75-летию со дня основания Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 25-30 октября 2009 г. / ИОХ РАН. – Москва, 2009. – С. 264.

*Патенты:*

14. {[[(22R,23R,24S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-Тетрагидрокси-24-этил-5 $\alpha$ -холест-6-илиденамино]окси}уксусная кислота в качестве гаптена в синтезе конъюгата 28-гомокастастерона с бычьим сывороточным альбумином : Патент № 11831

Респ. Беларусь, С 07J 41/00 / Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Райман М.Э., Драч С.В., Жабинский В.Н., Свиридов О.В., Прядко А.Г., Новик Т.В. ; заявитель : ГНУ “Инст. биоорг. химии НАН Беларуси” – № а 20080248 ; заявл. 03.05.2008 ; опубл. 30.04.2009 // Официальный бюл. “Изобретения. Полезные модели. Промышленные образцы.” / Нац. центр интеллектуальной собственности. – 2009. – № 2. – С. 81.

**15.** Конъюгат 28-гомокастастерона с бычьим сывороточным альбумином в качестве иммуногена : Патент № 11832 Респ. Беларусь, С 07J 41/00 / Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Райман М.Э., Драч С.В., Жабинский В.Н., Свиридов О.В., Прядко А.Г., Новик Т.В. ; заявитель : ГНУ “Инст. биоорг. химии НАН Беларуси” – № а 20080249 ; заявл. 03.05.2008 ; опубл. 30.04.2009 // Официальный бюл. “Изобретения. Полезные модели. Промышленные образцы.” / Нац. центр интеллектуальной собственности. – 2009. – № 2. – С. 82.

**16.** Конъюгат 28-гомокастастерона с пероксидазой хрена в качестве меченого антигена для иммуноферментного определения 28-гомобрассиностероидов : Патент № 11835 Респ. Беларусь, С 07J 41/00 / Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Райман М.Э., Драч С.В., Жабинский В.Н., Свиридов О.В., Прядко А.Г., Новик Т.В. ; заявитель : ГНУ “Инст. биоорг. химии НАН Беларуси” – № а 20080251 ; заявл. 03.05.2008 ; опубл. 30.04.2009 // Официальный бюл. “Изобретения. Полезные модели. Промышленные образцы.” / Нац. центр интеллектуальной собственности. – 2009. – № 2. – С. 82.

**17.** Способ количественного определения 28-гомобрассиностероидов и состав для его осуществления : Патент № 11833 Респ. Беларусь, G 01N 33/50 / Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Райман М.Э., Драч С.В., Жабинский В.Н., Свиридов О.В., Прядко А.Г., Новик Т.В. ; заявитель : ГНУ “Инст. биоорг. химии НАН Беларуси” – № а 20080250 ; заявл. 03.05.2008 ; опубл. 30.04.2009 // Официальный бюл. “Изобретения. Полезные модели. Промышленные образцы.” / Нац. центр интеллектуальной собственности. – 2009. – № 2. – С. 113-114.

**18.** Брассиностероидные эфиры индолилуксусной кислоты, проявляющие фиторостостимулирующую активность, и способ их получения : Заявка № а20091252 на изобретение РБ, С 07J 43/00 / В.А. Хрипач, Р.П. Литвиновская, М.Э. Райман, П.С. Минин, В.И. Аникеев / Заявлено 20.08.2009. Заявитель: Институт биоорганической химии НАН Беларуси.

## РЕЗЮМЕ

Райман  
Михаил Эдуардович

Синтез и свойства производных 28-гомобраassinостероидов

**Ключевые слова:** 28-гомобраassinостероиды, иммуноферментный анализ 28-гомобраassinостероидов, 22-, 23-оксопроизводные 28-гомобраassinостероидов, 26-модифицированные производные 28-гомобраassinостероидов, индолилацетоксипроизводные 28-гомобраassinостероидов.

**Цель работы:** разработка методов синтеза новых производных 28-гомобраassinостероидов перспективных в качестве биологически активных соединений, синтез компонентов иммунохимической тест-системы для определения 28-гомобраassinостероидов, проведение предварительной оценки биологической активности полученных соединений.

**Объектами исследования** являются 28-гомобраassinостероиды и их производные.

**Методы исследования:** химический синтез, ЯМР-, -УФ и ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, иммуноферментный анализ.

**Полученные результаты и их новизна.** Осуществлен синтез 6-О-карбоксиметилоксима 28-гомокастастерона и ряда его производных, проявивших ростстимулирующую активность. Исходя из 28-гомокастастерона получены иммуноген и меченый антиген, ставшие основой для разработки первой высокочувствительной и специфичной иммуноферментной тест-системы по определению 28-гомобраassinостероидов. Разработан метод синтеза 26-модифицированных производных 28-гомобраassinостероидов, в качестве ключевой стадии включающий перегруппировку Кляйзена (22R,23Z)-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-26-нор-5 $\alpha$ -холест-23-ен-22-ола. Показано, что полученные производные могут служить удобными интермедиатами для синтеза браassinостероидов с гетероциклом в боковой цепи, а также гаптенами с линкером в положении С-26.

Впервые осуществлен синтез 22- и 23-оксопроизводных 28-гомокастастерона – аналогов природного браassinостероида криптолида. Получен ряд индолилацетоксипроизводных 28-гомобраassinостероидов, перспективных в качестве ростстимулирующих средств и флуоресцентных меток.

**Область применения:** органическая химия, химия природных соединений, иммунохимия, регуляторы роста растений.

## SUMMARY

Raiman  
Mikhail Eduardovich

Synthesis and properties of the derivatives of 28-homobrassinosteroids.

**Key words:** 28-homobrassinosteroids, immunoassay of 28-homobrassinosteroids, 22-, 23-oxoderivatives of 28-homobrassinosteroids, 26-modified derivatives of 28-homobrassinosteroids, indolylacetoxy derivatives of 28-homobrassinosteroids.

**The aims of the study:** To develop methods of synthesis of new derivatives of 28-homobrassinosteroids promising as biologically active compounds, to synthesize components of immunochemical test-system for 28-homobrassinosteroid determination, to carry out preliminary estimation of biological activity of the synthesized compounds.

**The object of research** – 28-homobrassinosteroids and their derivatives.

**Methods of investigation:** chemical synthesis, NMR-, -UV and IR-spectroscopy, mass spectrometry, immunoassay.

**Results obtained and their novelty.** The synthesis of 6-O-carboxymethylxime of 28-homocastasterone and some of its derivatives that show plant growth promoting properties has been carried out. Starting from 28-homocastasterone, immunogen and labeled antigen were obtained. They became the basis for developing the first highly sensitive and specific enzyme immunoassay system for determination of 28-homobrassinosteroids. A method of synthesis of 26-modified derivatives of 28-homobrassinosteroids, as a key stage, including a Claisen rearrangement of (22R,23Z)-6 $\beta$ -methoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-26-nor-5 $\alpha$ -cholest-23-ene-22-ol was developed. It was shown that these derivatives may serve as convenient intermediates for the synthesis of brassinosteroids with heterocycle in the side chain, as well as haptens with the linker in position C-26. For the first time the synthesis of 22- and 23-oxoderivatives of 28-homocastasterone - analogs of natural brassinosteroid cryptolide was carried out. A number of indolylacetoxy derivatives of 28-homobrassinosteroids promising as growth stimulating substances and fluorescent labels were synthesized.

**Fields of application:** organic chemistry, chemistry of natural compounds, immunochemistry, plant growth regulators.

## РЭЗІЮМЭ

Райман  
Міхаіл Эдуардавіч

Сінтэз і ўласцівасці вытворных 28-гомабрасінастэроідаў

**Ключавыя словы:** 28-гомабрасінастэроіды, імунаферментны аналіз 28-гомабрасінастэроідаў, 22-, 23-оксавывтворныя 28-гомабрасінастэроідаў, 26-мадыфікаваныя вытворныя 28-гомабрасінастэроідаў, індалілацэтоксі вытворныя 28-гомабрасінастэроідаў.

**Мэта работы:** распрацоўка метадаў сінтэзу новых вытворных 28-гомабрасінастэроідаў перспектыўных у якасці біялагічна актыўных злучэнняў, сінтэз кампанентаў імунахімічнай тэст-сістэмы для вызначэння 28-гомабрасінастэроідаў, правядзенне папярэдніх ацэнкі біялагічнай актыўнасці атрыманых злучэнняў.

**Аб'ектамі даследавання** з'яўляюцца 28-гомабрасінастэроіды і іх вытворныя.

**Метады даследавання:** хімічны сінтэз, ЯМР-, -УФ і ІЧ-спектраскапія, мас-спектраметрыя, імунахімічны аналіз.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Здзейснены сінтэз 6-О-карбоксіметылаксіма 28-гомакастэрона і шэрагу яго вытворных, якія праявілі ростстимулюючую актыўнасць. Зыходзячы з 28-гомакастэрона атрыманы імунаген і пазначаны антыген, якія сталі асновай для распрацоўкі першай высокачуллівай і спецыфічнай імунаферментнай тэст-сістэмы па вызначэнні 28-гомабрасінастэроідаў. Распрацаваны метады сінтэзу 26-мадыфікаваных вытворных 28-гомабрасінастэроідаў, які ў якасці ключавой стадыі ўключае перагрупоўку Кляйзена (22R,23Z)-6 $\beta$ -метоксі-3 $\alpha$ ,5-цыкла-26-нор-5 $\alpha$ -халест-23-ен-22-ола. Паказана, што атрыманыя вытворныя могуць служыць зручнымі інтэрмедыятамі для сінтэзу брасінастэроідаў з гетерацыклам ў бакавым ланцугу, а таксама гаптэнамі з лінкерам ў становішчы С-26. Упершыню здзейснены сінтэз 22- і 23-оксавывтворных 28-гомакастэрона - аналагаў прыроднага брасінастэроіда крысталіда. Атрыманы шэраг індалілацэтоксівытворных 28-гомабрасінастэроідаў, перспектыўных ў якасці ростстимулюючых сродкаў і флуарэсцэнтных метак.

**Галіна выкарыстання:** арганічная хімія, хімія прыродных злучэнняў, імунахімія, рэгулятары росту раслін.