

На правах рукописи



Лещенко Елена Владиславовна

Строение и биологическая активность вторичных метаболитов грибов, выделенных из морских растений и грунтов

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Владивосток – 2021

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН и Дальневосточном федеральном университете (ДВФУ)

Научный руководитель:

кандидат химических наук
Юрченко Антон Николаевич

Официальные оппоненты:

Коршун Владимир Аркадьевич
доктор химических наук,
Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН),
заведующий лабораторией молекулярного дизайна
и синтеза

Панкрушина Наталья Алексеевна
кандидат химических наук,
Новосибирский институт органической химии
им. Н.Н. Ворожцова (НИОХ СО РАН),
старший научный сотрудник лаборатории
терпеноидных соединений

Ведущая организация:

Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ
РАН) – обособленное подразделение Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»,
г. Пущино

Защита состоится «28» сентября 2021 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета 24.1.213.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423)231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ТИБОХ ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН www.piboc.dvo.ru).

Автореферат разослан « _____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.



Чингизова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Известно, что более 50% лекарственных препаратов созданы на основе соединений, выделенных из природных источников. Поэтому выделение новых биологически активных природных соединений является важной фундаментальной задачей на пути к поиску «молекул-лидеров» – основы для создания лекарственных препаратов. В течение многих лет изучению морских грибов уделялось мало внимания. Одной из причин могла быть низкая численность грибов в морской среде, а второй – сомнение в существовании истинно морских грибов. Данная ситуация начала меняться к концу XX века в связи с признанием того факта, что морские грибы представляют собой довольно разнообразную филогенетическую группу и являются перспективным источником биологически активных веществ. Многие виды мицелиальных грибов живут как в морской, так и в наземной среде. Тем не менее, в условиях морской окружающей среды метаболитный состав факультативных морских грибов отличается от состава наземных экоформ. Действительно, из морских грибов были выделены уникальные по химической структуре и биологическому действию соединения, которые не были обнаружены у наземных грибов-микромикетов, несмотря на более чем 90-летнюю историю таких исследований. В последние годы большое число новых вторичных метаболитов, проявляющих фармацевтически значимую биологическую активность, было выделено из морских грибов. Так, к концу 1992 года было зарегистрировано только 15 природных соединений из морских грибов, а к 2020 году опубликованы сведения более чем о 5000 метаболитов. Широкое структурное разнообразие биологически активных веществ из морских грибов, обнаружение среди грибов эффективных продуцентов уже известных биоактивных соединений, а также возможность культивирования грибов в неограниченных количествах являются основными факторами, которые поддерживают интерес к исследованиям метаболитов морских микроскопических грибов во всем мире.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось выделение и установление строения новых вторичных метаболитов факультативных морских грибов, выделенных из грунтов и морских растений, обитающих в прибрежных районах Японского (Приморский край), Охотского (о. Сахалин) и Южно-Китайского (Вьетнам) морей.

Для достижения заявленной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) провести отбор новых перспективных грибных штаммов, ассоциированных с морскими растениями и грунтами Японского, Охотского и Южно-Китайского морей;
- 2) выделить индивидуальные природные соединения из экстрактов отобранных грибов;
- 3) установить строение новых вторичных метаболитов и идентифицировать ранее известные соединения;
- 4) установить абсолютную конфигурацию асимметрических центров для некоторых новых вторичных метаболитов;
- 5) исследовать противовоспалительную, противоопухолевую и цитотоксическую активность некоторых новых вторичных метаболитов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Из экстрактов изолятов восьми штаммов шести видов грибов: *Penicillium thomii* КММ 4674, КММ 4679 и КММ 4667, *Penicillium claviforme* КММ 4665 и *Trichoderma polysporum* КММ 4649 (морская трава *Zostera marina*, Японское море); *Aspergillus foetidus* КММ 4694 (грунт, Сахалинский залив, Охотское море); *Penicillium oxalicum* КММ 4683 и *Talaromyces funiculosus* LM.3.1 (листья неидентифицированного мангрового растения, Южно-Китайское море) в результате хроматографического разделения было выделено 41 индивидуальное соединение различной химической природы, 21 из которых являлось новым.

Впервые были получены данные рентгеноструктурного анализа для ранее известного (–)-3-бутил-7-гидроксифталида и двух новых метаболитов – зостеропениллина А и паллидопениллина А. С помощью модифицированного метода Мошера были установлены абсолютные конфигурации асимметрических центров новых соединений:

зостеропениллина А, паллидопениллина А и 3-(2'-гидроксibuтил)-7-гидроксифталида. На основе теоретических расчетов спектров электронного кругового дихроизма в рамках нестационарной теории функционала плотности были установлены абсолютные конфигурации асимметрических центров новых соединений: зостеропениллинов А–D и томимаринов А–Е. Было показано, что томимарины и зостеропениллины индуцируют снижение выработки оксида азота (II) в макрофагах, активированных липополисахаридом, а зостеропениллины способны ингибировать аутофагию в нецитотоксических концентрациях и могут сенсibilизировать клетки рака простаты человека РС3 при использовании совместно с лекарственными препаратами с цитотоксической активностью. Нафто-γ-пираны и зостеропениллин М ингибируют формирование колоний клеток рака простаты человека 22Rv1.

Практическое значение данного исследования состоит в развитии методов выделения и установления строения новых низкомолекулярных метаболитов из морских грибов.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Экстракты грибов *Penicillium thomii* КММ 4674 и *Penicillium thomii* КММ 4679 содержат новые поликетиды декалинового типа: зостеропениллины А–М и паллидопениллин А.
- 2) Экстракт гриба *Penicillium thomii* КММ 4667 содержит новые сесквитерпены эудесманового типа томимарины А–Е, а также ряд известных метаболитов.
- 3) Экстракт гриба *Penicillium oxalicum* КММ 4683 содержит новый сесквитерпен кадинанового типа 7-гидрокси-8-дегидроксианодерманол А.
- 4) Экстракт гриба *Penicillium claviforme* КММ 4665 содержит новое фталидное производное (–)-3-(2'-гидроксibuтил)-7-гидроксифталид совместно с его известным аналогом.
- 5) Экстракт гриба *Trichoderma polysporum* КММ 4649 содержит известный 3β,5α,9α-тригидрокси-(22E,24R)-эргоста-7,22-диен-6-он.
- 6) Экстракт гриба *Talaromyces funiculosus* LM.3.1 содержит известные наонадриды: глаукановую и глауконовую кислоты.

Апробация работы. Материалы работы были представлены на 6th Russian-Korean Conference «Current Issues of Biologically Active Compounds Chemistry and Biotechnology» (Новосибирск, 2015), 11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Турция, Анталия, 2015), ICOMID-2016 IV International Conference MICROBIAL DIVERSITY resource potential (Москва, 2016), 7th International Symposium Chemistry and Chemical Education (Владивосток, 2017), 1st Russian-Vietnamese Workshop on Marine Fungal Metabolites and Their Bioactivities (Вьетнам, Нячанг, 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России.

Личный вклад автора. Работа выполнена в лаборатории химии микробных метаболитов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН и лаборатории биологически активных соединений ШЕН ДВФУ. Основные результаты были получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автором был выполнен анализ данных литературы по теме исследования, выбирались методы, планировались и проводились эксперименты, устанавливалось химическое строение веществ на основе полученных спектроскопических данных, написаны статьи и сделаны доклады на конференциях. Регистрацию ЯМР спектров выделенных автором соединений проводил к.х.н. Денисенко В.А. (в.н.с. лаб. физико-химических методов исследований (ЛФХМИ) ТИБОХ ДВО РАН), масс-спектров – к.х.н. Дмитренко П.С. (зав. ЛФХМИ) и к.х.н. Попов Р.С. (н.с. ЛФХМИ). Изучение биологической активности проводилось к.б.н. Пислягиным Е.А. (н.с. лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН) и д.б.н. Дышловым С.А. (с.н.с. лаборатории фармакологии ННЦМБ ДВО РАН).

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, литературного обзора, посвященного вторичным метаболитам, выделенным из грибов, ассоциированных с морскими растениями и грунтами, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы, включающего 178 цитируемых работ. Работа изложена на 162 страницах, содержит 23 таблицы и 42 рисунка.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю ушедшему из жизни, к.х.н., зав. лабораторией химии микробных метаболитов ТИБОХ ДВО РАН до 2021 года Афиятуллову Шамилу Шерибзяновичу, под руководством которого была выполнена диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук, а также действующему руководителю, к.х.н., и.о. зав. лабораторией микробных метаболитов с 2021 года Юрченко Антону Николаевичу за помощь в написании и оформлении текста диссертации.

Также автор благодарит заведующего кафедрой биоорганической химии и биотехнологии ШЕН ДВФУ, профессора, академика Стоника В.А. и заведующую лабораторией биологически активных соединений ШЕН ДВФУ, к.х.н. Журавлеву О.И. за поддержку во время обучения в аспирантуре и возможность использования приборной базы кафедры; к.х.н. Антонова А.С. и к.х.н. Соболевскую М.П. за помощь в выделении некоторых соединений; ушедшего из жизни к.х.н. Денисенко В.А. за получение ЯМР спектров; д.б.н. Пивкина М.В., к.б.н. Худякову Ю.В. и к.б.н. Киричук Н.Н. за идентификацию и культивирование исследуемых мицелиальных штаммов; к.х.н. Дмитренко П.С. и к.х.н. Попова Р.С. за получение масс-спектров высокого разрешения; к.х.н. Герасименко А.В. и к.х.н. Удовенко А.А. за получение данных РСА; к.ф.-м.н. Глазунова В.П. и Ким Н.Ю. за получение ИК-, УФ- и КД-спектров; Бердышева Д.В. за теоретические расчеты абсолютных конфигураций стереоцентров некоторых соединений на основании нестационарной теории функционала плотности; д.б.н. Дышлогова С.А., к.б.н. Пислягина Е.А., к.б.н. Менчинскую Е.С. и Кузьмич А.С. за исследование биологической активности выделенных веществ; д.б.н. Михайлова В.В. за консультации в ходе работы над диссертацией; д.б.н. Калинина В.И., д.х.н. Авилова С.А. и д.х.н. Новикова В.Л. за ценные советы и замечания сделанные при рецензировании диссертации.

Некоторые используемые сокращения: HRESIMS – масс-спектрометрия с электронно-распылительной ионизацией высокого разрешения; HRAPPIMS – масс-спектрометрия с фотоионизацией при атмосферном давлении высокого разрешения; ESIQTOF – масс-спектрометрия с квадрупольной времяпролетной электронно-распылительной ионизацией; ESIMS – масс-спектрометрия с электронно-распылительной ионизацией; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; KCCB – константа спин-спинового взаимодействия; DEPT – неискаженное усиление переносом поляризации; COSY – корреляционная спектроскопия; HSQC – гетероядерная одноквантовая когерентность; HMBC – гетероядерная многополосная корреляция; NOESY – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена; РСА – рентгеноструктурный анализ; КД – круговой дихроизм; ЭКД – электронный круговой дихроизм; TD-DFT – нестационарная теория функционала плотности; МТРА-Cl–хлорангидрид α -метокси- α -(трифторметил)фенилуксусной кислоты, ЛПС – липополисахарид из *Escherichia coli*.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Скрининг

С целью поиска перспективных продуцентов биологически активных метаболитов были изучены 243 изолята грибов, выделенных из образцов грунта, а также с поверхности водорослей, морских трав и мангровых растений дальневосточных морей России и Южно-Китайского моря (побережье республики Вьетнам). Этилацетатные экстракты всех изолятов грибов были оценены на основании данных ТСХ и данных антимикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. На основании полученных результатов для дальнейшей работы были отобраны восемь

штаммов: *Penicillium thomii* KMM 4674 (морская трава *Zostera marina*, Японское море), *Penicillium thomii* KMM 4679 (морская трава *Zostera marina*, Японское море), *Penicillium thomii* KMM 4667 (морская трава *Zostera marina*, Японское море), *Penicillium claviforme* KMM 4665 (морская трава *Zostera marina*, Японское море), *Trichoderma polysporum* KMM 4649 (морская трава *Zostera marina*, Японское море), *Aspergillus foetidus* KMM 4694 (грунт, Сахалинский залив, Охотское море), *Penicillium oxalicum* KMM 4683 (листья неидентифицированного мангрового растения, Южно-Китайское море), *Talaromyces funiculosus* (листья неидентифицированного мангрового растения, Южно-Китайское море).

2 Установление строения индивидуальных соединений из гриба

Penicillium thomii KMM 4674

Гриб *Penicillium thomii* KMM 4674 был выделен из поверхностной микобиоты ризомы морской травы *Zostera marina* (залив Восток, Японское море).

Из этилацетатного экстракта *P. thomii* выделены новые поликетиды декалинового типа паллидопениллин А (1) и зостеропениллины А–L (2–13).

Брутто-формула соединения 1 установлена как $C_{15}H_{24}O_4$, на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[M + Na]^+$ с m/z 291.1582) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Анализ спектров 1H и ^{13}C ЯМР соединения 1 при помощи экспериментов DEPT и HSQC показал присутствие двух метильных (δ_H 0.91, δ_C 18.9 и δ_H 0.93, δ_C 25.8), четырех метиленовых групп (δ_H 0.86, 1.47, δ_C 28.4; δ_H 0.95, 1.60, δ_C 32.8; δ_H 2.61, 2.76, δ_C 49.9) групп, включая одну связанную с кислородом (δ_H 3.60 (2H), δ_C 56.1), пяти метиновых (δ_H 1.25, δ_C 40.0; δ_H 1.39, δ_C 38.9; δ_H 1.63, δ_C 48.4; δ_H 2.88, δ_C 61.9 и δ_H 2.53, δ_C 76.5), включая одну связанную с кислородной функцией, одного карбонильного атома углерода (δ_C 212.0), дизамещенной двойной связи (δ_H 5.85, δ_C 125.9; δ_H 5.41, δ_C 135.6) и одного sp^3 -гибридизованного четвертичного атома углерода, связанного с кислородной функцией (δ_C 70.4). Данные COSY спектра и HMBC корреляции H-4/C-5 (δ_C 38.9), C-10 (δ_C 48.4), C-12 (δ_C 135.6) и C-13 (δ_C 70.4); H-5/C-6 (δ_C 28.4), C-10 и C-13; H-6b/C-7 (δ_C 32.8), C-8 (δ_C 40.0) и C-10; H-7b/C-5, C-8 и C-9; H-10/C-9, C-11 (δ_C 125.9) и C-12; H-12/C-13; H₃-15/C-7, C-8 и C-9; 9-OH/C-8, C-9 и C-10 и 13-OH/C-4, C-13 и C-14 (рис. 1) показывают присутствие декалиновой системы в соединении 1, Δ^{11} двойной связи, метильной группы при C-8 и гидроксильных групп при C-9 и C-13.

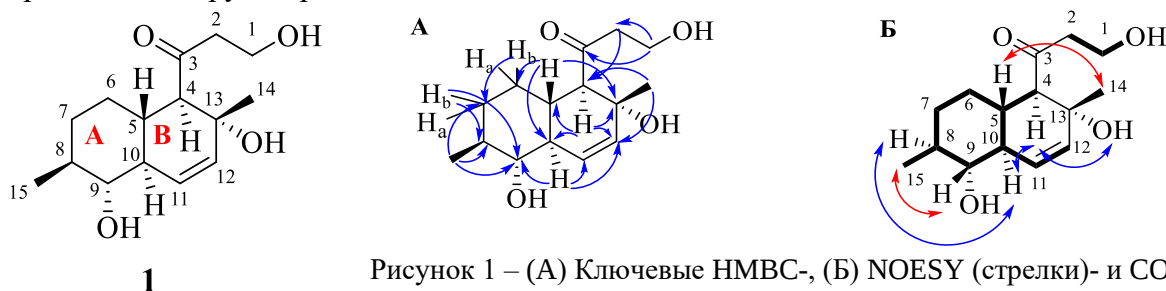


Рисунок 1 – (А) Ключевые HMBC-, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)-корреляции спектров паллидопениллина А (1)

1H - 1H -COSY взаимодействия H₂-1/1-OH и H₂-2, а также HMBC корреляции H₂-1/C-2 и C-3; H-2b/C-4 и H₃-14/C-4, C-12 и C-13 указывают на присутствие в соединении 1 1-гидрокси-3-оксипропильной боковой цепи и метильных групп при C-4 и C-13 соответственно. Относительная конфигурация стереоцентров 1 установлена на основании NOESY взаимодействий H-5/H₃-14; H-4/13-OH; H-10/H-8, H-4; H₃-15/H-9 (рис. 1Б). Относительная конфигурация стереоцентров соединения 1 подтверждена данными РСА кристалла, полученного при кристаллизации в этаноле (рис. 2). Абсолютная конфигурация асимметрического центра при C-9 в соединении 1 установлена с помощью модифицированного метода Мошера. Этерификация гидроксильных групп при C-9 и C-1 (R)- и (S)-МТРА хлорангидридами привела к образованию (S)-и (R)-МТРА эфиров 1a и 1b соответственно. Разница в значениях химических сдвигов $\Delta\delta(\delta_S - \delta_R)$ сигналов в протонных спектрах полученных эфиров (рис. 3) указывает на 9R конфигурацию и позволяет

установить стереоструктуру соединения **1** как 4*R*,5*S*,8*S*,9*R*,10*R*,13*R*. Соединение **1** названо паллидопениллином А.

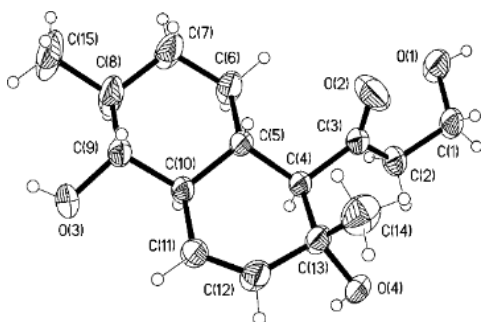
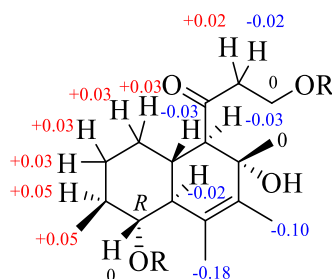


Рисунок 2 – Кристаллическая молекулярная структура **1** по данным РСА



1a: R=(*S*)-МТПА
1b: R=(*R*)-МТПА

Рисунок 3 – Значения $\Delta\delta(\delta_S-\delta_R)$ (в м.д.) для *S*-(**1a**) и *R*-(**1b**) МТПА-эфиров

Брутто-формула соединения **2** установлена как $C_{15}H_{22}O_3$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[M + Na]^+$ с m/z 273.1461) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Анализ спектров 1H и ^{13}C ЯМР соединения **2** при помощи экспериментов DEPT и HSQC показал присутствие двух метильных (δ_H 1.26, δ_C 23.2 и δ_H 1.03, δ_C 18.4) и четырех метиленовых (δ_H 1.28, 1.14, δ_C 28.7; δ_H 1.78, 1.08, δ_C 32.7; δ_H 2.64, 2.21, δ_C 39.9; δ_H 4.11, 3.89, δ_C 60.9) групп, включая одну связанную с кислородом (δ_H 4.11, 3.89), пяти метиновых (δ_H 1.89, δ_C 37.5; δ_H 1.65, δ_C 48.6; δ_H 1.41, δ_C 40.2; δ_H 2.09, δ_C 62.8 и δ_H 2.92, δ_C 77.9) групп, одного карбонильного атома углерода (δ_C 210.2), дизамещенной двойной связи (δ_H 6.24, δ_C 130.1, δ_H 5.69, δ_C 131.6) и одного sp^3 -гибридизованного четвертичного атома углерода, связанного с кислородной функцией (δ_C 74.7). Эти данные и величина степени ненасыщенности, равная пяти, свидетельствуют о наличии трех колец в структуре молекулы. Данные 1H - 1H -COSY спектра и HMBC корреляции H-4 (δ_H 2.09)/C-5 (δ_C 37.5), C-10 (δ_C 48.6), C-14 (δ_C 23.2); H-5 (δ_H 1.89)/C-4 (δ_C 62.8), C-6 (δ_C 28.7), C-10, C-13 (δ_C 74.7); H₂-6 (δ_H 1.28, 1.14)/C-5, C-7 (δ_C 32.7), C-8 (δ_C 40.2) и C-10; H-7a (δ_H 1.78)/C-5, C-6, C-8 и C-15 (δ_C 18.4); H-7b (δ_H 1.08)/C-9 (δ_C 77.9); H-8 (δ_H 1.41)/C-7, C-9 и C-10; H₃-15 (δ_H 1.03)/C-7, C-8 и C-9; H-9 (δ_H 2.92)/C-10, C-11 (δ_C 130.1), C-15; H-10 (δ_H 1.65)/C-11, C-12 (δ_C 131.6); H-11 (δ_H 6.24)/C-13; H-12 (δ_H 5.69)/C-4, C-13 и C-14 указывают на присутствие декалиновой системы в структуре молекулы, а также на положение Δ^{11} двойной связи и метильных групп при C-8 и C-13 в соединении **2** (рис. 4).

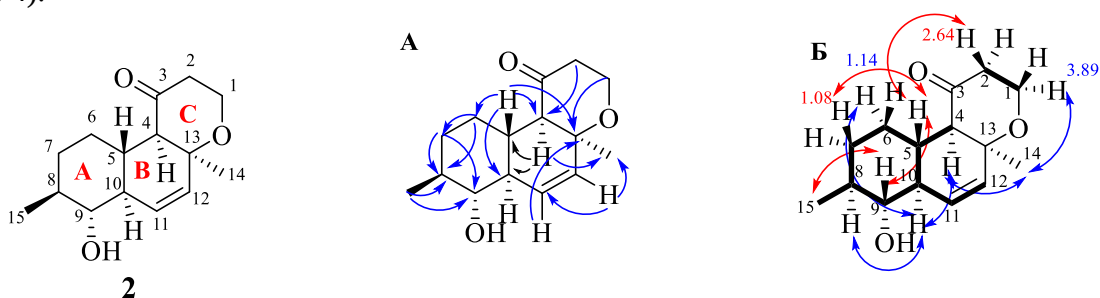


Рисунок 4 – (А) Ключевые HMBC-, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)-корреляции в спектрах зостеропениллина А (**2**)

HMBC корреляции H-1a (δ_H 4.11)/C-2 (δ_C 39.9), C-3 (δ_C 210.2) и C-13; H-2a (δ_H 2.64)/C-1 (δ_C 60.9) и C-3; H-2b (δ_H 2.21)/C-3 и C-4 свидетельствуют о наличии γ -пиронового фрагмента в соединении **2**. NOESY кросс-пики H₃-14 (δ_H 1.26)/H-4 (δ_H 2.09), H-1a (δ_H 3.89); H₃-15 (δ_H 1.03)/H-9 (δ_H 2.92); H-5/H-2 β (δ_H 2.64), H-7 β (δ_H 1.08), H-9; H-10 (δ_H 1.65)/H-6a (δ_H 1.14), H-8 (δ_H 1.41), H-4; H-9/H₃-15 и H-4/H-6a, H-10, H₃-14 позволяют установить *транс*-сочленение колец А и В, *цис*-сочленение колец В и С, α -ориентацию H₃-14 и 9-ОН групп и β -ориентацию метильной группы при C-8 (рис. 4Б). Относительные конфигурации стереогенных центров **2** подтверждены данными РСА кристалла, полученного путем кристаллизации в системе ацетонитрил – вода (рис. 5).

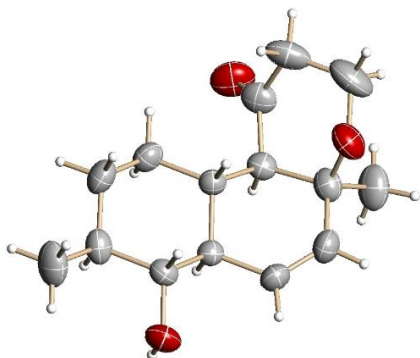


Рисунок 5 – Кристаллическая молекулярная структура **2** по данным РСА

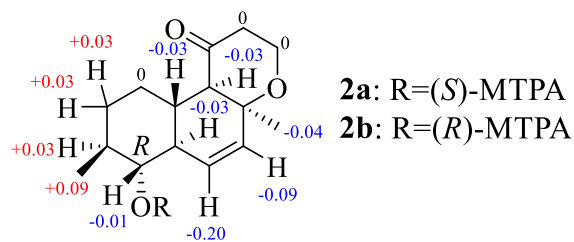


Рисунок 6 – Значения $\Delta\delta(\delta_S-\delta_R)$ (в м.д.) для S- (**2a**) и R- (**2b**) МТПА-эфиров

Абсолютная конфигурация асимметрического центра C-9 в соединении **2** установлена с помощью модифицированного метода Мошера. Этерификация гидроксильной группы при C-9 (R)- и (S)-МТПА-хлорангидридами привела к образованию (S)- и (R)-МТПА-эфиров **2a** и **2b** соответственно. Разница в значениях химических сдвигов $\Delta\delta(\delta_S-\delta_R)$ сигналов в протонных спектрах полученных эфиров указывает на 9R конфигурацию и позволяет установить стереоструктуру соединения **275** с 4R,5S,8R,9R,10R,13S абсолютными конфигурациями стереогенных центров (рис. 6). Соединение **2** названо зостеропениллином А.

Брутто-формула соединения **3** установлена как $C_{15}H_{22}O_3$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[M + Na]^+$ с m/z 273.1474) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Значения химических сдвигов сигналов атомов углерода в спектре ^{13}C ЯМР соединения **3** оказались очень близки к значениям химических сдвигов соответствующих сигналов в спектре зостеропениллина А (**2**) за исключением сигналов C-9–C-11 и C-15 углеродных атомов в кольце А. Данные 1H - 1H -COSY спектра (рис. 7Б) и НМВС корреляции H-9 β (δ_H 0.93)/C-7 (δ_C 29.1), C-8 (δ_C 40.5), C-10 (δ_C 41.4), C-11 (δ_C 134.4) и C-15 (δ_C 68.1); H₂-15 (δ_H 3.50, 3.47)/C-7, C-8 и C-9 (рис. 7А) позволяют установить структуру кольца А и присутствие гидроксиметильной группы при C-8 в **3**. NOESY кросс-пики H-4 (δ_H 2.07)/H-10 (δ_H 1.74), H₃-14 (δ_H 1.26); H-8 (δ_H 1.63)/H-9 α (δ_H 1.91), H-10; H-5 (δ_H 1.78)/H-9 β (δ_H 0.93); H-9 β /H₂-15 (δ_H 3.50, 3.47) указывают на *транс*-сочленение колец А и В, *цис*-сочленение колец В и С, а также на β -ориентацию гидроксиметильной группы при C-8 (рис. 7Б). Соединение **3** названо зостеропениллином В.

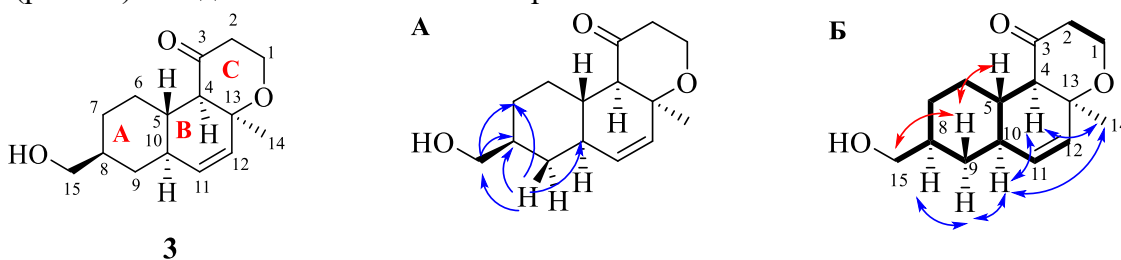
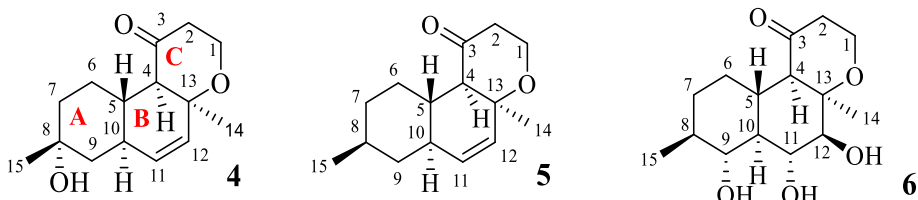


Рисунок 7 – (А) Ключевые НМВС-, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)-корреляции в спектрах зостеропениллина В (**3**)

Брутто-формула соединения **4** установлена как $C_{15}H_{22}O_3$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[M + Na]^+$ с m/z 273.1463) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Значения сигналов углеродных атомов в спектре соединения **4** оказались близки к значениям химических сдвигов соответствующих сигналов в спектре зостеропениллина В за исключением сигналов атомов C-6–C-10 и C-15 кольца А. Детальный анализ спектров 1H и ^{13}C ЯМР соединения **4** показал присутствие двух метильных (δ_H 1.26, δ_C 23.3 и δ_H 1.25, δ_C 31.5) и пяти метиленовых (δ_C 24.9, 38.7, 39.9, 44.4, 60.9) групп, включая одну связанную с кислородом (δ_H 4.11, 3.89), трех метиновых групп (δ_H 2.15, δ_C 36.9, δ_H 1.74, δ_C 38.9, δ_H 2.10, δ_C 62.7), одного карбонильного атома углерода (δ_C

210.3), дизамещенной двойной связи (δ_{H} 5.63, δ_{C} 131.1, δ_{H} 5.63, δ_{C} 134.4,) и одного sp^3 -гибридизованного четвертичного атома углерода, связанного с кислородом (δ_{C} 75.0). Данные ^1H - ^1H -COSY спектра и HMBC корреляции H-9a (δ_{H} 1.75)/C-8 (δ_{C} 69.7), C-10 (δ_{C} 36.9); H₃-15 (δ_{H} 1.25)/C-7 (δ_{C} 24.9), C-8, C-9 (δ_{C} 44.5) позволяют установить структуру соединения **4**, включая положение гидроксильной и метильной групп при C-8. Относительные конфигурации стереоцентров соединения **4** установлены на основании NOESY взаимодействий H-4 (δ_{H} 2.10)/H-10 (δ_{H} 2.15), H₃-14 (δ_{H} 1.26) и анализа вицинальных КССВ протонов ($^3J_{\text{H4-H5}} = 11.3$ Гц, $^3J_{\text{H10-H5}} = 10.2$ Гц). Соединение **4** названо зостеропениллином С.



Брутто-формула соединения **5** установлена как $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 257.1510) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Значения химических сдвигов сигналов протонов и атомов углерода в спектрах соединения **5** были близки значениям химических сдвигов соответствующих сигналов атомов в спектре зостеропениллина В (**3**) за исключением сигналов C-7–C-9 и C-15. Взаимные HMBC корреляции между метильной группой H₃-15 и метиленовыми группами при C-7 и C-9 позволяют установить структуру кольца А и положение метильной группы H₃-15 при C-8. Относительные конфигурации стереоцентров определены на основании NOESY взаимодействий H₃-14 (δ_{H} 1.25)/H-4 (δ_{H} 2.04), H-10 (δ_{H} 1.71) и вицинальной КССВ ($^3J_{\text{H4-H5}} = 11.5$ Гц). Соединение **5** названо зостеропениллином D.

Абсолютные конфигурации стереоцентров зостеропениллинов А–D (**2**–**5**) установлены на основании анализа экспериментальных и расчетных спектров ЭКД. Для этого был выполнен конформационный анализ и рассчитаны КД спектры для возможных конформаций соединений **2**–**5**. Сравнение теоретических, статистически усредненных КД спектров соединений **2**–**5** с соответствующими экспериментальными спектрами показало, что все спектры качественно подобны в области $\lambda \geq 200$ нм, где наблюдались выраженные эффекты Коттона. Таким образом, абсолютные конфигурации определены как 4R,5S,8S,10R,13S для соединения **3**; 4R,5S,8R,10R,13S для соединения **4** и 4R,5S,8S,10R,13S для соединения **5**.

Брутто-формула соединения **6** установлена как $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_5$ на основании анализа данных спектра (–)-HRESIMS (пик иона $[\text{M} - \text{H}]^-$ с m/z 283.1538) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Детальный анализ спектра ^1H - ^1H -COSY (рис. 8Б) и взаимодействий ядер ^1H и ^{13}C в спектре HMBC H-4 (δ_{H} 2.11)/C-5 (δ_{C} 38.5), C-6 (δ_{C} 29.0), C-10 (δ_{C} 53.5); H-5 (δ_{H} 1.95)/C-6, C-10; H-6a (δ_{H} 1.33)/C-4 (δ_{C} 63.7), C-7 (δ_{C} 31.8) и C-10; H-7a (δ_{H} 1.73)/C-5, C-9 (δ_{C} 77.2); H₃-15 (δ_{H} 1.06)/C-7, C-8 (δ_{C} 39.2), C-9; H-9 (δ_{H} 3.29)/C-5, C-11 (δ_{C} 67.3); H-10 (δ_{H} 1.61)/C-5, C-9, C-11; H-11 (δ_{H} 4.38)/C-12 (δ_{C} 72.7); H₃-14 (δ_{H} 1.36)/C-4, C-12, C-13 (δ_{C} 77.5) (рис. 8А) позволяет подтвердить присутствие декалиновой системы в соединении **6** и установить положение метильных групп при C-8 и C-13 и гидроксильных групп при C-9, C-11 и C-12. HMBC взаимодействия H-1a (δ_{H} 4.22)/C-2 (δ_{C} 37.9), C-3 (δ_{C} 206.0) и C-13; H-2a (δ_{H} 2.67)/C-1 (δ_{C} 60.9), C-3; H-4 (δ_{H} 2.11)/C-2 и C-3 позволяют установить наличие насыщенного γ -пиронового фрагмента в соединении **6** (рис. 8А). Относительные конфигурации стереоцентров соединения **6** определены на основании данных NOESY спектра (рис. 9) и значений КССВ. Наблюдаемые NOESY корреляции и значения вицинальных КССВ ($^3J_{\text{H4-H5}} = 11.7$ Гц; $^3J_{\text{H10-H5}} = 10.8$ Гц; $^3J_{\text{H9-H10}} = 9.0$ Гц; $^3J_{\text{H10-H11}} = 10.5$ Гц; $^3J_{\text{H11-H12}} = 10.5$ Гц) позволяют установить *транс*-сочленение колец А и В, *цис*-сочленение колец В и С, α -ориентацию H₃-14, 9-ОН, 11-ОН групп и β -ориентацию H₃-15 и 12-ОН групп. Соединение **6** названо зостеропениллином Е.

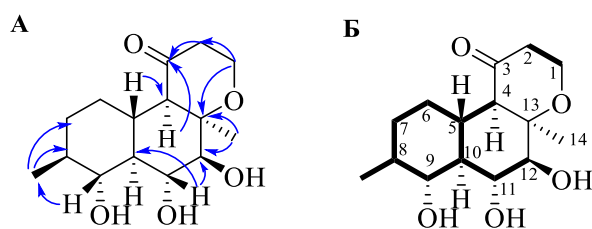


Рисунок 8 – (А) Ключевые HMBC-, (Б) COSY (жирные линии)-корреляции в спектрах зостеропениллина Е (6)

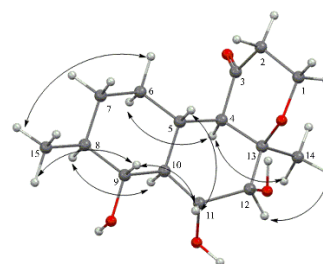


Рисунок 9 – Энергетически минимизированная 3D модель соединения 6 с ключевыми NOESY корреляциями

Брутто-формула соединения 7 установлена как $C_{15}H_{24}O_4$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[M + Na]^+$ с m/z 291.1579) и подтверждена анализом спектра ^{13}C ЯМР. Значения химических сдвигов сигналов атомов в спектре ^{13}C ЯМР соединения 7 были близки к значениям химических сдвигов соответствующих сигналов в спектре зостеропениллина А (1) за исключением сигналов C-1–C-3 и C-13–C-14. Структура декалинового скелета и положение метильных групп при C-8 и C-13 и кислородных функций при C-9 и C-13 были установлены на основании 1H - 1H -COSY и HMBC корреляций так же, как для зостеропениллина А (2). Данные 1H - 1H -COSY спектра и HMBC корреляции H_2 -1 (δ_H 3.91)/C-2 (δ_C 48.6) и C-3 (δ_C 217.6); H_2 -2 (δ_H 2.86, 2.76)/C-1 (δ_C 57.6) и C-3; H-4 (δ_H 2.59)/C-3 указывают на присутствие 1-гидрокси-3-оксопропильной боковой цепи при C-4 (рис. 10). Относительные конфигурации хиральных центров соединения 7 были установлены на основании данных эксперимента NOESY (рис. 10Б) и анализа КССВ ($^3J_{H4-H5} = 11.4$ Гц; $^3J_{H5-H10} = 10.3$ Гц; $^3J_{H9-H10} = 10.0$ Гц. Соединение 7 названо зостеропениллином F.

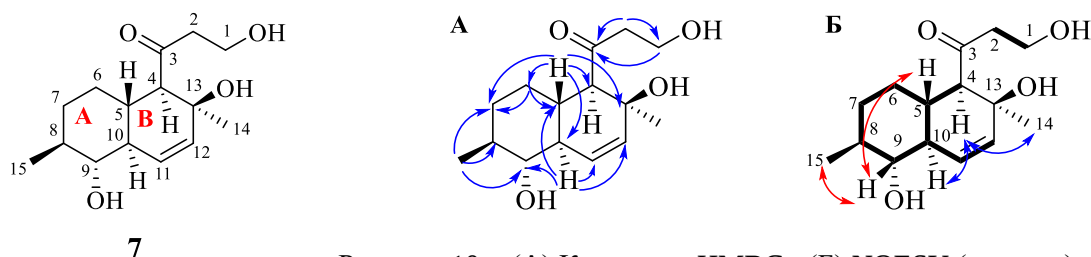


Рисунок 10 – (А) Ключевые HMBC-, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY-корреляции (жирные линии) в спектрах зостеропениллина F (7)

Брутто-формула соединения 8 установлена как $C_{15}H_{24}O_3$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[M + Na]^+$ с m/z 275.1621) и подтверждена анализом спектра ^{13}C ЯМР. Химические сдвиги сигналов атомов в спектре ^{13}C ЯМР соединения 8 оказались близки к химическим сдвигам соответствующих сигналов атомов в спектре зостеропениллина D (5) за исключением сигналов C-1–C-3 и C-13–C-14. Структура декалинового ядра, положение метильных групп при C-8 и C-13, кислородной функции при C-13 и 1-гидрокси-3-оксопропильной боковой цепи при C-4 установлены на основании HMBC и 1H - 1H -COSY корреляций как и для зостеропениллина F (рис. 11).

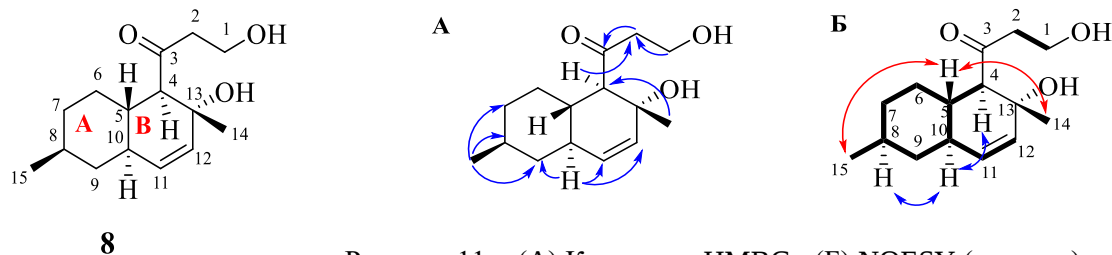


Рисунок 11 – (А) Ключевые HMBC-, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)-корреляции в спектрах зостеропениллина G (8)

Относительные конфигурации стереоцентров соединения 8 установлены на основании корреляций H-4 (δ_H 2.89)/H-10 (δ_H 1.84); H-10/H-8 (δ_H 1.46) и H-5 (δ_H 1.48)/H-14

(δ_{H} 1.20) и H₃-15 (δ_{H} 0.89) в спектре NOESY соединения **8**, снятом в CDCl₃, и NOESY взаимодействия 13-OH (δ_{H} 4.95)/H-4 в спектре, снятом в DMSO-d₆ (рис. 11Б). Соединение **8** названо зостеропениллином G.

Брутто-формула соединения **9** установлена как C₁₅H₂₄O₄ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона [M + Na]⁺ с m/z 291.1571) и подтверждена данными спектра ¹³C ЯМР. Анализ спектра ¹H и ¹³C ЯМР соединения **9** (DEPT, HSQC) показал присутствие двух метильных (δ_{H} 1.60, δ_{C} 20.9, δ_{H} 1.02, δ_{C} 17.8) и четырех метиленовых (δ_{C} 30.5, 31.9, 43.6, 57.9) групп, включая одну, связанную с кислородом (δ_{H} 3.85 (2H)), семи метиновых (δ_{H} 1.69, δ_{C} 37.9; δ_{H} 1.47, δ_{C} 39.2; δ_{H} 1.28, δ_{C} 49.6; δ_{H} 2.92, δ_{C} 61.7; δ_{H} 3.25, δ_{C} 82.3; δ_{H} 4.32, δ_{C} 73.2; δ_{H} 5.53, δ_{C} 129.0) групп, одного карбонильного углеродного атома (δ_{C} 214.0) и одного sp^3 -гибридизованного четвертичного атома углерода (δ_{C} 131.5). Структуры тетразамещенного циклогексанового кольца A и боковой цепи в соединении **9** установлены так же, как и для зостеропениллинов E (**6**) и F (**7**). HMBC корреляции H-4 (δ_{H} 2.92)/C-5 (δ_{C} 37.9), C-12 (δ_{C} 129.0), C-13 (δ_{C} 131.5), H-10 (δ_{H} 1.28)/C-5, C-11 (δ_{C} 73.2), C-12, H-11 (δ_{H} 4.32)/C-12, C-13, H₃-14 (δ_{H} 1.60)/C-4 (δ_{C} 61.7), C-12 и C-13 позволяют установить структуру кольца B, Δ^{12} положение двойной связи и локализацию гидроксильной группы при C-11 (рис. 12А). Относительные конфигурации стереоцентров соединения **9** предложены на основании NOESY корреляций H-4/H-10; H-5 (δ_{H} 1.69)/H-9 (δ_{H} 3.25), H-11, H₃-15 (δ_{H} 1.02); H-8 (δ_{H} 1.47)/H-10; H-9/H-11 (рис. 12Б) и значений КССВ ($^3J_{\text{H}9-\text{H}10}$ = 9.3 Гц; $^3J_{\text{H}10-\text{H}11}$ = 9.1 Гц). Соединение **9** названо зостеропениллином H.

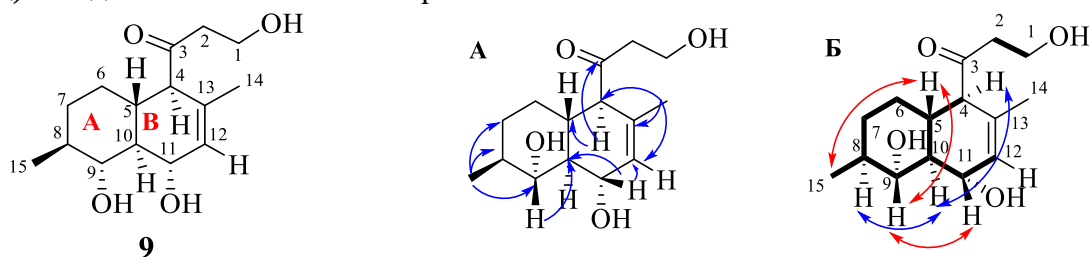


Рисунок 12 – (А) Ключевые HMBC-, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)-корреляции в спектрах зостеропениллина H (**9**)

Брутто-формула соединения **10** установлена как C₁₅H₂₂O₃ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона [M + Na]⁺ с m/z 273.1462) и подтверждена данными спектра ¹³C ЯМР. Структуры кольца A и боковой цепи установлены так же, как и для зостеропениллинов E (**6**) и F (**7**). Наблюдаемые ¹H-¹H-COSY взаимодействия H-4 (δ_{H} 3.15)/H₂-14 (δ_{H} 4.99, 4.59), H-12 (δ_{H} 6.20)/H-14b и HMBC корреляции H-4 (δ_{H} 3.15)/C-13 (δ_{C} 140.8), C-14 (δ_{C} 112.8), H-9 (δ_{H} 2.89) и H-10 (δ_{H} 1.85)/C-11 (δ_{C} 130.6) и H₂-14 (δ_{H} 4.99, 4.59)/C-4 (δ_{C} 59.6), C-12 (δ_{C} 129.3), C-13 указывают на присутствие $\Delta^{11}(12)$, 13(14) диеновой системы в структуре соединения **10**. Относительные конфигурации хиральных центров соединения **10** предложены на основании NOESY взаимодействий H-4/H-10; H-8 (δ_{H} 1.43)/H-10 и H-5 (δ_{H} 1.68)/H-9, H₃-15 (δ_{H} 1.05) (рис. 13Б). Соединение **10** названо зостеропениллином I.

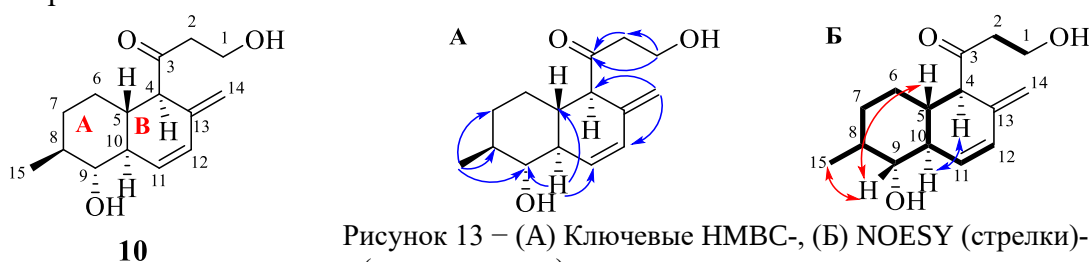


Рисунок 13 – (А) Ключевые HMBC-, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)- корреляции в спектрах зостеропениллина I (**10**)

Брутто-формула соединения **11** установлена как C₁₅H₂₄O₄ на основании данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона [M + Na]⁺ с m/z 291.1573) и подтверждена данными спектра ¹³C ЯМР. Химические сдвиги сигналов атомов углерода в спектре соединения **11** практически совпадали с химическими сдвигами соответствующих сигналов в спектре

зостеропениллина **8** за исключением сигналов атомов C-7–C-9 и C-15. Эти данные и разница в 16 массовых единиц в масс-спектрах соединений **8** и **11** позволяют установить присутствие гидроксиметильной группы при C-8 в соединении **11** вместо метильной группы в соединении **8**. NOESY взаимодействия H-4 (δ_{H} 2.92)/H-6b (δ_{H} 0.95), H-10 (δ_{H} 1.87); H-5 (δ_{H} 1.52)/H-7b (δ_{H} 1.02), H-9b (δ_{H} 0.82), H₃-14 (δ_{H} 1.20); H-7b/H-9b, H₂-15 (δ_{H} 3.47, 3.45); H-8 (δ_{H} 1.61)/H-6b, H-10 указывают на *транс*-сочленение колец А и В, β -ориентацию боковой цепи, метильной и гидроксиметильной групп при C-13 и C-8 соответственно (рис. 14Б). Соединение **11** названо зостеропениллином J.

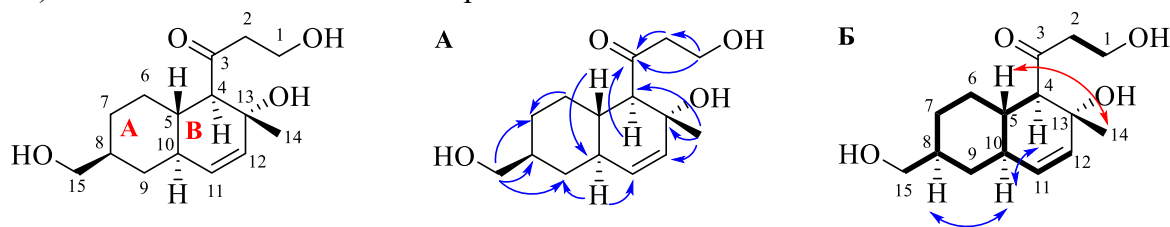


Рисунок 14 – (А) Ключевые HMBC, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)-корреляции в спектрах зостеропениллина J (**11**)

Брутто-формула соединения **12** установлена как C₁₅H₂₂O₅ на основании данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона [M + Na]⁺ с m/z 305.1370) и подтверждена данными спектра ¹³C ЯМР. В УФ спектре соединения **12** наблюдается полоса поглощения при 242 нм, соответствующая еновой системе. Данные ¹H-¹H COSY спектра и HMBC корреляции H-9a (δ_{H} 2.60)/C-7 (δ_{C} 27.9), C-8 (δ_{C} 41.1) и C-15 (δ_{C} 67.4), H-9b (δ_{H} 2.01)/C-10 (δ_{C} 166.3), H₂-15 (δ_{H} 3.58, 3.54)/C-7, C-8 и C-9 позволяют установить структуру кольца А (рис. 15). HMBC корреляции H-4 (δ_{H} 3.01)/C-5 (δ_{C} 39.4), C-10, C-12 (δ_{C} 200.3) и C-13 (δ_{C} 74.2), H-11 (δ_{H} 5.90)/C-5 и C-13 а также H₃-14 (δ_{H} 1.19)/C-4 (δ_{C} 61.6), C-12, C-13 позволяют установить структуру кольца В и указывают на присутствие 10-ен-12-онового хромофора в соединении **12**. Структура 1-гидрокси-3-оксипропильной боковой цепи в соединении **12** была установлена на основании данных ЯМР как для зостеропениллина F (**7**). Наблюдаемые NOESY взаимодействия H-5 (δ_{H} 2.89)/H-9b (δ_{H} 2.01), H₃-14; H₂-15/H-9b указывают на β -положение этих протонов. Кроме того, данные NOESY (рис. 15Б) и значение КССВ (³J_{H4-H5} = 9.8 Hz) указывают на α -положение H-4 и 13-ОН. Соединение **12** названо зостеропениллином К.

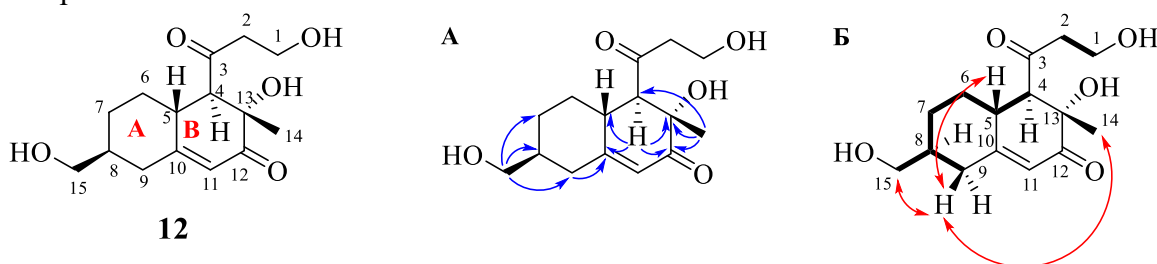
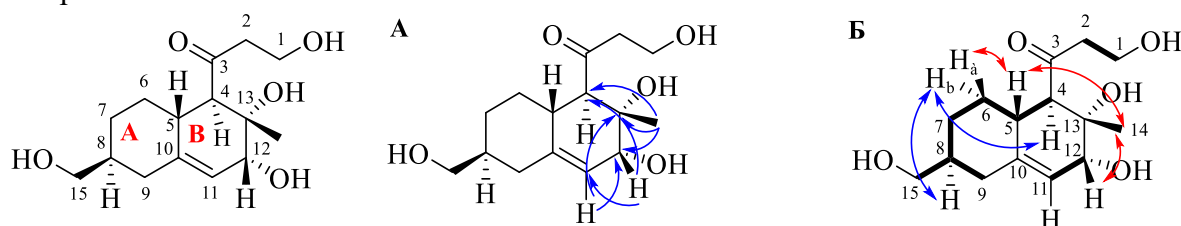


Рисунок 15 – (А) Ключевые HMBC (стрелки)-, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)-корреляции в спектре зостеропениллина К (**12**)

Брутто-формула соединения **13** установлена как C₁₅H₂₄O₅ на основании (+)-HRESIMS (пик иона [M + Na]⁺ с m/z 307.1501) и подтверждена данными спектра ¹³C ЯМР. Структура кольца А в соединении **13** установлена идентичной таковой в молекуле зостеропениллина К (**12**) на основании COSY и HMBC корреляций. HMBC корреляции H-11 (δ_{H} 5.60)/C-5 (δ_{C} 40.3), C-9 (δ_{C} 37.2), C-12 (δ_{C} 68.0), C-13 (δ_{C} 72.4), H-12 (δ_{H} 4.36)/C-4 (δ_{C} 57.7), C-10 (δ_{C} 144.5), C-11 (δ_{C} 118.8), C-13, H₃-14 (δ_{H} 1.20)/C-4, C-12, C-13 позволяют установить структуру кольца В, положение кислородных функций при C-12, C-13 и метильной группы при C-13 в **13** (рис. 16А). Относительная конфигурация стереогенных центров **13** установлена на основании NOESY взаимодействий H-5/H₃-14, H-6a; H₃-14/H-12;

H-4/H-6b; H-6b/H-8 и значения КССВ $^3J_{\text{H4-H5}} = 10.0$ Гц. Соединение **13** названо зостеропениллином L.



13

Рисунок 16 – (А) Ключевые HMBC (стрелки)-, (Б) NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)-корреляции в спектрах зостеропениллина L (**13**)

Предполагаемый путь биосинтеза зостеропениллинов А-Л и паллидопениллина А

Известно, что подобные поликетиды декалинового типа образуются за счет внутримолекулярной циклизации при помощи реакции Дильса-Альдера. Конденсация ацетатных звеньев (из ацетата и малоната) может производить гептакетид (**i-5**), который подвергается эндоселективному циклоприсоединению Дильса-Альдера с образованием декалиновых производных **i-5a** и **i-5b** (интермедиат – **i**), что было доказано на примере биосинтеза ловастатина. Как видно из предполагаемой схемы биосинтеза (рис. 17) промежуточные соединения **i-5a** и **i-5b** являются эписомерами по стереоцентру при C-13. При β -положении гидроксильной группы при C-13 (**i-6b**) становится возможным образование тетрагидропиранового кольца C и, соответственно, зостеропениллинов В-D (**3-5**) и минорного промежуточного метаболита зостеропениллина F (**7**) с дальнейшим его превращением в зостеропениллин А (**2**). Соединение **2**, предположительно, подвергается окислению монооксигеназой с образованием эпоксида **i-7b** при C-11–C-12. Гидролиз этого эпоксида при помощи эпоксидгидролазы приводит к образованию минорного зостеропениллина Е (**6**) с *транс*-конфигурацией гидроксильных групп при C-11 и C-12. При α -положении гидроксильной группы при C-13 (**i-5a**) возможно образование зостеропениллина J (**11**) и зостеропениллина G (**8**). Из **8** под действием дегидратазы возможно образование зостеропениллина I (**10**), а окисление **8** при помощи оксигеназы приводит к паллидопениллину А (**1**), который в свою очередь окисляется диоксигеназой до образования промежуточного пероксида **i-6a** при C-11–C-12. Восстановление **i-6a** идет при помощи пероксидгидролазы с образованием промежуточного **i-7a** с *цис*-конфигурацией гидроксильных групп при C-11 и C-12. Дальнейшие реакции окисления приводят к образованию зостеропениллина H (**9**) и зостеропениллина L (**13**) с гидроксильной группой при C-12, который в свою очередь окисляется до зостеропениллина K (**12**) с кето-группой в положении C-12. Следует отметить, что паллидопениллин А (**1**) был также параллельно выделен нами из другого штамма гриба *Penicillium thomii* (KMM 4675, бурая водоросль *Sargassum pallidum*). Соединение **1** было представлено как новое соединение совместно с другими родственными метаболитами этого гриба, а позднее как известное соединение совместно с описанными в этой главе зостеропениллинами из гриба *P. thomii* KMM 4674 (*Z. marina*).

3 Установление строения индивидуального соединения из гриба *Penicillium thomii* KMM 4679

Гриб *Penicillium thomii* KMM 4679 был выделен из поверхностной микобиоты ризомы морской травы *Zostera marina* (залив Восток, Японское море). Из этилацетатного экстракта *P. thomii* выделен новый поликетид декалинового типа зостеропениллин М (**14**).

Брутто-формула соединения **14** установлена как $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_5$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 275.1616) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Анализ данных ^1H и ^{13}C ЯМР соединения **14** при помощи экспериментов DEPT и HSQC показал присутствие двух метильных (δ_{H} 0.92, δ_{C} 22.5 и δ_{H} 1.59, δ_{C} 21.2) и

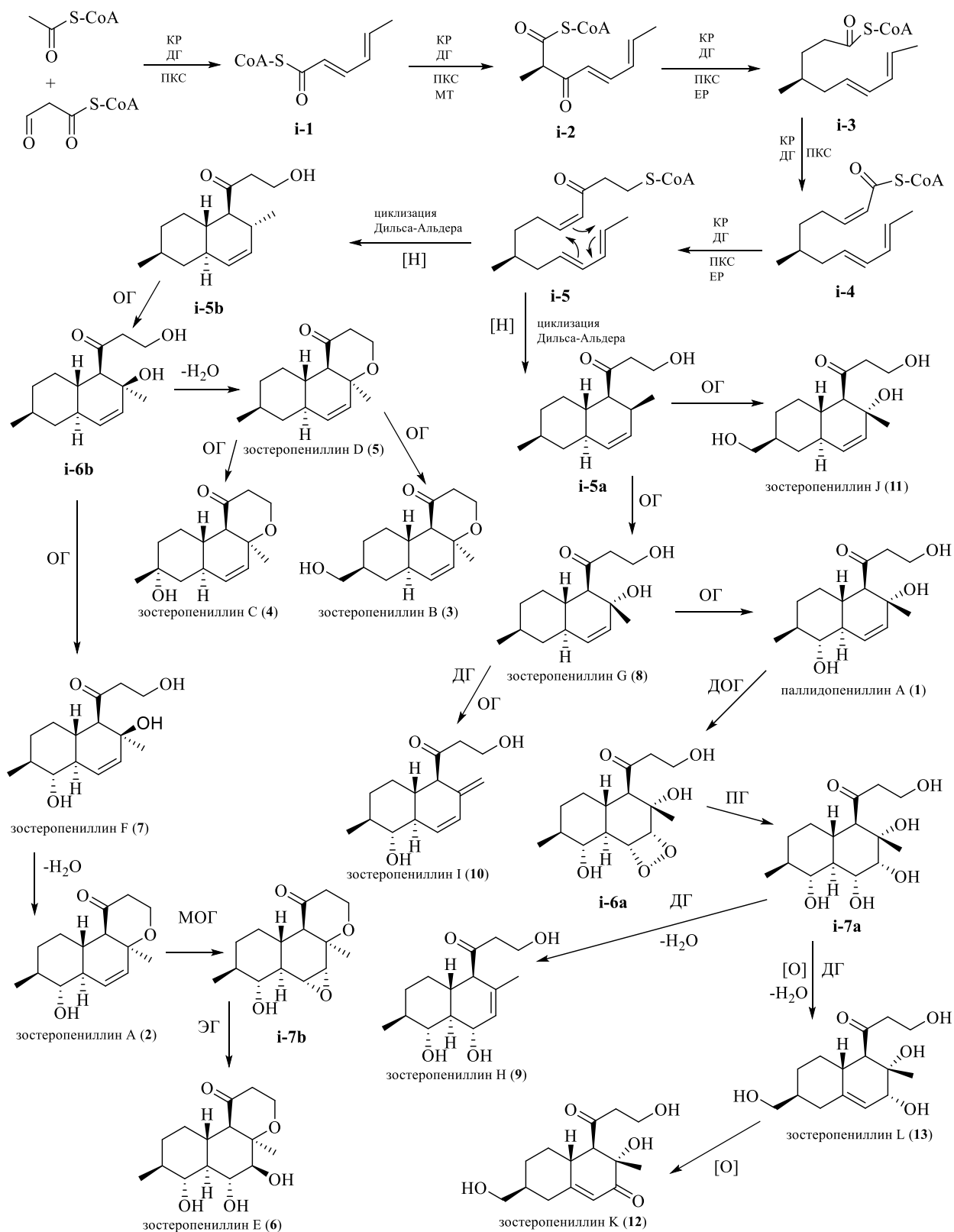
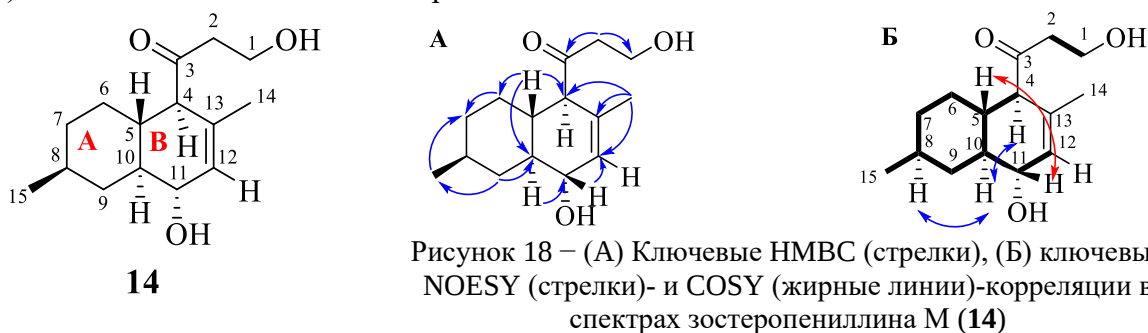


Рисунок 17 – Предполагаемая схема биосинтеза зоостеропениллинов А-Л (1–12) и паллидопениллина А (13). КР – кеторедуктаза, ДГ – дегидратаза, ПКС – поликетидсинтаза, МТ – метилтрансфераза, ЕР – еноилредуктаза, ОГ – оксигеназа, ДОГ – диоксигеназа, МОГ – монооксигеназа, ЭГ – эпоксидгидролаза, ПГ – пероксидгидролаза

пяти метиленовых (δ_{H} 1.65, 1.13, δ_{C} 31.4; δ_{H} 1.69, 0.89, δ_{C} 34.3; δ_{H} 2.21, 0.70, δ_{C} 38.5; δ_{H} 2.70, 2.63, δ_{C} 43.1) групп, включая одну связанную с кислородной функцией (δ_{H} 3.85, 3.84, δ_{C} 57.8), пяти метиновых (δ_{H} 1.40, δ_{C} 31.7; δ_{H} 1.52, δ_{C} 38.8; δ_{H} 1.16, δ_{C} 45.4; δ_{H} 2.83, δ_{C} 62.2)

групп, включая одну связанную с кислородом (δ_{H} 3.88, δ_{C} 72.6), одного карбонильного атома углерода (δ_{C} 214.6) и одной тризамещенной двойной связи (δ_{H} 5.58, δ_{C} 129.8; δ_{C} 131.5). Данные ^1H - ^1H -COSY спектра и HMBC корреляции H-4 (δ_{H} 2.83)/C-5 (δ_{C} 38.8); H-5 (δ_{H} 1.52)/C-4 (δ_{C} 62.2), C-6 (δ_{C} 31.4), C-10 (δ_{C} 45.3); H₂-6 (δ_{H} 1.65, 1.13)/C-5, C-7 (δ_{C} 34.3), C-8 (δ_{C} 31.7), C-10 (δ_{C} 45.3); H₂-7 (δ_{H} 1.69, 0.89)/C-6, C-9 (δ_{C} 38.5), C-15 (δ_{C} 22.5); H-8 (δ_{H} 1.40)/C-6, C-7, C-9, C-15; H₃-15 (δ_{H} 0.92)/C-7, C-8, C-9; H₂-9 (δ_{H} 2.21, 0.70)/C-5, C-7, C-8, C-10, C-11 (δ_{C} 72.6), C-15; H-10 (δ_{H} 1.16)/C-11; H-11 (δ_{H} 3.88)/C-12 (δ_{C} 129.8), C-13 (δ_{C} 131.5); H-12 (δ_{H} 5.58)/C-4, C-10, C-14 (δ_{C} 21.2), H₃-14 (δ_{H} 1.59)/C-4, C-12, C-13 (рис. 18) указывают на присутствие декалиновой системы в структуре молекулы, а также на положение Δ^{12} двойной связи и метильных групп при C-8 и C-13 в соединении **14**. HMBC корреляции H₂-1/C-2 (δ_{C} 43.2), C-3 (δ_{C} 214.6); H₂-2/C-1 (δ_{C} 57.8), C-3; H-4/C-2 указывают на присутствие 1-гидрокси-3-оксипропильного заместителя в боковой цепи при C-4. NOESY кросс-пики H-4 (δ_{H} 2.83)/H-10 (δ_{H} 1.16); H-5 (δ_{H} 1.52)/H-11 (δ_{H} 3.88), H₃-15 (δ_{H} 0.92); H-8 (δ_{H} 1.40)/H-10 и значения вицинальных КССВ ($^3J_{\text{H5-H4}} = 11.5$ Гц) позволяют установить *транс*-сочленение колец А и В, α -ориентацию 11-ОН группы и β -ориентацию метильной группы при C-8 (рис. 18Б). Соединение **14** названо зостеропениллином М.



4 Установление строения индивидуальных соединений из гриба *Penicillium thomii* КММ 4667

Гриб *Penicillium thomii* КММ 4667 был выделен с поверхности ризомы морской травы *Zostera marina* (залив Восток, Японское море).

Из этилацетаного экстракта *P. thomii* выделены новые сесквитерпены эудесманового типа – томимарины А-Е (**15–19**), а также известные сесквитерпены гваянового типа – 4,10,11-тригидроксигваян (**20**) и гваядиол А (**21**), пренилированный индольный алкалоид VM55599, N-ацетилфенилalaniнол и эргост-6,8,22-триен-3 β -ол.

Брутто-формула соединения **15** установлена как C₁₅H₂₄O₃ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона [M + Na]⁺ с *m/z* 275.1623) и подтверждена данными спектра ¹³C ЯМР. Анализ спектров ¹H и ¹³C ЯМР соединения **15** показал присутствие трех метильных (δ_{H} 0.93, δ_{C} 17.6; δ_{H} 1.27, δ_{C} 23.6 и δ_{H} 1.93, δ_{C} 21.9) и пяти метиленовых (δ_{H} 2.26, 2.22, δ_{C} 54.8; δ_{H} 2.21, 1.47, δ_{C} 22.9; δ_{H} 1.73, 1.73, δ_{C} 20.7; δ_{H} 1.70, 1.37, δ_{C} 37.0) групп, включая одну связанную с кислородной функцией (δ_{H} 3.67, 3.46, δ_{C} 69.0), двух метиновых (δ_{H} 2.84, δ_{C} 43.3 и δ_{H} 1.87, δ_{C} 37.6) групп, одного карбонильного атома углерода (δ_{C} 199.4), тризамещенной двойной связи (δ_{C} 163.9; δ_{H} 5.86, δ_{C} 126.6) и одного *sp*³-гибридизованного четвертичного атома углерода связанного с кислородом (δ_{C} 75.9). Химические сдвиги сигналов атомов в спектре ¹³C ЯМР соединения **15** характерные для кольца А, оказались очень близки к химическим сдвигам соответствующих атомов в спектре оксифиланена А, выделенного из плодов тропического растения *Alpinia oxyphylla*. Эти данные и HMBC корреляции H₃-14 (δ_{H} 0.93)/C-1 (δ_{C} 54.8), C-5 (δ_{C} 43.3), C-10 (δ_{C} 36.9); H₃-15 (δ_{H} 1.93)/C-3 (δ_{C} 126.6), C-4 (δ_{C} 163.9), C-5 (δ_{C} 43.3) и H₂-1/C-2 (δ_{C} 199.4), C-3 и C-5 (рис. 19А) указывают на присутствие циклогекс-2-енольной системы в соединении **15**, а также на положение метильных групп при C-4 и C-10. Данные COSY спектра и HMBC взаимодействия H₃-14/C-9 (δ_{C} 37.0); H₂-6/C-5, C-7 (δ_{C} 37.6), C-8 (δ_{C} 20.7) и H-7 (δ_{H} 1.87)/C-5, C-9 устанавливают структуру кольца В в соединении **15** (рис. 19). HMBC корреляции H-7/C-11 (δ_{C} 75.9), C-12

(δ_{C} 69.0) и C-13 (δ_{C} 23.6); H₃-13/C-7, C-11 и C-12; H₂-12 (δ_{H} 3.46, 3.67)/C-7, C-11 и C-13 указывают на наличие 1,2-дигидроксиизопропильного заместителя при C-7 в соединении **15**. Наблюдаемые NOESY корреляции H₃-14 (δ_{H} 0.93)/H-5 (δ_{H} 2.84), H-7 (δ_{H} 1.87) (рис. 19Б) указывают на положение этих протонов по одну сторону молекулы и *цис*-сочленение колец А и В. Соединение **15** названо томимарином А.

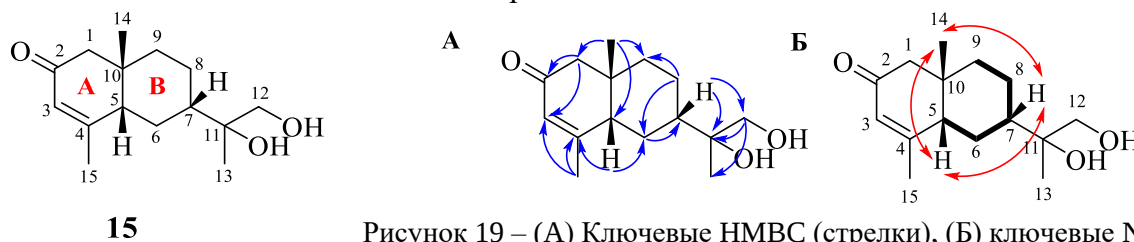
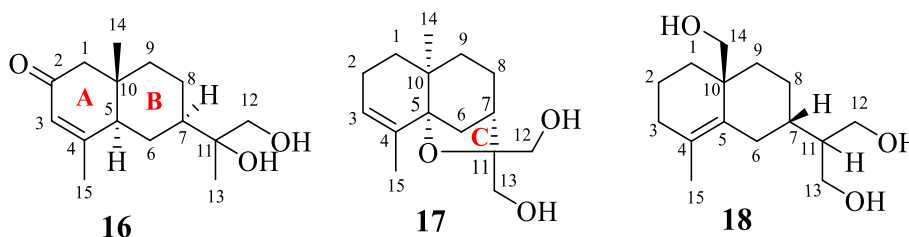


Рисунок 19 – (А) Ключевые HMBC (стрелки), (Б) ключевые NOESY (стрелки)- и COSY (жирные линии)-корреляции в спектрах томимарина А (**15**)

Брутто-формула соединения **16** установлена как C₁₅H₂₄O₃ на основании анализа данных спектра (+)-HRAPPIMS (пик иона [M + H]⁺ с m/z 253.1816) и подтверждена данными спектра ¹³C ЯМР. Химические сдвиги сигналов в спектрах ¹H и ¹³C ЯМР соединения **16** оказались очень близки к химическим сдвигам соответствующих сигналов в спектрах томимарина А (**15**) за исключением сигналов H-5, C-5, C-7 и C-9 в кольце В. Данные ¹H-¹H-COSY спектра и HMBC корреляции позволяют установить структуру колец А и В и присутствие 1,2-дигидроксиизопропильного заместителя при C-7 в соединении **16**. NOESY кросс-пики H₃-14/H-1 β (δ_{H} 2.27), H-6 β (δ_{H} 1.15), H-9 β (δ_{H} 1.62); H-5/H-1 α (δ_{H} 2.19), H-6 α (δ_{H} 1.95), H-7 (δ_{H} 1.68), H-9 α (δ_{H} 1.41) и H-7/H-9 α позволяют установить *транс*-сочленение колец А и В, а также β -ориентацию метильной группы при C-10 и α -ориентацию H-5 и H-7. Соединение **16** названо томимарином В.

Абсолютные конфигурации стереоцентров в соединениях **15** и **16** установлены с помощью сравнения экспериментальных и теоретических спектров ЭКД, рассчитанных на основе нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT). Было показано, что расчетные (5S,7S,10S,11S и 5S,7S,10S,11R для **15**, 5R,7S,10S,11R и 5R,7S,10S,11S для **16**) и экспериментальные спектры качественно подобны в области $\lambda \leq 280$ нм, где наблюдались выраженные эффекты Коттона. Исходя из полученных данных, однозначно определить конфигурацию стереоцентра C-11 не удалось. Таким образом, абсолютные конфигурации стереоцентров для **15** установлены как 5S,7S,10S, для соединения **16** установлены как 5R,7S,10S.



Брутто-формула соединения **17** установлена как C₁₅H₂₄O₃ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона [M + Na]⁺ с m/z 275.1621) и подтверждена данными спектра ¹³C ЯМР. Химические сдвиги сигналов спектра ¹³C ЯМР **17** оказались очень близки к химическим сдвигам соответствующих сигналов в спектре известного α -агарофурана за исключением сигналов C-3, C-4, C-7, C-11 и C-13 атомов. HMBC корреляции H₂-12 (δ_{H} 4.05, 3.95)/C-7 (δ_{C} 38.7), C-11 (δ_{C} 84.0) и C-13 (δ_{C} 66.0), H₂-13 (δ_{H} 3.69, 3.65)/C-7, C-11 и C-12 (δ_{C} 63.1) указывают на присутствие кислородной функции и двух метиленовых групп при C-11 в соединении **17**. Эти данные хорошо согласуются с разницей в 32 атомные единицы массы между значениями молекулярных масс соединения **17** и α -агарофурана. Строение **17** было также подтверждено путем получения его производного – диацетата соединения **17**, структура которого была подтверждена данными спектра (+)-HRESIMS (пик иона [M + Na]⁺ с m/z 359.1824) и данными спектра ¹³C ЯМР. Абсолютные конфигурации асимметрических

центров соединения **17** также были установлены с помощью ЭКД (TD-DFT). Сравнение теоретического ЭКД спектра стереоизомера 5S,7S,10S с экспериментальным показало, что оба спектра качественно подобны в области $195 \leq \lambda \leq 240$ нм, где наблюдались две характерные полосы, указывающие на положительный и отрицательный эффекты Коттона при 201 нм и 223 нм соответственно. Таким образом, конфигурация стереоцентров соединения **17** установлена как 5S,7S,10S. Соединение **17** названо томимарином С.

Брутто-формула соединения **18** установлена как $C_{15}H_{26}O_3$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[M + Na]^+$ с m/z 277.1780) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Анализ 1H и ^{13}C ЯМР спектральных данных соединения **18** показал присутствие одной метильной (δ_H 1.57, δ_C 19.5) и двух метиновых (δ_H 1.37, δ_C 40.9 и δ_H 1.70, δ_C 31.9) групп, девяти метиленовых (δ_H 0.91, 1.82, δ_C 32.9; δ_H 1.42, 1.53, δ_C 18.2; δ_H 1.82, 1.94, δ_C 32.5; δ_H 1.85, 2.49, δ_C 27.9; δ_H 1.47, 1.60, δ_C 23.2; δ_H 0.98, 1.66, δ_C 30.3) групп, включая три связанные с кислородной функцией (δ_H 3.55, 3.37, δ_C 59.2; δ_H 3.59, 3.41, δ_C 59.9; δ_H 3.55, 3.22, δ_C 61.9), тетразамещенной двойной связи (δ_C 130.6, δ_C 127.4) и одного sp^3 -гибризованного четвертичного атома углерода (δ_C 39.4). Спектры 1H - 1H -COSY и HSQC соединения **18** позволяют выявить спиновую систему ($-CH_2(1)-CH_2(2)-CH_2(3)-$) в кольце А. Эти данные и HMBC корреляции H-1a/C-5 (δ_C 130.6); H-1b/C-2 (δ_C 18.2), C-3 (δ_C 32.5), C-10 (δ_C 39.4), C-14 (δ_C 61.9); H₂-2/C-3; H-14b/C-5, C-10; H₃-15/C-2, C-3, C-4 (δ_C 127.4), C-5, C-10 указывают на присутствие циклогексенового кольца в **18** и позволяют установить положение метильной (δ_H 1.57) и гидроксиметильной (δ_C 61.9) групп при C-4 и C-10 соответственно. Корреляции, наблюдаемые в 1H - 1H -COSY спектре, и дальние взаимодействия HMBC H-6a/C-4, C-5, C-7 (δ_C 31.9), C-8 (δ_C 23.2); H-8a/C-7; H₂-9/C-5, C-7, C-8, C-10, C-14 позволяют установить структуру кольца В в соединении **18**. 1H - 1H -COSY кросс-пики ОН-12 (δ_H 4.14, t , $J = 5.0$ Гц)/H₂-12 (δ_H 3.55, 3.37); ОН-13 (δ_H 4.19, t , $J = 5.0$ Гц)/H₂-13 (δ_H 3.59, 3.41); H-11/H₂-12, H₂-13, H-7 и HMBC корреляции ОН-12/C-12 (δ_C 59.2), ОН-13 (δ_H 4.19)/C-13 (δ_C 59.9), H-12b (δ_H 3.22)/C-7, C-11 (δ_C 40.9) и C-13, H-13b (δ_H 3.41)/C-7, C-11 и C-12, H-8/C-11 свидетельствуют о наличии 1,3-дигидроксиизопропильного заместителя при C-7 в соединении **18**. Абсолютные конфигурации асимметрических центров соединения **18** установлены с помощью ЭКД. Сравнение статистически усредненного расчетного ЭКД спектра 7S,10S стереоизомера с экспериментальным ЭКД показало, что оба спектра качественно подобны, таким образом, абсолютные стереоконфигурации **18** установлены как 7S,10S. Соединение **18** было названо томимарином D.

Брутто-формула соединения **19** установлена как $C_{15}H_{24}O_2$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[M + Na]^+$ с m/z 259.1669) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Детальный анализ 1H и ^{13}C ЯМР спектральных данных соединения **19** показал присутствие трех метильных (δ_H 0.93, δ_C 16.6, δ_H 1.04, δ_C 15.5 и δ_H 1.90, δ_C 21.8) и пяти метиленовых (δ_H 2.19, 2.25, δ_C 54.8; δ_H 1.47, 1.99, δ_C 24.7; δ_H 1.68 (2H), δ_C 22.6; δ_H 1.31, 1.54, δ_C 35.4) групп, включая одну связанную с кислородной функцией (δ_H 3.74, 3.52, δ_C 66.6), трех метиновых групп (δ_H 2.43, δ_C 42.5; δ_H 1.70, δ_C 35.0 и δ_H 1.91, δ_C 33.1), одного карбонильного атома углерода (δ_C 199.0), тризамещенной двойной связи (δ_C 163.9; δ_H 5.89, δ_C 127.2) и одного sp^3 -гибризованного четвертичного атома углерода (δ_C 37.8). Присутствие циклогексен-2-оновой системы в **19** и положение метильных групп при C-4 и C-10 было доказано на основании HMBC корреляции H₃-14/C-1 (δ_C 54.8), C-5 (δ_C 42.5), C-10 (δ_C 37.8); H₃-15/C-3 (δ_C 127.2), C-4 (δ_C 163.5), C-5 (δ_C 42.5) и H₂-1/C-2 (δ_C 199.0), C-3 и C-5 (рис. 20А) также как и для томимарина А. Данные COSY спектра (рис. 20Б) и HMBC корреляции H₃-14/C-9 (δ_C 35.4); H₂-6/C-5, C-7 (δ_C 35.0), C-8 (δ_C 22.6) и C-10, H-6b (δ_H 1.47)/C-11 (δ_C 33.1); H-12a (δ_H 3.74)/C-7, C-13 (δ_C 15.5) и H₃-13/C-7, C-11, C-12 (δ_C 66.6) позволяют установить строение кольца В и положение гидроксиизопропильного заместителя при C-7 в соединении **19**. Совокупность этих данных позволяет установить структуру соединения **19**. Относительные конфигурации стереоцентров **19** определены на основании данных NOESY эксперимента. Наблюдаемые NOESY корреляции H₃-14 (δ_H 0.93)/H-7 (δ_H 1.70) и H-5 (δ_H 2.43)/H₃-13 (δ_H 1.04) указывают на *транс*-сочленение колец А и В.

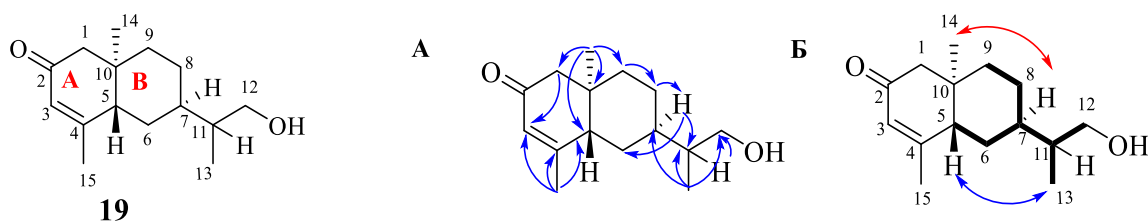
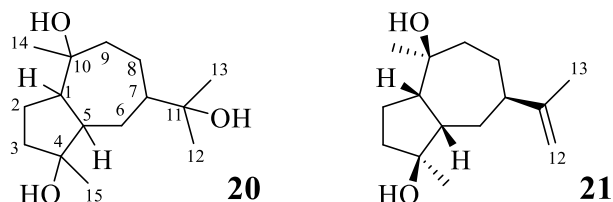


Рисунок 20 – (А) Ключевые HMBC (стрелки)-, (Б) COSY (жирные линии)- и NOE (стрелки)-корреляции в спектрах томимарина Е (**19**)

Абсолютные конфигурации стереоцентров соединения **19** установлены на основании данных спектров ЭКД. Контур теоретического спектра правильно передает все качественные особенности экспериментального спектра, как в коротковолновой области $184 \leq \lambda \leq 270$ нм, где имеются три четко выраженные полосы, соответствующие отрицательному ($\lambda = 184$ нм), положительному ($\lambda_{\text{пик}} = 204$ нм) и отрицательному ($\lambda_{\text{пик}} = 229$ нм) эффектам Коттона, так и в области $\lambda \geq 320$ нм, где имеется слабоинтенсивная полоса, соответствующая положительному эффекту Коттона. Эти данные совместно с данными ЯМР позволяют надежно установить абсолютные конфигурации стереоцентров соединения **19** как 5S,7R,10R. Соединение **19** названо томимарином Е.

Брутто-формула соединения **20** установлена как $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_3$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 279.1946) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Детальный анализ ^1H и ^{13}C ЯМР спектральных данных соединения **20** показал присутствие четырех метильных (δ_{H} 1.18, δ_{C} 22.8, δ_{H} 1.23, δ_{C} 21.4, δ_{H} 1.19, δ_{C} 27.3 и δ_{H} 1.16, δ_{C} 26.1) и пяти метиленовых (δ_{H} 1.74, 1.62, δ_{C} 22.9; δ_{H} 1.66, 1.63, δ_{C} 40.9; δ_{H} 1.57, 1.51, δ_{C} 27.2; δ_{H} 1.74, 1.14, δ_{C} 23.0; δ_{H} 1.93, 1.47, δ_{C} 46.3) групп, трех метиновых групп (δ_{H} 1.83, δ_{C} 52.1; δ_{H} 1.64, δ_{C} 47.5 и δ_{H} 1.64, δ_{C} 48.6) и трех sp^3 -гибридизованных четвертичных атомов углерода, связанных с кислородной функцией (δ_{C} 80.9; δ_{C} 74.8; δ_{C} 74.2). Данные COSY спектра $\text{H}_2\text{-3}/\text{H}_2\text{-2}$, $\text{H}_2\text{-2}/\text{H-1}$, $\text{H-1}/\text{H-5}$, $\text{H-5}/\text{H}_2\text{-6}$, $\text{H}_2\text{-6}/\text{H-7}$, $\text{H-7}/\text{H}_2\text{-8}$, $\text{H}_2\text{-8}/\text{H}_2\text{-9}$ совместно с данными HMBC взаимодействий позволяют установить циклическую структуру соединения **20**. Химические сдвиги сигналов атомов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР соединения **20** оказались близки к химическим сдвигам сигналов соответствующих атомов в спектрах известного гваядиола А (**21**) за исключением H-1, H-5, H-7 и C-4, C-5, C-7, C-12 и C-13. Эти отличия не позволяют предположить, что стереоконфигурации центров C-1 и C-5 в **20** подобны конфигурациям этих центров в соединении **21**. При этом данные NOESY спектра и величины КССВ оказались неинформативными и не позволили установить относительные конфигурации стереоцентров для соединения **20**. Следует отметить, что скелет соединения **20** соответствует скелету 4,10,11-тригидроксигваяна, выделенного из цветков *Achillea clypeolata*. Однако, разница в углах удельного оптического вращения ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} -37^\circ$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -4^\circ$ (для **20**)) не позволяет достоверно соотнести конфигурации стереоцентров соединения **20** с конфигурациями стереоцентров 4,10,11-тригидроксигваяна.



Структурная идентификация известных соединений – гваядиола А (**21**), пренилированного индольного алкалоида VM55599, N-ацетилфенилalaniнола и эргост-6,8,22-триен-3 β -ола была проведена на основании сравнения данных одно- и двумерной-ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии с литературными данными.

5 Установление строения индивидуальных соединений из гриба *Penicillium claviforme* KMM 4665

Гриб *Penicillium claviforme* KMM 4665 был выделен с поверхности ризомы морской травы *Zostera marina* (Японское море).

Из этилацетатного экстракта гриба *P. claviforme* выделен новый 3-(2'-гидроксипропил)-7-гидроксифталид (**23**), вместе с известными соединениями: 3-бутил-7-гидроксифталидом (**22**), изопатулином, *m*-гидроксипропиловым спиртом и циклопентином.

Сравнение данных спектра (+)-ESIMS (m/z 207 $[M + H]^+$) и 1H ЯМР соединения **22** с литературными, позволило предположить его возможную структурную идентичность с 3-бутил-7-гидроксифталидом, ранее выделенным из почвенного гриба *Penicillium vulpinum*. Структура соединения **22** подтверждена с помощью РСА монокристалла, полученного путем кристаллизации в гексане (рис. 21). Абсолютная конфигурация стереоцентра при С-3 как *S* была установлена сравнением значений углов удельного вращения соединения **22** $[\alpha]_D^{20} -39.0^\circ$ с аналогичными данными синтетического (–)-3-бутил-7-гидроксифталида $[\alpha]_D^{25} -52.0^\circ$ и пацилоцина А $[\alpha]_D^{25} -8.6^\circ$ из гриба *Paecilomyces variotii*.

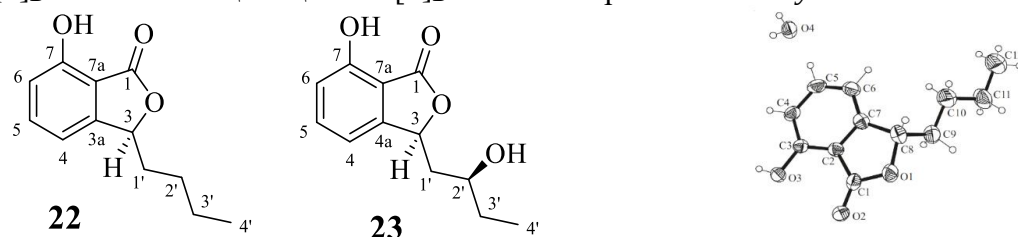


Рисунок 21 – Кристаллическая молекулярная структура (–)-3-бутил-7-гидроксифталида (**22**) по данным РСА

Брутто-формула соединения **23** установлена как $C_{12}H_{14}O_4$ на основании анализа данных спектра (+)-ESI-TOF (пик иона $[M + H]^+$ с m/z 223.0970) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Анализ спектров 1H и ^{13}C ЯМР соединения **23** (DEPT и HSQC) показал присутствие одной метильной (δ_H 0.88, δ_C 9.9) и двух метиленовых (δ_H 1.52, 1.91, δ_C 42.8; δ_H 1.41 (2H), δ_C 30.6) групп, пяти метиновых групп, две из которых связаны с кислородом (δ_H 3.65, δ_C 67.9; δ_H 3.57, δ_C 77.1), а три находятся в системе сопряженных двойных связей (δ_H 6.87, δ_C 115.6; δ_H 6.95, δ_C 112.2; δ_H 7.51, δ_C 136.0), а также трех sp^2 -гибридизованных четвертичных атомов углерода (δ_C 111.0, 153.1, 156.8) и одного карбонильного атома углерода (δ_C 168.0). НМБС корреляции H-3/C-1 (δ_C 168.0), C-4a (δ_C 153.1); H-4/C-3 (δ_C 77.1), C-4a, C-6 (δ_C 115.6), C-7a (δ_C 111.0); H-5/C-4a, C-7 (δ_C 156.8); H-6/C-1, C-4 (δ_C 112.2), C-7a (рис. 22А), а также сравнение данных спектров ЯМР соединения **23** с данными спектров соединения **22** указывают на присутствие в структуре **23** замещенного 7-гидроксифталидного фрагмента. Данные 1H - 1H -COSY и HSQC спектров указывают на наличие в структуре соединения **23** спиновой системы (–CH(3)–CH₂(1')–CH(2')–CH₂(3')–CH₃(4')) (рис. 22Б).

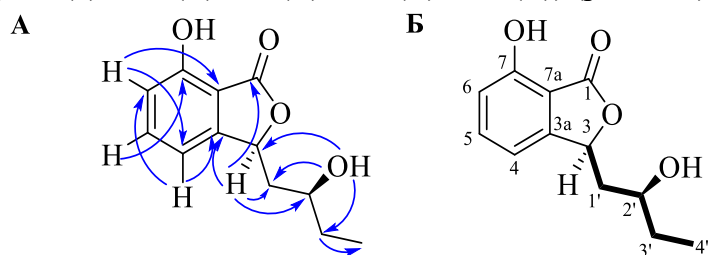


Рисунок 22 – (А) Ключевые НМБС (стрелки)-, (Б) COSY (жирные линии)-корреляции в спектрах соединения **23**

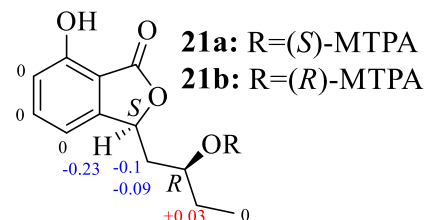


Рисунок 23 – Значения $\Delta\delta(\delta_S - \delta_R)$ (в м.д.) для (S)- (**23a**) и (R)- (**23b**) МТПА эфиров

Эти данные и НМБС корреляции H-3/C-1' (δ_C 42.8), C-2' (δ_C 67.9); H₂-1'/C-3, C-4a, C-3' (δ_C 30.6); 2'-OH/C-1', C-2', C-3'; H₂-3'/C-1', C-2', C-4' (δ_C 9.9) свидетельствуют о

присутствии 2'-гидроксипропилового остатка при С-3 гидроксифталида. Абсолютная конфигурация асимметрического центра при С-2' в соединении **23** установлена с помощью модифицированного метода Мошера. Этерификация гидроксильной группы при С-2' (*R*)- и (*S*)-МТРА хлорангидридами привела к образованию (*S*)-и (*R*) МТРА эфиров **23a** и **23b** соответственно. Разница в значениях химических сдвигов $\Delta\delta(\delta_S-\delta_R)$ сигналов в протонных спектрах полученных эфиров указывает на 2'*R* конфигурацию и позволяет установить стереоструктуру соединения **23** с 2'*R*,3*S* абсолютными конфигурациями хиральных центров (рис. 23). Соединение **23** названо 3-(2'-гидроксипропил)-7-гидроксифталидом. Структурная идентификация известных соединений: изопатулина, *m*-гидроксипропилового спирта и циклопентина была проведена на основании данных одно- и двумерной ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

6 Установление строения 7-гидрокси-8-дегидроксианодерманола А из гриба *Penicillium oxalicum* KMM 4683

Гриб *Penicillium oxalicum* KMM 4683 был выделен листьев мангровых сообществ (побережье Вьетнама, Южно-Китайское море). Из этилацетатного экстракта *P. oxalicum* выделен новый сесквитерпен кадинанового типа – 7-гидрокси-8-дегидроксианодерманола А (**24**).

Брутто-формула соединения **24** установлена как $C_{15}H_{26}O_3$ на основании анализа данных спектра (+)-HRESIMS (пик иона $[M + Na]^+$ m/z 277.1775) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Молекулярная формула соединения **24** соответствует трем степеням ненасыщенности. Детальный анализ 1H и ^{13}C ЯМР спектральных данных соединения **24** показал присутствие четырех метильных (δ_H 0.89, δ_C 10.3; δ_H 1.19, δ_C 24.1; δ_H 1.20, δ_C 22.8 и δ_H 1.42, δ_C 30.6) и трех метиленовых групп (δ_H 1.15, 1.55, δ_C 18.8; δ_H 1.47, 1.69, δ_C 30.1; δ_H 1.57, 2.04, δ_C 53.4), шести метиновых групп (δ_H 1.20, δ_C 41.4; δ_H 1.33, δ_C 48.3; δ_H 1.50, δ_C 59.6; δ_H 2.23, δ_C 30.1; δ_H 3.56, δ_C 81.7 и δ_H 3.65, δ_C 68.5), и двух sp^3 -гибридизованных четвертичных атомов углерода (δ_C 74.4, 81.4). Спектры 1H - 1H -COSY и HSQC соединения **24** позволяют выявить последовательность протонов ($>CH(10)-CH_2(1)-CH_2(2)-\dots-CH_2(8)-$) в кольцах А и В. Эти данные и HMBC корреляции $H_3-15/C-2$ (δ_C 30.1), C-3 (δ_C 30.5), C-4 (δ_C 81.7); H-2a/C-1 (δ_C 18.8), C-3, C-4, C-10 (δ_C 48.3) и C-15 (δ_C 10.3); H-6/C-7 (δ_C 68.5), C-8 (δ_C 53.4), C-11 (δ_C 81.4), C-12 (δ_C 24.1), C-13 (δ_C 30.6); H-10/C-4, C-5, C-6 (δ_C 59.6), C-9 (δ_C 74.4), C-14; $H_3-12,13/C-6$, C-11; $H_3-14/C-8$, C-9 и C-10 позволяют установить строение колец А и В в соединении **24**, наличие кислородных функций при С-4, С-7, С-9 и С-11 и метильных групп при С-3, С-9 и С-11 (рис. 24А).

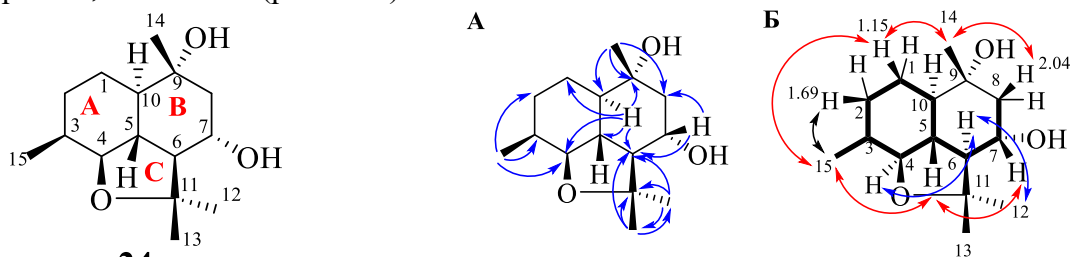


Рисунок 24 – (А) Некоторые HMBC (стрелки), (Б) NOESY (стрелки) и COSY (жирные линии) корреляции в спектрах соединения **24**

Значения химических сдвигов сигналов C-4 (δ_C 81.7), C-11 (δ_C 81.4) и C-15 (δ_C 10.3) указывают на наличие эфирной связи между C-4 и C-11. Данные спектров 1H и ^{13}C ЯМР **24** оказались близкими к данным спектров ранее опубликованного сесквитерпена кадинанового типа, выделенного из печеночного мха *Ptychanthus striatus*, за исключением сигналов C-6–C-8, C-12 и C-13 и отсутствия кислородной функции при С-7. К сожалению, для этого соединения авторы не дали тривиального названия. Позднее из гриба-макромицета *Ganoderma capense* было выделено еще три подобных сесквитерпена кадинанового типа – ганодерманола А, В и С с наличием эфирной связи между C-4 и C-11.

NOESY взаимодействия H₃-15 (δ_{H} 0.89)/H-2 β (δ_{H} 1.69), H-1 β (δ_{H} 1.15), H-5 (δ_{H} 1.20); H-5/H-7 (δ_{H} 3.65); H₃-14 (δ_{H} 1.20)/H-8 β (δ_{H} 2.04), H-1 β ; H₃-12/H-6, H-4 (рис. 24Б) и величины КССВ указывают на *транс*-сочленение колец А и В, α -ориентацию СН₃-12 и 7-ОН и β -ориентацию СН₃-13, СН₃-14 и СН₃-15. Соединение названо 7-гидрокси-8-дегидроксиганодерманол А.

7 Установление строения 3 β ,5 α ,9 α -тригидрокси-(22E,24R)-эргоста-7,22-диен-6-она из гриба *Trichoderma polysporum* KMM 4649

Гриб *Trichoderma polysporum* KMM 4649 был выделен из поверхностной микобиоты ризомы морской травы *Zostera marina* (залив Восток, Японское море). Из этилацетатного экстракта *T. polysporum* выделен известный стерин 3 β ,5 α ,9 α -тригидрокси-(22E,24R)-эргоста-7,22-диен-6-он и идентифицирован на основании анализа данных одно- и двумерных ЯМР спектров и масс-спектров высокого разрешения.

8 Установление строения индивидуальных соединений из гриба *Aspergillus foetidus* KMM 4694

Гриб *Aspergillus foetidus* KMM 4694 был выделен из образца грунта Сахалинского залива (Охотское море, глубина 41 м). Из этилацетатного экстракта *A. foetidus* выделены известные нафто- γ -пироны: руброфусарин В и ТМС 256 А1, и их димерные аналоги фонсециноны А и В, аураспероны А, В и F, диангидро-аурасперон С и асперпирон В. Структурная идентификация соединений была проведена на основании данных спектров ¹H и ¹³C ЯМР и масс-спектров высокого разрешения.

9 Установление строения вторичных метаболитов из гриба *Talaromyces funiculosus* LM.3.1

Гриб *Talaromyces funiculosus* был выделен из листьев мангровых сообществ (провинция Khanh Hoa, Вьетнам, Южно-Китайское море). Из этилацетатного экстракта *T. funiculosus* выделены известные наонадриды – глаукановая и глауконовая кислоты. Структурная идентификация соединений была проведена на основании данных спектров ¹H и ¹³C ЯМР и масс-спектров высокого разрешения.

10 Биологическая активность выделенных соединений

Биологическая активность метаболитов гриба *Penicillium thomii* KMM 4674

Соединение **1** не показало цитотоксической активности в отношении к клеткам рака простаты человека линий 22Rv1, PC3 и LNCaP в концентрациях до 100 мкМ.

В макрофагах RAW264.7, обработанных ЛПС, соединения **3**, **9** и **11** вызывали умеренное снижение выработки оксида азота (II) на $27.7 \pm 1.8 \%$, $20.6 \pm 1.2 \%$ и $22.3 \pm 3.8 \%$ соответственно в нецитотоксической концентрации 10.0 мкМ.

Было показано, что зостеропениллины **2–4**, **8**, **9**, **11** и **12** способны ингибировать аутофагию в лекарственно-устойчивых клетках рака простаты человека PC3 в нецитотоксических концентрациях и могут сенсibilизировать клетки рака простаты человека при использовании лекарственных препаратов с цитотоксической активностью.

Биологическая активность метаболитов гриба *Penicillium thomii* KMM 4679

Было исследовано влияние зостеропениллина М (**14**) на жизнеспособность и на формирование и рост колоний клеток лекарственно-устойчивого рака простаты человека линии 22Rv1. Зостеропениллин М был токсичен в отношении этих клеток с ИК₅₀ 46.8 мкМ и ингибировал формирование колоний этих клеток на 27.5 % и 46.2 % при концентрации 5 мкМ и 50 мкМ соответственно. Также было показано, что соединение **14** статистически достоверно вызывало увеличение уровня активных форм кислорода в этих клетках на 4.05 ± 0.40 и $2.86 \pm 0.05 \%$ в концентрации 50 мкМ и 100 мкМ соответственно.

Биологическая активность метаболитов гриба *Penicillium thomii* KMM 4667

Было показано, что томимарины А (15), В (16), D (17), Е (18) в концентрации 10.0 мкМ вызывают снижение уровня оксида азота (II) в мышинных перитонеальных макрофагах, обработанных ЛПС, на 24.9 ± 0.9 , 43.4 ± 1.5 , 20.9 ± 5.7 , 22.5 ± 5.1 % соответственно по сравнению с контрольными клетками, инкубированными с ЛПС.

Биологическая активность метаболитов гриба *Aspergillus foetidus* KMM 4694

Было изучено влияние фонсецинонов А и В, аурасперона А и руброфусарина В на жизнеспособность и формирование колоний клеток лекарственно-устойчивой линии рака простаты человека 22Rv1. Фонсецинон А проявлял цитотоксическое действие в отношении этих клеток с ИК₅₀ 13.1 мкМ. Руброфусарин В, фонсециноны А и В и аурасперон А в концентрации 10 мкМ ингибировали формирование колоний клеток 22Rv1 на 68.5 ± 12.7 , 88.7 ± 7.2 , 76.61 ± 7.7 и 85.5 ± 16.6 % соответственно. Также было показано, что руброфусарин В увеличивает продукцию активных форм кислорода в клетках линии 22Rv1 на 10.5 ± 1.12 % при концентрации 100 мкМ, а фонсецинон А – на 13.3 ± 1.50 % при 50 мкМ соответственно, что может быть связано с их цитотоксической активностью.

ВЫВОДЫ

1. Из восьми штаммов шести видов грибов: *Penicillium thomii* KMM 4674, KMM 4679 и KMM 4667, *Penicillium claviforme* KMM 4665 и *Trichoderma polysporum* KMM 4649 (морская трава *Zostera marina*, Японское море); *Aspergillus foetidus* KMM 4694 (грунт, Сахалинский залив, Охотское море); *Penicillium oxalicum* KMM 4683 и *Talaromyces funiculosus* LM.3.1 (листья неидентифицированного мангрового растения, Южно-Китайское море) было выделено 41 природное соединение различного структурного типа, в том числе 21 – новое.
2. Показано, что морские грибы *Penicillium thomii* KMM 4674 и KMM 4667 являются богатыми источниками поликетидов декалинового типа и сесквитерпенов эудесманового типа, соответственно.
2. Установлено строение новых поликетидов декалинового типа – зостеропениллинов А-М и паллидопениллина А из грибов *Penicillium thomii* KMM 4674 и *Penicillium thomii* KMM 4679. Выделенные соединения являются первыми декалиновыми поликетидами с 1-гидрокси-3-оксопропильным заместителем при С-4, деметилированными по С-4. Предложена схема биосинтеза зостеропениллинов А-Л и паллидопениллина А.
3. Установлено строение томимаринов А-Е из гриба *P. thomii* KMM 4667 и 7-гидрокси-8-дегидроксианодерманола А из гриба *P. oxalicum* KMM 4683, которые являются новыми представителями сесквитерпенов эудесманового и кадинанового типа, соответственно.
4. Установлено строение нового 3-(2'-гидроксибутил)-7-гидроксифталида из гриба *P. claviforme* KMM 4665.
5. Установлены абсолютные конфигурации асимметрических центров в 11 новых метаболитах морских грибов. Впервые получены данные рентгеноструктурного анализа для трех индивидуальных соединений.
6. Томимарины и зостеропениллины индуцируют снижение выработки оксида азота (II) в макрофагах, активированных липополисахаридом. Зостеропениллины способны ингибировать аутофагию в нецитотоксических концентрациях и сенсibilизировать клетки рака простаты человека РС3 при совместном использовании с лекарственными препаратами с цитотоксической активностью. Нафто-γ-пироны и зостеропениллин М ингибируют формирование колоний клеток рака простаты человека 22Rv1.

Основные публикации по теме диссертации

1. Афиятуллов Ш.Ш., Лещенко Е.В., Соболевская М.П., Герасименко А.В., Худякова Ю.В., Киричук Н.Н., Михайлов В.В. Новый 3-2'(R)-гидроксибутил-7-гидроксифталид

- из морского изолята гриба *Penicillium claviforme* // Химия природ. соединений. 2015. № 1. С. 98–101.
2. Afiyatullof S.S., **Leshchenko E.V.**, Sobolevskaya M.P., Denisenko V.A., Kirichuk N.N., Khudyakova Y.V., Hoai T.P.T., Dmitrenok P.S., Menchinskaya E.S., Pislyagin E.A., Berdyshev D.V. New eudesmane sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Penicillium thomii* // Phytochem. Lett. 2015. V. 14. P. 209–214.
 3. Афиятуллоф Ш.Ш., **Лещенко Е.В.**, Соболевская М.П., Антонов А.С., Денисенко В.А., Попов Р.С., Худякова Ю.В., Киричук Н.Н., Кузьмич А.С., Пислягин Е.А., Ким Н.Ю., Бердышев Д.В. Новый томимарин Е из морского изолята гриба *Penicillium thomii* // Химия природ. соединений. 2017. № 2. С. 246–249.
 4. Sobolevskaya M.P., **Leshchenko E.V.**, Hoai T.P.T., Denisenko V.A., Dyshlovoy S.A., Kirichuk N.N., Khudyakova Y.V., Kim N.Y., Berdyshev D.V., Pislyagin E.A., Kuzmich A. S., Popov R.S., Antonov A.S., Afiyatullof S.S. Pallidopenillines: polyketides from the alga-derived fungus *Penicillium thomii* Maire KMM 4675 // J. Nat. Prod. 2016. V. 79, No 12. P. 3031–3038.
 5. Afiyatullof S.S., **Leshchenko E.V.**, Berdyshev D.V., Sobolevskaya M.P., Antonov A.S., Denisenko V.A., Popov R.S., Pivkin M.V., Udovenko A.A., Pislyagin E.A., Von Amsberg G., Dyshlovoy S.A. Zosteropenillines: polyketides from the marine-derived fungus *Penicillium thomii* // Mar. Drugs. 2017. V. 15, No 2. 46. P. 1–17.
 6. Афиятуллоф Ш.Ш., **Лещенко Е.В.**, Антонов А.С., Журавлева О.И. Вторичные метаболиты гриба *Penicillium thomii* ассоциированного с морской травой *Zostera marina* // Химия природ. соединений. 2018. № 5. С. 871–872.
 7. Antonov A.S., **Leshchenko E.V.**, Zhuravleva O.I., Dyshlovoy S.A., von Amsberg G., Popov R.S., Denisenko V.A., Kirichuk N.N., Afiyatullof S.S. Naphto- γ -pyrones from the marine-derived fungus *Aspergillus foetidus* // Nat. Prod. Res. 2021. V. 35, No 1. P. 131–134.
 8. Афиятуллоф Ш.Ш., Антонов А.С., Пивкин М.В., Денисенко В.А., Попов Р.С., Ngoc N.T.D., **Лещенко Е.В.** Новый сесквитерпен кадинанового типа из морского изолята гриба *Penicillium oxalicum* KMM 4683 // Химия природ. соединений. 2021. № 1. С. 156–157.

Тезисы докладов

1. **Leshchenko E.V.**, Afiyatullof Sh.Sh., Zhuravleva O.I., Denisenko V.A. New eudesmane-type sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Penicillium thomii* // 6th Russian-Korean Conference "Current Issues of Biologically Active Compounds Chemistry and Biotechnology", Novosibirsk. 05-10 July, 2015: book of abstracts // Novosibirsk, 2015. P.331.
2. **Leshchenko E.V.**, Afiyatullof Sh.Sh., Denisenko V.A., Kirichuk N.N., Pislyagin E.A. New sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Penicillium thomii* // 11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, Antalya, 1-4 October, 2015: book of abstracts // Antalya, 2015. P.283.
3. **Leshchenko E.V.**, Afiyatullof Sh.Sh., Pivkin M.V., Mikhailov V.V. Marine-derived fungi as sources of new bioactive metabolites // IV International Conference: Microbial diversity resource potential, Moscow, 23 November, 2016: book of abstracts // Perm, 2016. P.186.
4. **Leshchenko E.V.**, Pivkin M.V., Mikhailov V.V., Sobolevskaya M.P., Berdyshev D.V., Khudyakova Y.V., Trinh P.T.H., Nhut N.D., Ly B.M., Afiyatullof Sh.Sh. Marine-derived fungus *Penicillium thomii* as a perspective source of bioactive metabolites // 7th International Symposium "Chemistry and Chemical Education", Vladivostok, 17-20 Oktober, 2017: proceedings // Vladivostok, 2017. P.187.
5. **Leshchenko E.V.**, Pivkin M.V., Ngo Thi Duy Ngoc, Afiyatullof Sh.Sh. Chemical and biotechnological potential of marine plant-derived fungi of Russian and Vietnamese waters // 1st Russian-Vietnamese workshop "Marine fungal metabolites and their bioactivities", Nha Trang, October 31, 2017: book of abstract // Vladivostok, 2017. P. 16.

Лещенко Елена Владиславовна

Строение и биологическая активность вторичных метаболитов грибов, выделенных из морских растений и грунтов

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук