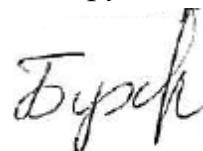


На правах рукописи



Бухвалова Светлана Юрьевна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СИНТЕЗА ИЗОКОМБРЕТАСТАТИНОВ,
ТРИАЗОЛЬНЫХ И БЕНЗО[*b*]ОКСЕПИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
КОЛХИЦИНА – ЛИГАНДОВ КОЛХИЦИНОВОГО САЙТА ТУБУЛИНА**

02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Нижний Новгород – 2019

Работа выполнена на кафедре органической химии химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научный руководитель:

Фёдоров Алексей Юрьевич

доктор химических наук, профессор РАН, заведующий кафедрой органической химии химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Официальные оппоненты:

Османов Владимир Кимович

доктор химических наук, доцент, профессор кафедры "Производственная безопасность, экология и химия" образовательно-научного института физико-химических технологий и материаловедения Нижегородского государственного технического университета им. Р.Е. Алексеева

Болдырев Иван Александрович

кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии липидов отдела химической биологии гликанов и липидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Защита диссертации состоится «29» ноября 2019 года в 15 часов на заседании объединённого диссертационного совета Д 999.130.02 на базе Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и Института металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН по адресу: 603950, Нижний Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, 23, корп. 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/955>.

Автореферат разослан «__» октября 2019 года

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук, профессор

 А.В. Гущин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из актуальных проблем современной медицинской химии является поиск эффективных препаратов для борьбы с онкологическими заболеваниями. Рак является второй из основных причин смерти в мире; так, по данным Всемирной организации здравоохранения, в 2015 г. от этого заболевания умерли 8,8 млн человек.

В настоящее время в химиотерапии рака преобладают методы лечения с использованием цитотоксических препаратов. Среди наиболее распространенных видов рака только при раке молочной железы пятилетняя выживаемость превышает 50%. Обычная химиотерапия является относительно неэффективной для многих видов рака, из-за чего по-прежнему существует острая необходимость в улучшении лекарств от рака и, в более долгосрочной перспективе, в изменении методов лечения рака. Поиск улучшенных по сравнению с существующими препаратов, воздействующих на такие неспецифические мишени, как ДНК и тубулин, продолжает быть важной задачей медицинской химии. Одним из наиболее привлекательных способов действия противоопухолевых агентов является остановка митоза путём ингибирования формирования веретена деления.

Следует отметить, что подавляющее большинство антимитотических агентов, применяемых в медицинской практике или находящихся на стадии клинических испытаний, обладает рядом существенных недостатков (низкая селективность биологического действия и, как следствие, высокая системная токсичность, сложность доставки препарата в опухолевую ткань, снижение терапевтической активности ввиду множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток; отсутствие доступных природных источников и промышленно реализуемых методов синтеза).

В связи с этим, представляет собой интерес синтез структурных аналогов известных противоопухолевых агентов – комбретастатинов и колхицина, обладающих противоопухолевыми свойствами, но большей устойчивостью и меньшей токсичностью для здоровых тканей.

Цель работы. Получение новых антимитотических противоопухолевых агентов колхицинового сайта клеточного белка тубулина. В работе решались следующие задачи:

- 1) разработка и применение нового метода синтеза изокомбретастатинов;
- 2) синтез колхициноподобных соединений, имеющих вместо семичленного цикла С триазольный фрагмент;
- 3) синтез структурных аналогов аллоколхицина, содержащих бензо[*b*]оксепиновый

фрагмент;

4) определение цитотоксичности *in vitro* полученных соединений.

Объекты исследования. Изокомбретастатины, содержащие бензольные и гетероциклические кольца с донорными и акцепторными заместителями; (1,2,3-триазол)содержащие структурные аналоги аллоколхицина; бензо[*b*]оксепинсодержащие структурные аналоги аллоколхицина.

Методы исследования. В работе использованы современные методы тонкого органического синтеза и металлокомплексного катализа. Состав и строение соединений подтверждены физико-химическими методами (ЯМР-, ИК-спектроскопия, элементный анализ). Для выделения и очистки соединений использовали хроматографические методы (хроматография на силикагеле).

Научная новизна и практическая значимость работы. Предложен и реализован новый метод синтеза изокомбретастатинов, содержащих донорные и акцепторные заместители в ароматических кольцах, а также гетероциклические ароматические фрагменты, исходя из коммерчески доступного 3,4,5-триметоксибензальдегида. Определена цитотоксичность полученных соединений *in vitro*: ряд полученных соединений проявляют цитотоксическую активность в наномолярных концентрациях по отношению к клеточным линиям *Jurkat*, *K562*, *Colo357*, *A549*.

Предложен и реализован метод синтеза новых триазолсодержащих аналогов колхицина с применением термического внутримолекулярного циклоприсоединения по Хьюгену. Определена цитотоксичность полученных соединений *in vitro*: 3 из этих соединений демонстрируют цитотоксическую активность в низких микромолярных концентрациях по отношению к клеточным линиям *T3M4* и *BxPC-3*.

Предложен и реализован метод синтеза аналогов аллоколхицина, содержащих бензо[*b*]оксепиновый фрагмент с использованием на ключевой стадии каталитических превращений с участием комплексов золота (I), проведён их молекулярный докинг. Определена цитотоксичность полученных соединений *in vitro*: все синтезированные соединения демонстрируют цитотоксичность в низких микромолярных концентрациях по отношению к клеточным линиям *HEK293*, *PANC-1*, *Colo357*, *HeLa*, *Colon26*.

Личный вклад автора в получение изложенных в диссертации результатов. Синтез изокомбретастатинов, (1,2,3-триазол)содержащих структурных аналогов аллоколхицина; бензо[*b*]оксепинсодержащих структурных аналогов аллоколхицина выполнен в полном объеме лично диссертантом. Соискатель принимал активное участие в постановке задач исследования, разработке структур целевых молекул и методов их получения, анализе результатов биологических исследований синтезированных

соединений и написании статей по результатам исследования.

На защиту выносятся следующие положения:

- экспериментальные данные о синтезе изокомбретастатинов;
- экспериментальные данные о синтезе (1,2,3-триазол)содержащих структурных аналогов аллоколхицина;
- экспериментальные данные о синтезе бензо[*b*]оксепинсодержащих структурных аналогов аллоколхицина;
- результаты исследования структуры полученных соединений методом ЯМР-спектроскопии;
- результаты исследования биологической активности полученных соединений.

Степень достоверности полученных результатов. Структуры всех синтезированных в работе соединений подтверждены с применением современных физико-химических методов анализа – ИК-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: всероссийская молодёжная конференция-школа с международным участием «Достижения и проблемы современной химии» (2014 г.), кластер конференций по органической химии «ОргХим – 2016» (2016 г.), XX Всероссийская молодежная школа-конференция по органической химии «Пчёлка» (2017 г.), 6-th School-Conference on Atomistic Simulation of Functional Materials (ASFM 2017 Winter) (2017), XXI всероссийская конференция молодых ученых - химиков с международным участием (2018).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 2 статьи и тезисы 5 докладов на международных и всероссийских научных конференциях.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обоснования диссертационных исследований, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы (151 наименование). Работа изложена на 165 страницах машинописного текста, включает 59 схем, 30 рисунков, 12 таблиц. Литературный обзор посвящен обсуждению структурных аналогов комбретастатинов и колхицина, а также известных методов их синтеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (12-03-00214-а, 14-03-91342), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» в 2009–2013 (16.740.11.0476), Министерства образования и науки РФ (проект № 4.619.2014/К), РНФ (проект 16-13-10248).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** сформулированы актуальность темы работы, научная и практическая значимость, выбор объектов и методов исследования, цели и задачи. В **литературном обзоре** рассмотрена фармакофорная модель лигандов колхицинового сайта тубулина, структурные аналоги лигандов этого сайта, их свойства и способы синтеза. Обсуждаются достоинства, недостатки, и границы применимости этих методов. В **экспериментальной части** приведены методики синтеза и аналитические данные для всех полученных соединений.

Результаты и их обсуждение.

Данная работа посвящена синтезу новых структурных аналогов комбретастатинов и колхицина, которые предположительно обладают противоопухолевыми свойствами (рисунок 1).

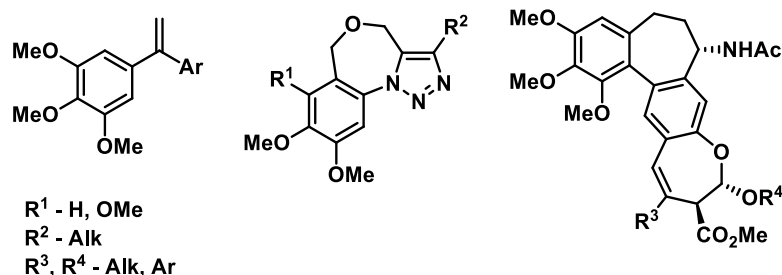


Рисунок 1. Целевые соединения.

1. Синтез изокомбретастатинов.

В первой части работы разработан «блочный» каталитический метод синтеза изокомбретастатинов, позволяющий быстро получать библиотеки этих антимитотических агентов. В соответствии с ретросинтетической схемой 1 целевые продукты могут быть синтезированы по реакциям каталитического кросс-сочетания из 1-арил-1-галогенэтилена **1**, получаемого из арилацетиленов **2**. Он, в свою очередь, может быть синтезирован из соответствующего замещенного бензальдегида **3** по реакции Кори-Фукса.

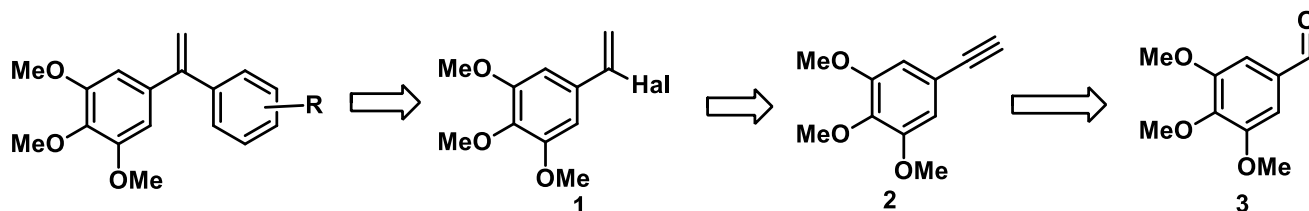


Схема 1. Ретросинтетическая схема синтеза изокомбретастатинов.

3,4,5-Триметоксифенилацетилен **2** был получен по реакции Кори-Фукса с использованием коммерчески доступного 3,4,5-триметоксибензальдегида **3** (схема 2). На

первой стадии из бензальдегида был синтезирован 1,1-дибром-2-(3,4,5-триметоксифенил)-этилен **4** по реакции с CBr_4 и Ph_3P при 0°C (выход продукта – 94%). На второй стадии продукт подвергали элиминированию с последующим обменом Hal-Li с применением *n*-бутиллития при -78°C . При последующем гидролизе был получен требуемый алкин **2** с выходом 72%.

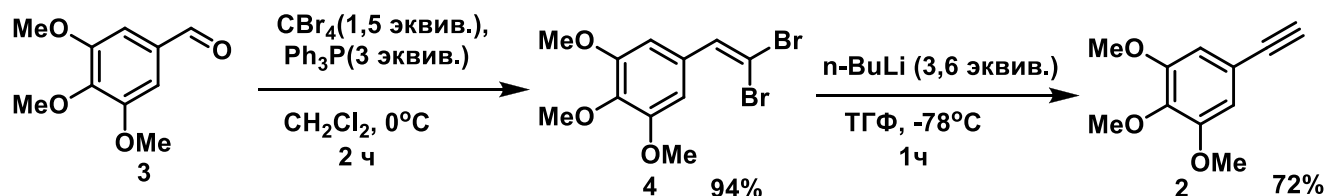


Схема 2. Синтез 3,4,5-триметоксифенилацетилена.

На следующем этапе по кратной связи в α -положение по отношению к бензольному кольцу необходимо было ввести атом галогена. При взаимодействии алкина **2** с 9-бромборобисцикло[3.3.1]нонаном целевой продукт **5a** получался с выходом 12%, и его не удавалось отделить от непрореагировавшего алкина (схема 3).

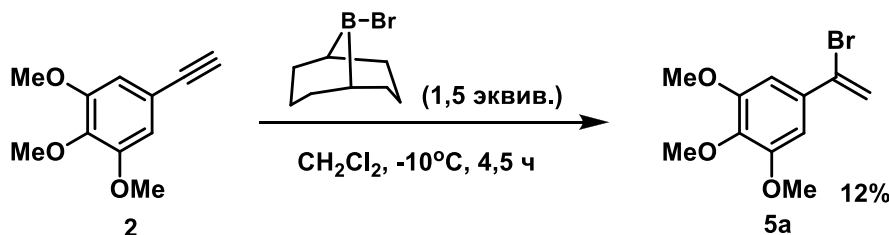
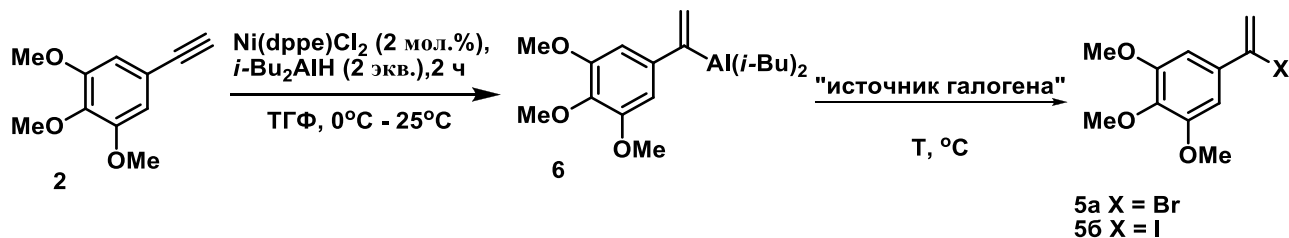


Схема 3. Синтез винилбромида **5a**.

Более эффективным методом синтеза галогенвинилов является реакция гидроалюминирования алкина **2** диизобутилалюминийгидридом в присутствии $\text{Ni}(\text{dppe})\text{Cl}_2$ с последующим взаимодействием алюминийорганического интермедиата **6** с источником галогена (схема 4).



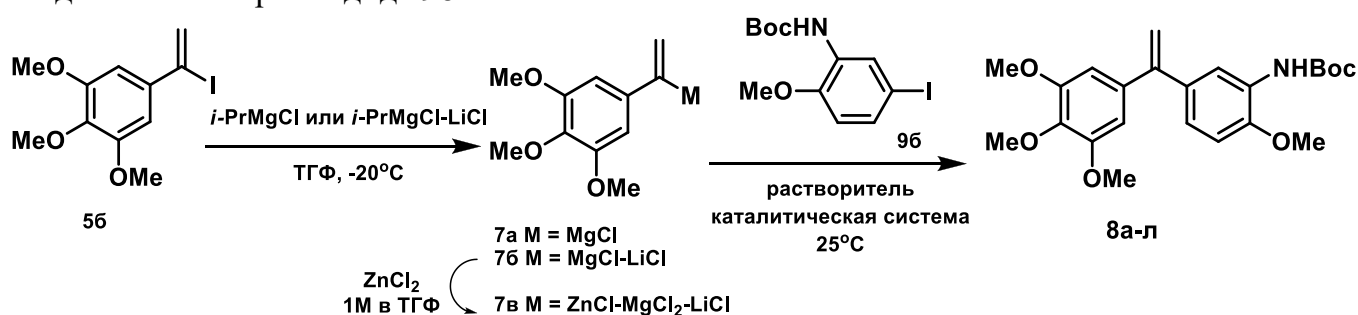
№	Источник галогена	T, °C	Выход, %
1	NBS	0	49%
2	Br_2	0	61%
3	I_2	-78	73%

Схема 4. Синтез винилгалогенидов.

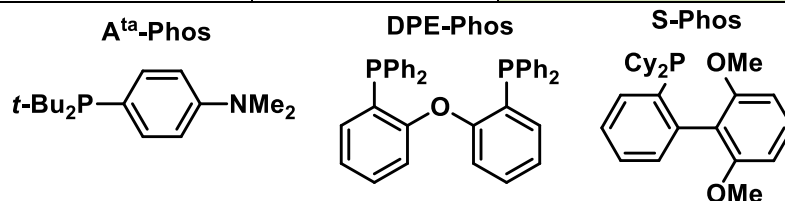
В качестве источника галогена использовались *N*-бромсукцинимид, Br₂ и I₂. Наиболее высокий выход целевого продукта (73%) получен в случае использования йода в качестве галогенирующего агента.

Далее винилиодид **56** превращали в магний- или цинкорганические реагенты **7а-в**, которые вступали реакции кросс-сочетания Кумада или Негиши с соответствующими арилгалогенидами, приводя к целевым изокомбретастатинам **8**. Проведена оптимизация условий кросс-сочетания (таблица 1) с использованием в качестве модельного арилгалогенида–арилийодида **96**.

Таблица 1. Оптимизация условий реакции кросс-сочетания винилметаллорганического соединения **7** и арилийодида **96**.



№	Металлорганическое соединение	Растворитель	Катализатор (5мол.%)	Выход, %
1	7a	ТГФ	(A ^{ta} -Phos) ₂ PdCl ₂	0
2			Pd(Ph ₃ P) ₄	0
3			DPE-PhosPd ₂ dba ₃	0
4			S-PhosPd ₂ dba ₃	0
5			DPE-PhosPd(OAc) ₂	0
6			S-PhosPd(OAc) ₂	4
7	76	ТГФ+NMP	Fe(acac) ₃	0
8		ДМЭ	Fe(acac) ₃	0
9		ТГФ	(A ^{ta} -Phos) ₂ PdCl ₂	0
10			Pd(Ph ₃ P) ₄	0
11			S-PhosPd(OAc) ₂	41
12	7b	ТГФ	(A ^{ta} -Phos) ₂ PdCl ₂	0
13			Pd(Ph ₃ P) ₄	15
14			S-PhosPd(OAc) ₂	76



Показано, что винилмагнийхлорид **7a**, полученный по реакции винилиодида **5b** с *i*-PrMgCl в ТГФ, при -20 °С не вступает в каталитическую реакцию Кумада с арилгалогенидом **9b** в присутствии 5 мол.% катализаторов (A^{ta}-Phos)₂PdCl₂, Pd(Ph₃P)₄, DPE-PhosPd₂(dba)₃, S-PhosPd₂(dba)₃, DPE-PhosPd(OAc)₂ (таблица 1, опыты 1-5). При проведении реакции в присутствии S-PhosPd(OAc)₂ целевой продукт получен в следовых количествах (таблица 1, опыт 6). «Турбо-Гриньяр» **7b**, синтезированный исходя из винилгалогенида **5b** и *i*-PrMgCl·LiCl, также был неэффективен в кросс-сочетании Кумада в присутствии каталитических систем (A^{ta}-Phos)₂PdCl₂, Pd(Ph₃P)₄, DPE-PhosPd₂(dba)₃, S-PhosPd₂(dba)₃, Fe(acac)₃ в ТГФ, ДМЭ, и смесях ТГФ/*N*-метилпирролидон (таблица 1, опыты 7-10). Однако, при проведении реакции в присутствии 5 мол% S-PhosPd(OAc)₂ в ТГФ продукт сочетания выделен с выходом 41%.

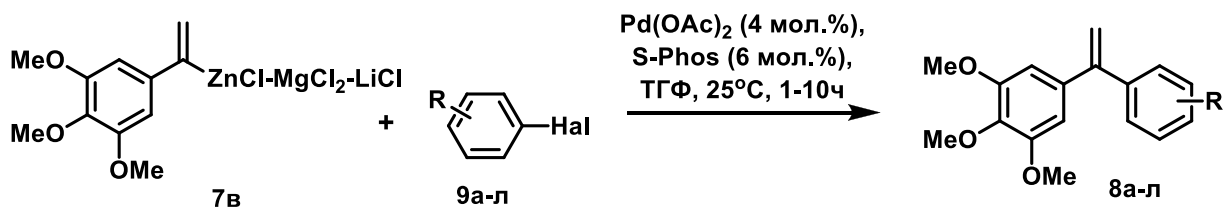
С целью повышения выхода изокомбретастатина винилмагнийхлорид **7b** был превращен в соответствующее цинкорганическое соединение **7в** по реакции с ZnCl₂. Металлорганическое производное **7в** в дальнейшем участвовало в реакции кросс-сочетания Негиши с арилгалогенидом **9b** в присутствии различных комплексов палладия (таблица 1, оп. 12-14). Максимальный выход целевого продукта **8b** составил 76% (таблица 1, оп. 14).¹

Оптимизированная каталитическая система была использована для синтеза различных изокомбретастатинов **8a-л** (таблица 2), содержащих донорные и акцепторные заместители в ароматических кольцах, а также гетероциклические ароматические фрагменты. Целевые продукты синтезированы с хорошими – высокими выходами (таблица 2). При получении изокомбретастатинов, содержащих ацетиламидные фрагменты (**8e-ж**), выходы целевых продуктов не превышали 26% (таблица 2). Этот факт можно объяснить использованием в реакциях кросс-сочетания менее активных арилбромидов вместо арилиодидов.

На стадии кросс-сочетания свободные аминогруппы были защищены с использованием ди-*трет*-бутилдикарбоната, а фенольные гидроксилы – с использованием метоксиметилхлорида. Защитные группы удаляли на последней стадии синтеза спиртовым раствором HCl (в таблице 2 для соединений **8a,б** указаны суммарные выходы реакций кросс-сочетания и удаления защитных групп).

¹Повышение выхода продукта в этом случае объясняется тем, что цинкорганические соединения менее реакционноспособны в реакциях кросс-сочетания, но при этом обладают большей селективностью, вследствие чего реакция проходит практически без образования побочных продуктов гомосочетания.

Таблица 2. Выходы и цитотоксичность полученных изокомбретастатинов.



№	Продукт	Выход, %	IC ₅₀ , μM			
			<i>Jurkat</i>	<i>K562</i>	<i>Colo357</i>	<i>A549</i>
8a		79	0.005	0.005	10	0.1
8б		71	0.005	0.005	0.005	0.01
8в		81	0.1	>1	0.001	0.1
8г*		66	>10	>1	0.01	0.1
8д		84	0.5	>1	0.3	>40
8е*		19	>10	>1	5	>0.1
8ж*		26	>10	>1	>10	>10
8з*		63	>10	>1	10	10
8и*		71	>10	>1	>10	>10
8к		60	>10	>1	>10	>10
8л		58	>10	>1	>50	>50

Цитотоксичность синтезированных соединений (IC_{50}^2) была определена *in vitro* на клеточных линиях *Jurkat* (HTLV-1-негативный острый Т-клеточный лейкоз), *K562* (хронический миелобластный лейкоз), *Colo357* (рак поджелудочной железы человека), *A549* (альвеолярная аденокарцинома человека). Исследования проводились с использованием МТТ-теста после выдерживания клеток с исследуемыми соединениями в течение 72 часов. Показано, что 5 из полученных соединений показывают цитотоксическую активность в низких наномолярных концентрациях по отношению к клеточным линиям *Jurkat*, *K562*, *Colo357*, *A549* (таблица 2).

2. Синтез триазольных производных колхицина.

Вначале для синтеза триазолсодержащих аналогов соединений колхицинового ряда **10** был предложен синтетический подход, представленный на схеме 5.

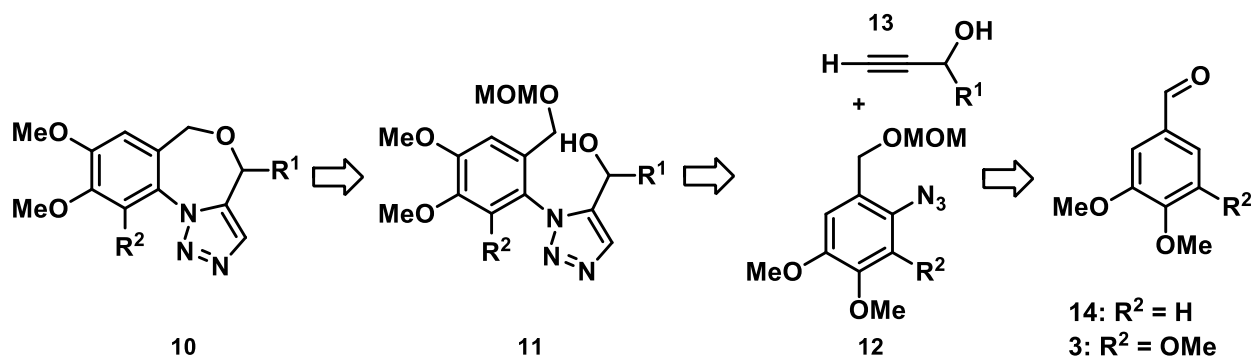


Схема 5. Ретросинтетическая схема синтеза соединений **10**.

Целевые продукты **10** могут быть получены по реакции аннелирования исходя из триазолов **11**, которые могут быть, в свою очередь, синтезированы с применением реакций [3+2]-диполярного циклоприсоединения с 1,5-региоселективностью, катализируемых комплексами рутения из арилазидов **12** и алкинов **13**. Арилазиды **12** доступны из коммерчески доступных замещенных бензальдегидов **3** и **14**.

В качестве модельного субстрата для получения арилазидов нами использован вератральдегид **14** (схема 6).

² IC_{50} - концентрация соединения, при которой достигается ингибирование пролиферации клеток на 50%.

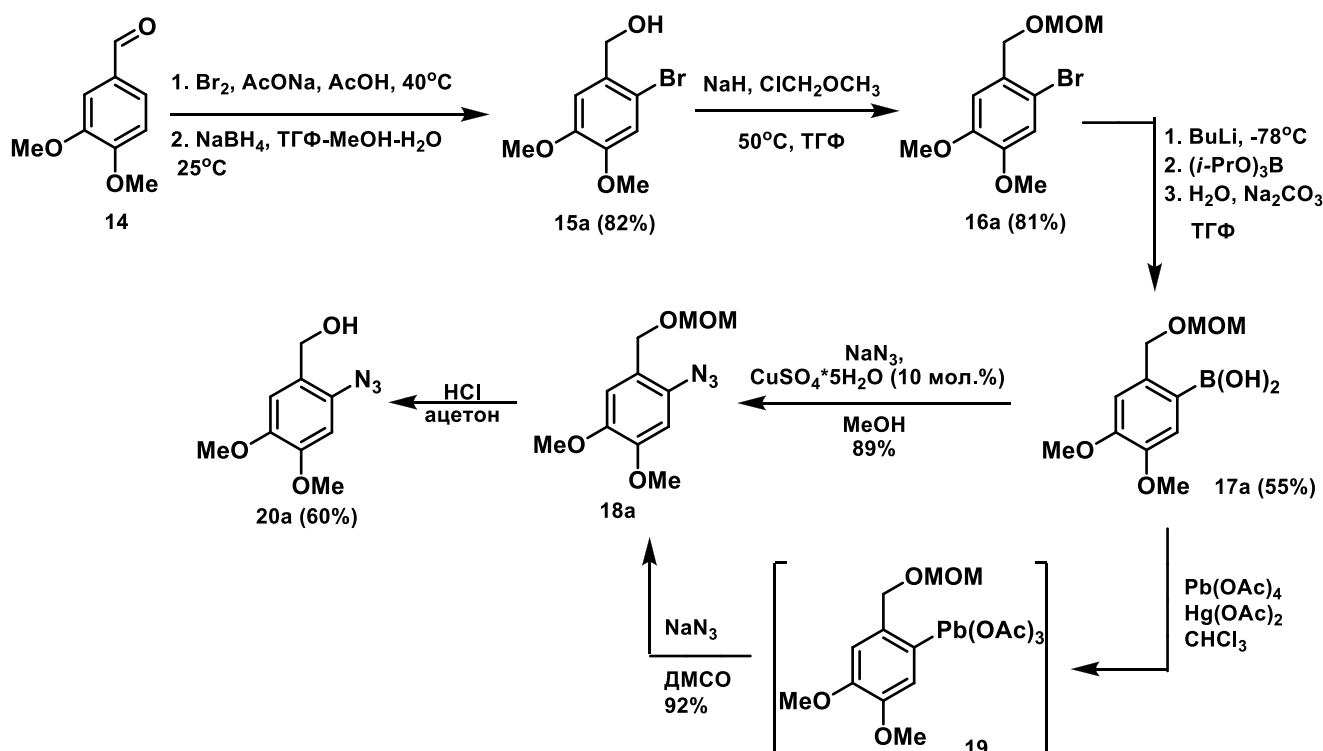


Схема 6. Синтез арилазида **20a**.

Сначала проводили бромирование и восстановление карбонильной группы соединения **14** с применением классических методов, что привело к спирту **15a** (суммарный выход – 82%). Затем гидроксильную группу в соединении **15a** защитили метоксиметильным фрагментом (выход – 81%), полученный арилбромид **16a** был превращен в арилборную кислоту **17a**. Для этого проводили литирование соединения **16a** с применением BuLi. Ариллитиевое производное реагировало с триизопропилборатом при -78°C; полученная соль [(*i*-PrO)₃BAr]⁻Li⁺ подвергалась гидролизу в основной среде с образованием кислоты **17a** (выход – 55%).

Реакция кислоты **17a** с NaN₃ в присутствии 10 мол.% CuSO₄ привела к целевому арилазиду **18a** с выходом 89%. С другой стороны, реакция триацетата арилсвинца **19**, полученного *in situ* из арилборной кислоты **17a**, с NaN₃ приводит к азиду **18a** с выходом 92%. Поскольку Pb(OAc)₄ является сильно токсичным, а выход продукта реакции с его использованием увеличивается незначительно, такой способ синтеза в дальнейшем не применяли. Удаление метоксиметильного фрагмента в соединении **18a** путем кислотного гидролиза в ацетоне привело к арилазиду **20a** с выходом 60%.

Для синтеза арилазолов с 1,5-региоселективностью были оптимизированы условия [3+2] циклоприсоединения на примере реакции арилазида **18a** с пропаргилацетатом **13a** с применением рутениевого катализатора Ru[Cp^{*}(COD)Cl] (таблица 3).

Таблица 3. Оптимизация условий реакции RuAAC арилазида **18a** с алкином **13a**.

№	Растворитель	T, °C	мол. % Ru[Cp*(COD)Cl]	Выход, %	Региоселективность 21a:22a
1	ТГФ	25	6	-	-
2		40	3	-	-
3		66	6	-	-
4	1,4-диоксан	25	6	-	-
5		40	6	-	-
6		60	6	-	-
7		80	6	-	-
8		101	6	-	-
9	толуол	110	5	60	3:2
10		90	5	65	10:1
11		80	5	-	-
12		85	5	-	-

Как показано в таблице 3, применение в качестве растворителей ТГФ или 1,4-диоксана в температурном диапазоне от 25°C до температуры кипения используемого растворителя при использовании 3-6% катализатора Ru[Cp*(COD)Cl] не приводило к целевому продукту **21a**. При проведении реакции в толуоле при 110°C в присутствии 5% рутениевого комплекса была получена смесь 1,5- и 1,4-региоизомеров **21a** и **22a** в соотношении 3:2. Понижение температуры до 90°C приводило к повышению региоселективности процесса - смесь **21a** и **22a** выделена в соотношении 10:1 с 65% выходом. Проведение реакции при температуре 80°C и 85°C не приводило к образованию продуктов [3+2] циклоприсоединения. Таким образом, можно сделать вывод, что при 110°C основной вклад в образование продуктов [3+2] присоединения вносит классическая термическая реакция Хьюзена. При понижении температуры реакции до 90°C основным направлением процесса становится металлокомплексный катализ на рутениевом комплексе.

Оптимизированные условия реакции (5 мол% Ru[Cp*(COD)Cl], толуол, 90°C) были использованы для синтеза 1,5-триазолов **21** на основе ацетиленов, содержащих спиртовые и сложноэфирные фрагменты (схема 7).

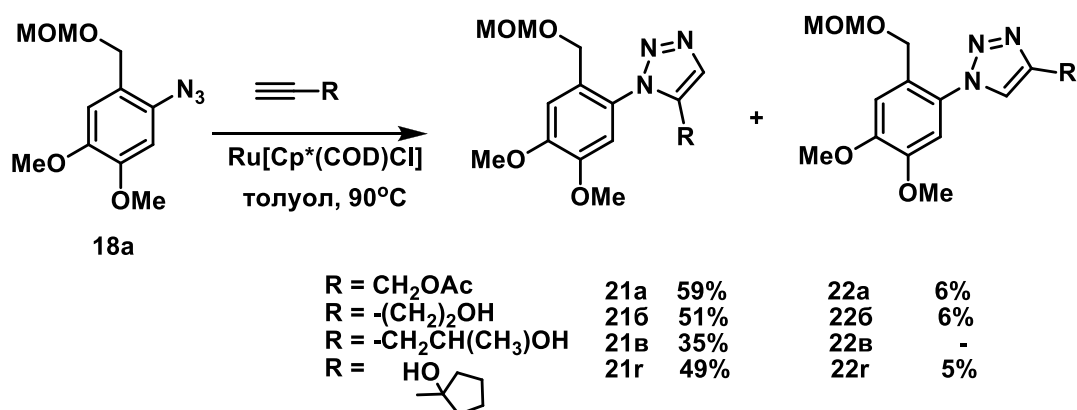


Схема 7. Синтез арилатриазолов с 1,5-селективностью.

Также был проведен встречный синтез арилтриазолов **22** (схема 8). Для этого к азиду **17**, получающемуся при взаимодействии арилборной кислоты **17a** с азидом натрия в присутствии 10% CuSO_4 без выделения добавляли терминальные алкины **13** и аскорбат натрия (30%), что приводило к триазолам **22a-г** с выходами 59-89%.

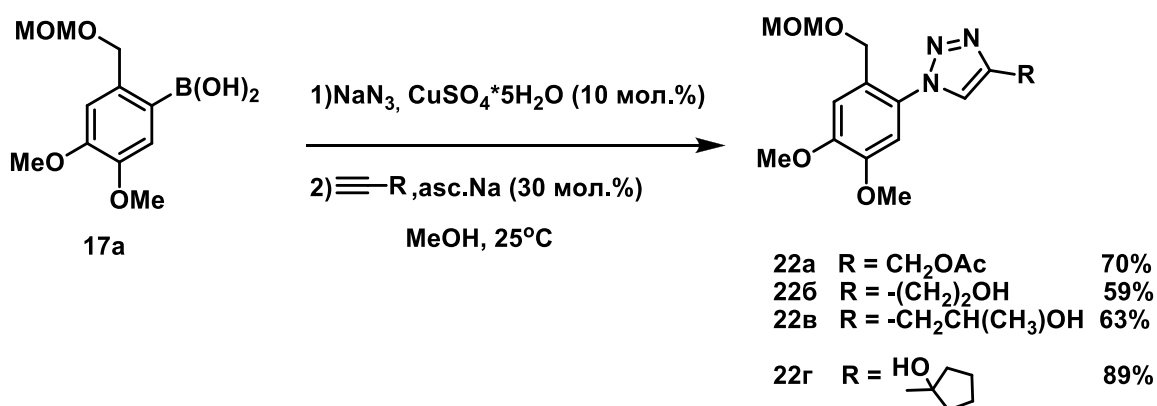


Схема 8. Встречный синтез арилатриазолов с 1,4-селективностью.

Нами была сделана попытка удалить защитные метоксиметильные группы в азольных производных **21b** и **21г** под действием HCl и провести *in situ* аннелирование с образованием семи- или восьмичленных циклов **23b** и **23г** соответственно (схема 9).

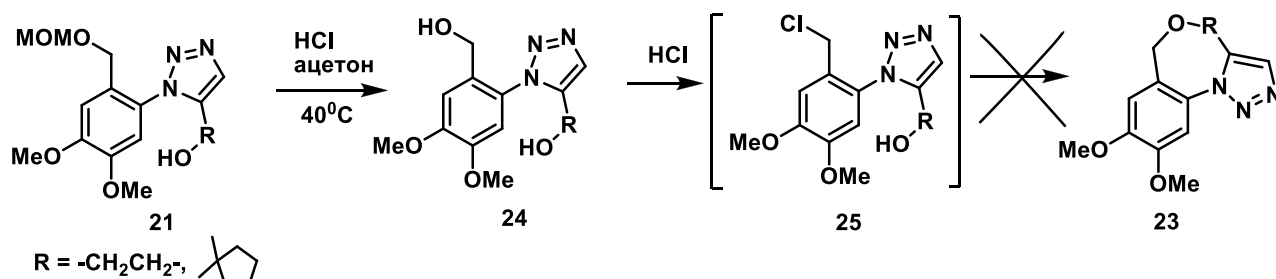


Схема 9. Удаление защитных групп и попытка проведения реакции аннелирования.

Удаление метоксиметильного фрагмента в производных **21b,г** приводило к получению соответствующих азолсодержащих диолов **24b,г** (схема 9) при этом фрагмент

бензилового спирта не удавалось превратить *in situ* в бензилхлориды **25б,г** и провести внутримолекулярное аннелирование, по аналогии с работой, опубликованной нашей группой ранее³. Нами была предпринята попытка получить соответствующие бензилхлориды на основе соединений **24б,г** по реакции Аппеля, однако, получающиеся при этом галогенпроизводные не вступают в реакции внутримолекулярного нуклеофильного замещения с образованием трициклических продуктов. Этот факт, можно объяснить сложностью замыкания семи- и восьмичленного циклов с образованием достаточно напряженных трициклических продуктов **23б,г**.

В связи с этим, для синтеза триазолосодержащих бензоксазепинов **10** нами был рассмотрен другой ретросинтетический подход (схема 10).

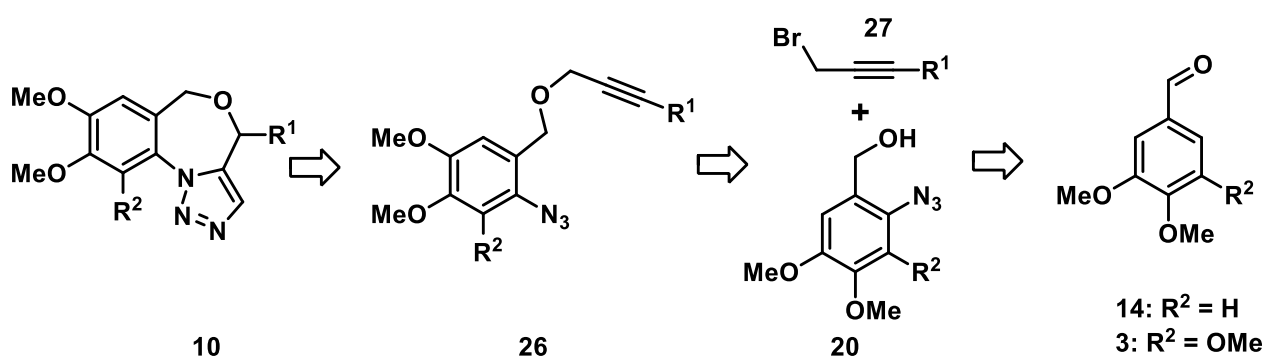


Схема 10. Ретросинтетическая схема синтеза соединений **10**.

В этом случае ключевой стадией синтеза является замыкание семичленного цикла в интермедиате **26** с применением термической реакции Хьюсгена. Арилазид **26**, содержащий в боковой цепи алкинильный фрагмент, может быть синтезирован исходя из пропаргилбромидов **27** и арилазидов **20**, доступных из коммерческих бензальдегидов **3** и **14**.

Показано, что арилазиды **20** могут быть получены с применением более короткой последовательности реакций. Для этого арилбромид **15** превращали в арилборную кислоту **28** (**15а** – с использованием *n*-бутиллития, **15б** – с использованием *трет*-бутиллития), которая легко вступала в каталитическую реакцию обмена борана азидную группу, приводя к азидам **20** с выходами 45% и 52% (схема 11). Полученные арилазиды **20** вступали в реакцию нуклеофильного замещения с пропаргилбромидом **27а-г**, приводя к замещенным алкинам **29а-г** и **31а-в** с выходами 60-84%.

³M.I. Naumov, S.A. Sutirin, A.S. Shavyrin, O.G. Ganina, I.P. Beletskaya, V. Bourgarel-Rey, S. Combes, J.-P. Finet, A.Yu. Fedorov // J. Org. Chem. – 2007. – V.72. – P.3293-3301.

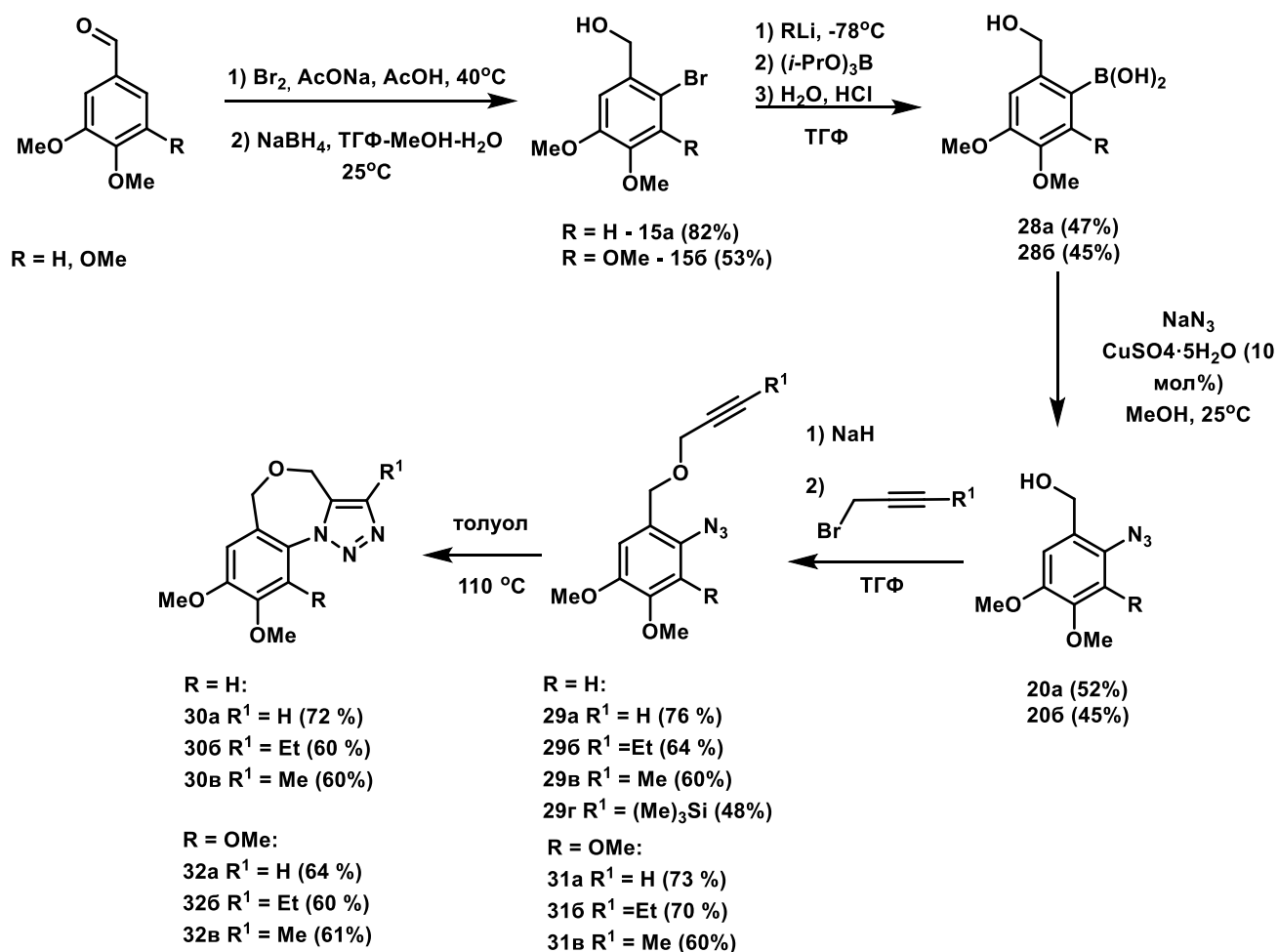


Схема 11. Синтез целевых трициклических триазолов.

Последующее проведение реакции диполярного [3+2]-циклоприсоединения Хьюсгена приводило к трициклическим продуктам **30** и **32** с выходами 60-72%. Реакции Хьюсгена с соединением **29г** проходит с отщеплением триметилсилильной группы и образованием продукта **30а**.

Цитотоксичность синтезированных соединений определена *in vitro* на клеточных линиях *ВхРС-3* (клетки панкреатического рака поджелудочной железы человека), *ТЗМ4* (клетки рака поджелудочной железы человека). Исследования проводились с использованием МТТ-теста после выдерживания клеток с исследуемыми соединениями в течение 72 часов.

Таблица 4. Цитотоксичность полученных триазолов.

№	IC ₅₀ , μM	
	ВхРС-3	ТЗМ4
30а	>100	>2
30б	>50	>10
30в	>10	>100
32а	>50	2
32б	10	4
32в	10	2

Показано, что три соединения (**32а**, **32б** и **32в**) демонстрируют цитотоксичность в низких микромолярных концентрациях (IC₅₀ = 2 и 4 μM) по отношению к клеткам ТЗМ4.

3. Синтез бензо[*b*]оксепиновых производных колхицина.

В соответствии с ретросинтетической схемой 12, бензо[*b*]оксепин **33** может быть получен из енина **34**, который доступен из иодоколхинола **35**, синтезируемого в 2 стадии из природного колхицина **36**.

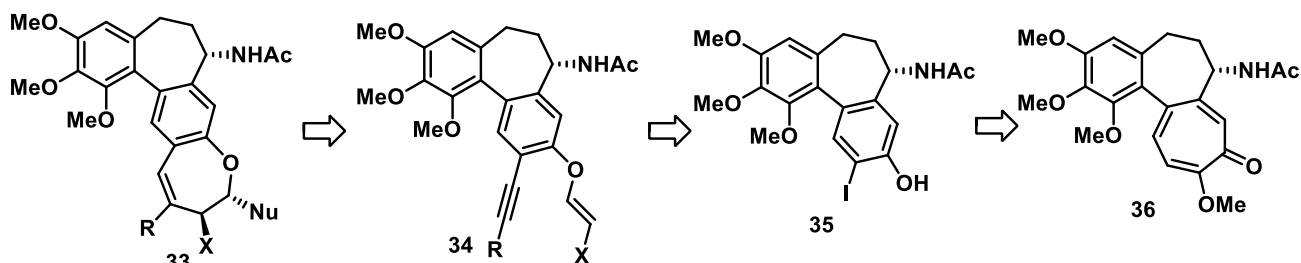


Схема 12. Ретросинтетическая схема синтеза соединений **33**.

На первой стадии из колхицина **36** был получен колхицеин **37** по реакции с 0.1M соляной кислотой. При этом происходит удаление метильной группы в трополоновом цикле колхицина. На второй стадии из полученного колхицеина **37** синтезировали иодколхинол **35**. Для этого провели превращение трополонового цикла колхицеина **37** в шестичленный цикл в условиях Виндауса: в данных условиях происходит сужение семичленного цикла под действием щелочи и его иодирование в присутствии I₂/NaI (схема 13).

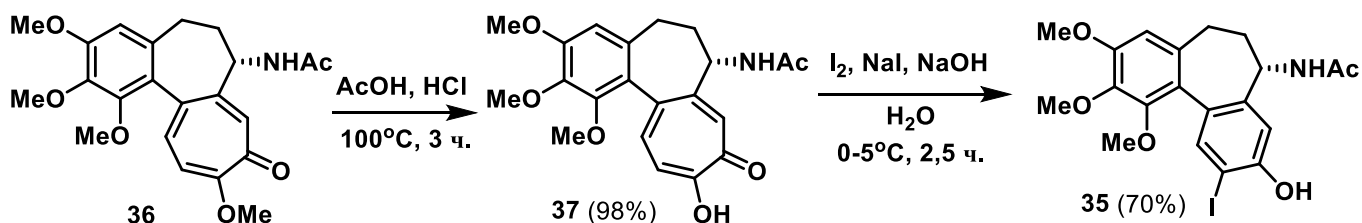
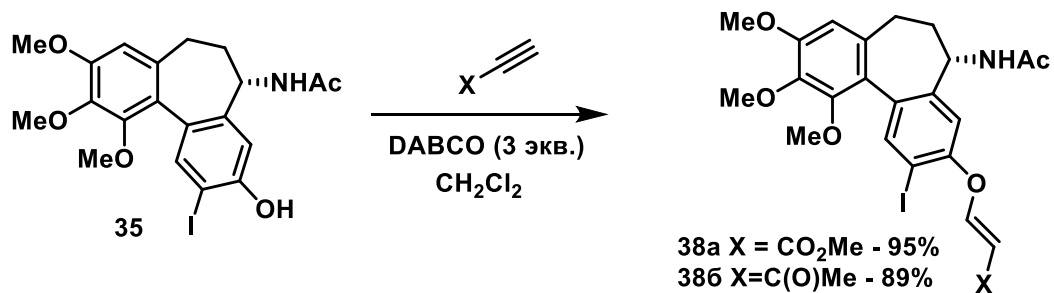


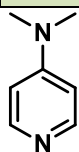
Схема 13. Синтез иодколхинола.

Далее по реакции иодколхинола **35** с терминальными алкинами в присутствии основания были получены виниловые эфиры иодколхинола **38**. На этой стадии проводилась оптимизация условий: использовались различные основания, растворители, а также менялись температура проведения реакции и время её протекания (таблица 5). В качестве модельного соединения использовался метилпропионат.

Таблица 5. Оптимизация условий реакции гетеро-Михаэля



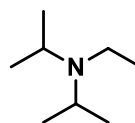
№	Основание	Растворитель	T, °C	Время проведения, сут	Выход, %
1	DABCO (0.1 экв)	CH ₂ Cl ₂	25	1	-
2		ТГФ			-
3	DABCO (0.3 экв)	CH ₂ Cl ₂	40	1	-
4		толуол	25	2	-
5			25	1	-
6	DIPEA (0.3 экв)	CH ₂ Cl ₂	25	1	-
7	DMAP (0.5 экв)	CH ₂ Cl ₂	25	1	-
8		ДМФА	40	2	-
9			25	1	-
10	DABCO (1 экв)	CH ₂ Cl ₂	25	2	≈10%
11	DABCO (3 экв)	CH ₂ Cl ₂	25	3	95



DMAP



DABCO



DIPEA

Оптимизированные условия реакции (3 эквивалента DABCO, проведение реакции при комнатной температуре в течение 3-х суток в CH_2Cl_2) были использованы для синтеза двух виниловых эфиров иодколхинола **38a** и **38б** с выходами 95 и 89% соответственно (табл. 5).

На следующей стадии была осуществлена реакция кросс-сочетания Соногаширы, проходящая в присутствии каталитических количеств соли Cu(I) и палладиевого металлокомплекса, с образованием алкинилсодержащих аллоколхициноидов **39** и **40** (схема 14). Для этого проводили оптимизацию условий синтеза: использовали различные катализаторы, основания, растворители, и температуру проведения реакции. Оптимизированные условия ($\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{Ph}_3\text{P}/\text{CuI}$ и AcOK в качестве основания, температура проведения 40°C) были использованы для синтеза ряда соединений с разнообразными заместителями при тройной связи.

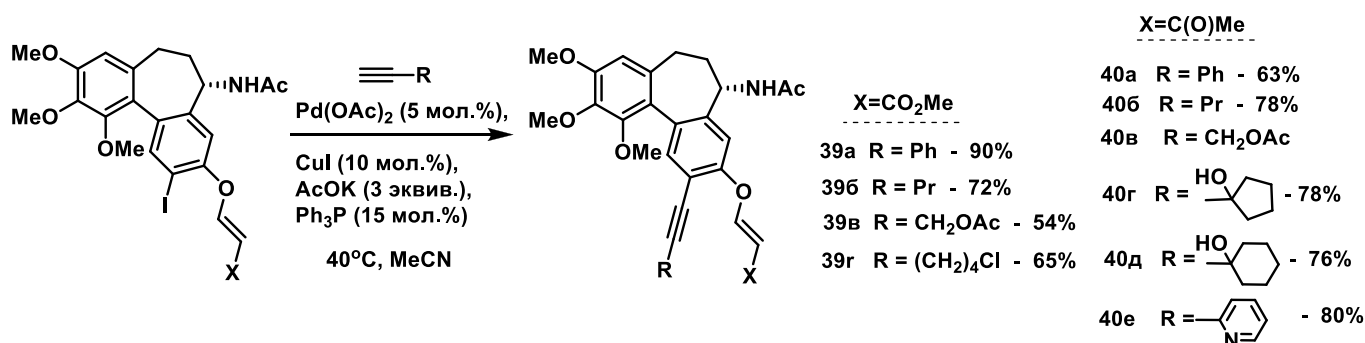


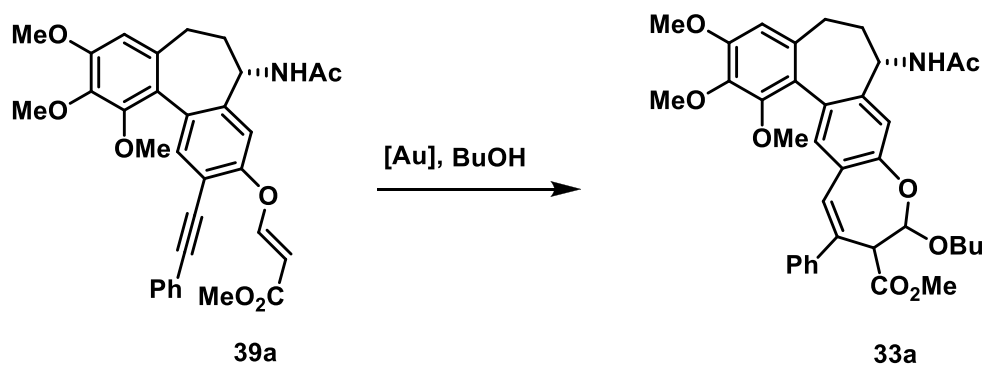
Схема 14. Синтез алкинилсодержащих аллоколхициноидов **39-40**.

На последнем этапе нами проводилась оптимизация условий золото-катализируемых превращений колхициноидов **39** и **40** в бензо[*b*]оксепиновые производные **32** (таблица 6): использовались различные катализаторы (5 мол.% $\text{Ph}_3\text{PAuNTf}_2$, $(\text{C}_6\text{F}_5)_3\text{PAuNTf}_2$, $\text{Ph}_3\text{PAuSbF}_6$), растворители, а также менялись температура проведения реакции и количество BuOH . В качестве модельного соединения использовался енин **39a**.

При использовании предварительно синтезированного катализатора продукт не был получен ни в одном из случаев (таблица 6, опыты.1-16). При получении катализатора *in situ* и его добавления в реакционную смесь без предварительной очистки выход продукта становится существенным (25-60%) (таблица 6, опыты.17-21)⁴. Проведение реакции без доступа света существенно повышает выход реакции (видимо, за счёт повышения времени жизни катализатора).

⁴Использование SbF_6^- – аниона повышает выход реакции (его очень слабая нуклеофильность облегчает стадию активации тройной связи катионным комплексом золота LAu^+); использование намного более акцепторного лиганда ($(\text{C}_6\text{F}_5)_3\text{P}$ вместо Ph_3P) такого эффекта не даёт, предположительно, из-за стерической затруднённости активации тройной связи на первой стадии реакции.

Таблица 6. Оптимизация условий реакции циклизации соединения **39a**.



№	Катализатор (5 мол. %)	Растворитель	T, °C	BuOH, эквив.	Выход, %
1	Ph ₃ PAuNTf ₂	1,2-дихлорэтан	25	2	-
2			70	2	-
3			25	1.5	-
4		толуол	25	2	-
5			70	2	-
6			25	2	-
7			25	2	-
8	(C ₆ F ₅) ₃ PAuNTf ₂	1,2-дихлорэтан	25	2	-
9			60	2	-
10		ТГФ	25	2	-
11		толуол	70	2	-
12		дихлорметан	40	2	-
13	Ph ₃ PAuSbF ₆	1,2-дихлорэтан	25	2	-
14			60	1.5	-
15		ТГФ	25	2	-
16		дихлорметан	40	2	-
17	Ph ₃ PAuCl + AgSbF ₆ в темноте	1,2-дихлорэтан	25	2	60
18	Ph ₃ PAuCl + AgNTf ₂ в темноте	1,2-дихлорэтан	25	2	42
19	Ph ₃ PAuCl + AgSbF ₆	1,2-дихлорэтан	25	2	25
20	(C ₆ F ₅) ₃ PAuCl +	дихлорметан	25	2	48
21	AgSbF ₆ в темноте	1,2-дихлорэтан	25	2	52

Оптимизированные условия реакции (каталитическая система: Ph₃PAuCl/AgSbF₆, 2 эквивалента спирта, 1,2-дихлорэтан в качестве растворителя, проведение реакции при комнатной температуре в темноте) были использованы для синтеза семи новых аллоколхициноидов, которые были получены с хорошими – умеренными выходами

(рисунок 2). При использовании в качестве субстрата этой реакции соединений **40в** в данных условиях получить целевые продукты не удалось.

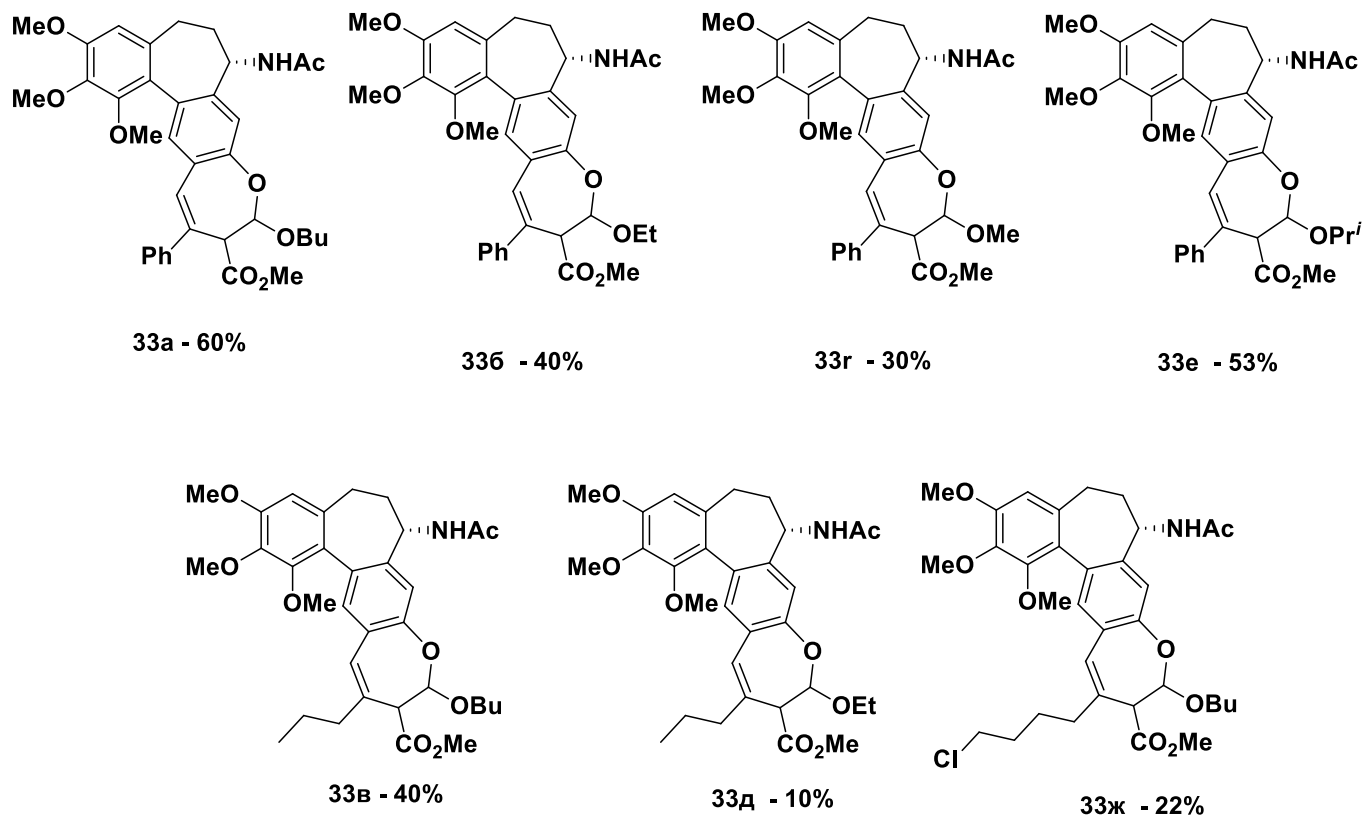


Рисунок 2. Целевые соединения **33**.

Мы предполагаем⁵, что на первом этапе (схема 15), очевидно, происходит координации комплекса Au^{1+} на тройную связь субстрата **39**. Электронодефицитная тройная связь в комплексе **A** подвергается 6-эндо-диг циклизации с образованием пентациклического золотоорганического интермедиата **B**, содержащего замещенный циклопропановый фрагмент. Последующая нуклеофильная атака приводит к расширению циклопропил-содержащего бициклического фрагмента с образованием интермедиата **C**. Дальнейший протонолиз завершается образованием целевого аллобензоксепина и регенерации катализатора.

⁵ J. Liu, Y. Liu // Org. Lett. – 2012. – V.14. – P.4742-4745.

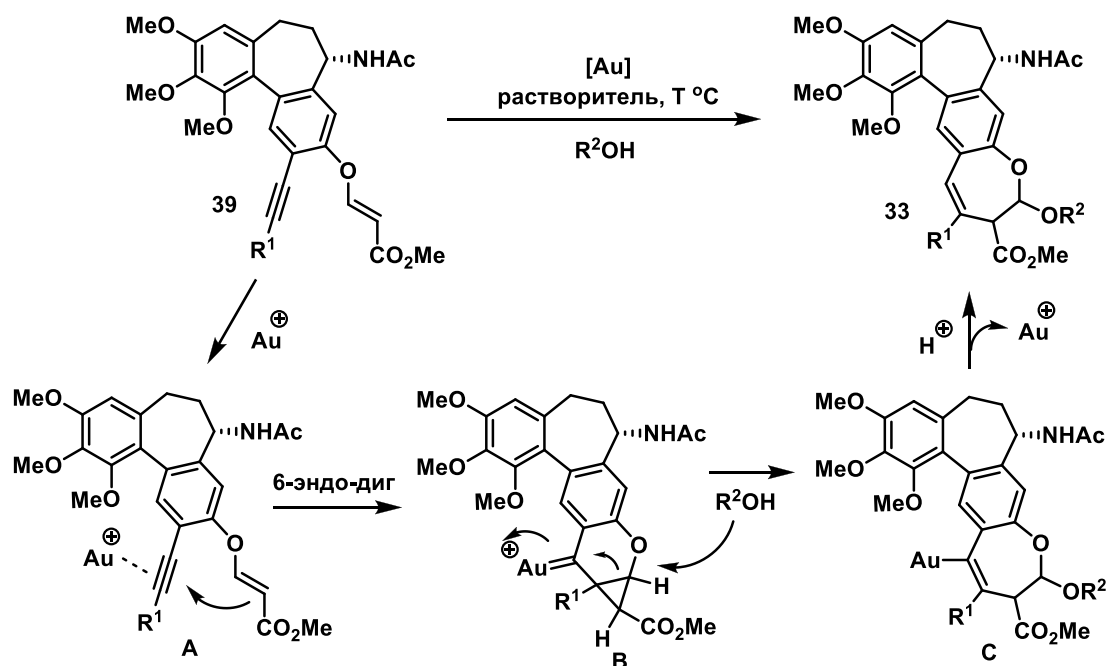


Схема 15. Механизм внутримолекулярной циклизации соединений **39**.

Цитотоксичность полученных соединений была определена *in vitro* на клеточных линиях *HEK293* (клетки почек эмбрионов человека), *PANC-1* (опухолевые клетки протоков поджелудочной железы человека), *Colo357* (клетки рака поджелудочной железы человека), *HeLa* (клетки раковой опухоли шейки матки человека), *Colon26* (опухолевые клетки эпителия толстого кишечника мышей). Исследования проводились с использованием МТТ-теста. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7. Цитотоксичность полученных соединений.

Соединение	IC ₅₀ , μM				
	<i>HEK293</i>	<i>PANC-1</i>	<i>Colo357</i>	<i>HeLa</i>	<i>Colon26</i>
33а	3	3	2	2	2
33б	1	3	0.6	0.5	0.1
33в	2	3	4	3	2
33г	0.5	4	0.5	0.5	0.5
33д	0.2	0.8	10	2	3
колхицин	0.006	0.03	0.004	0.02	0.006

Показано, что все полученные соединения демонстрируют цитотоксичность в низких микромолярных концентрациях (IC₅₀ = 0.14 – 4.15 μM) по отношению к используемым клеточным линиям, хотя и меньшую, чем колхицин.

ВЫВОДЫ

1. Предложен новый метод синтеза изокомбретастатинов в 5 стадий, исходя из коммерчески доступного 3,4,5-триметоксибензальдегида с применением в качестве ключевой стадии каталитической реакции Негиши. Установлено, что некоторые из полученных соединений проявляют *in vitro* цитотоксическую активность в низких наномолярных концентрациях по отношению к клеточным линиям *Jurkat*, *K562*, *Colo357* и *A549*.

2. Разработана методика синтеза триазольных аналогов колхицина в шесть стадий, исходя из коммерчески доступных метоксифенилальдегидов с использованием термической внутримолекулярной реакции Хьюсгена в качестве ключевой стадии. Установлено, что триметоксизамещенные производные **32** демонстрируют цитотоксичность в низких микромолярных концентрациях ($IC_{50} = 2$ и $4 \mu M$) по отношению к клеткам *T3M4* и *BxPC-3*.

3. Разработана методика синтеза бензо[*b*]оксепиновых производных колхицина в 5 стадий, исходя из коммерчески доступного колхицина. Ключевой стадией синтеза является внутримолекулярная циклизация в присутствии комплекса золота (I). Получены семь новых производных, проявляющих цитотоксическую активность в низких микромолярных концентрациях и субмикромолярных концентрациях по отношению к клеткам *HEK293*, *PANC-1*, *Colo357*, *HeLa*, *Colon26*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Malysheva, Yu.B. Negishi Cross-Coupling Reaction as a Route to Isocombretastatins / Yu.B. Malysheva, **S.Y. Buchvalova**, E.V. Svirshchevskaya, V.V. Fokin, A.Y. Fedorov // *Synlett* – 2013 – I.24. – P.1772-1776.

2. **Бухвалова, С.Ю.** Синтез Полиметоксизамещенных Триазолсодержащих Бензоксазепинов / С.Ю.Бухвалова, М.А.Иванов, Ю.Б.Малышева, А.Ю.Федоров // *Журнал органической химии* – 2016 – Т. 52. – Вып. 10 – С.1489-1496.

3. Malysheva, Yu.B. Negishi Cross-Coupling Reaction as a Route to Isocombretastatins / Yu.B. Malysheva, **S.Y. Buchvalova**, E.V. Svirshchevskaya, V.V. Fokin, A.Y. Fedorov // Всероссийская молодежная конференция-школа с международным участием «Достижения и проблемы современной химии», Санкт-Петербург – 2014. – С.120.

4. **Бухвалова, С.Ю.** Синтез Полиметоксизамещенных Триазолсодержащих Бензоксазепинов / С.Ю.Бухвалова, М.А.Иванов, Ю.Б.Малышева, А.Ю.Федоров // Кластер конференций по органической химии «ОргХим-2016», Санкт-Петербург – 2016. – С.65.

5. **Бухвалова, С.Ю.** Региоселективный Синтез Полициклических Замещённых Бензо[*b*]Оксепинов / С.Ю. Бухвалова, А.А. Малеев, А.Ю. Фёдоров // XX Молодёжная школа-конференция по органической химии, Казань – 2017. – С.105.

6. A.A. Maleev., Antimitotical activity of novel functionalized colchicine analogues. A molecular docking study / A.A. Maleev, A.Yu. Fedorov, **S.Yu. Bukhvalova**, S.K. Ignatov // 6-th School-Conference on Atomistic Simulation of Functional Materials (ASFM 2017 Winter), 7–8 December 2017, Moscow / Book of Abstracts. – 2017. – P.23.

7. А.А. Малеев, Оценка биологической активности потенциальных антимитотических агентов - бензоксепинсодержащих аналогов колхицина методом молекулярного докинга / А.А. Малеев, **С.Ю. Бухвалова**, А.Ю. Федоров, С.К. Игнатов // XXI всероссийская конференция молодых ученых - химиков (с международным участием) 15-17 мая, Нижний Новгород / Сборник тезисов. – 2018. – С.342.

Благодарности

Автор выражает благодарность к.х.н. Малышевой Ю.Б., к.х.н. Ситникову Н.С., к.х.н. Нючеву А.В. – за помощь в работе в лаборатории, Щегравиной Е.С., Грачёвой Ю.А. за регистрацию и помощь в расшифровке ЯМР-спектров (все КОХ ННГУ), к.б.н Е.В. Свирцевской (ИБХ РАН) за проведение биологических исследований.