

На правах рукописи



Щегравина Екатерина Сергеевна

**НОВЫЕ НЕРАЦЕМИЧЕСКИЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ
АЛЛОКОЛХИЦИНОИДЫ И НАНОЧАСТИЦЫ НА ИХ ОСНОВЕ:
ДИЗАЙН, СИНТЕЗ, ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ**

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:** **Щекотихин Андрей Егорович**
Доктор химических наук, профессор РАН, директор федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Климочкин Юрий Николаевич
Доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой органической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный технический университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук

Защита диссертации состоится «06» декабря 2019 года в 14-00 часов на заседании объединённого диссертационного совета Д 999.130.02 на базе Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и Института металлорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН по адресу: 603950, Нижний Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, 23, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/files/2019/971/diss-Schegravina-971.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года

Учёный секретарь диссертационного совета,



А.В. Гущин, доктор химических наук, профессор

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема высокой смертности от онкологических заболеваний остро стоит во всех странах. Рак удерживает второе место по распространенности среди неинфекционных заболеваний. По данным Всемирной Организации Здравоохранения в 2015 году во всем мире от злокачественных заболеваний умерло 8,8 млн человек, причем почти треть – в молодом или среднем возрасте. Наибольший риск смертности наблюдается в странах с низким или средним уровнем достатка; в России он один из самых высоких – 29,9%.

Круг применяемых в клинической практике противоопухолевых средств сильно ограничен. Одной из ключевых мишеней в химиотерапии рака является клеточный белок тубулин, ответственный за процесс деления клеток (митоз), внутриклеточный транспорт и метастазирование опухолей. Соединения, действующие как антимитотические агенты, представлены в клинической практике, в основном, *Vinca*-алкалоидами и таксанами. Они имеют значительные побочные эффекты, оказывающие воздействие на многие системы органов (нейро- и кардиотоксичность, угнетение функций ЖКТ, полиорганная недостаточность). Также стоит упомянуть о высокой стоимости данных препаратов вследствие сильной ограниченности их природных источников и отсутствием промышленно релевантных синтетических методов их получения. Кроме указанных недостатков у противоопухолевых средств, используемых в клинической практике, существует еще одна нерешенная проблема – возникновение множественной лекарственной устойчивости опухолей (МЛУ). Это явление характеризуется множеством механизмов возникновения и проявляется при использовании распространенных агентов противоопухолевой терапии – паклитакселя и винкристина.

Природный алкалоид колхицин также способен взаимодействовать с тубулином и является антимитотическим агентом. Колхицин применяется в терапии средиземноморской лихорадки и острого подагрического артрита, однако применение колхицина в качестве агента химиотерапии онкозаболеваний ограничено вследствие высокой системной токсичности.

Токсическое действие колхицина основано на разрушении нормальной сети микротрубочек цитоскелета, что приводит к а) нарушению синтеза белка в аппарате Гольджи; б) изменению клеточной формы; в) угнетению клеточной подвижности и внутриклеточного транспорта; г) остановке митоза и индукции апоптотических процессов; д) нарушению проводимости и сократимости кардиомиоцитов, что приводит к заболеваниям сердечно-сосудистой системы.

Поскольку мишенью для колхицина является белок тубулин, который присутствует во всех клетках организма, то токсическое действие колхицина распространяется не только на опухолевые, но и на здоровые клетки различных тканей и органов. Продолжительное токсическое действие (острый период

наблюдается около трех недель) объясняется характером связывания колхицина с тубулином – период полураспада комплекса белок-лиганд составляет около 35 часов. Изменение характера взаимодействия, а именно быстрое образование комплекса и его диссоциация, позволят снизить общую токсичность препарата и усилить его антивазкулярные свойства. Кроме того, одним из эффективных методов снижения токсичности является инкапсулирование активного препарата в наноразмерные системы доставки, высвобождающие лекарство под действием определенных факторов (температура, pH среды, облучение, ультразвук, действие ферментов).

Степень разработанности темы. Несмотря на то, что колхицин давно является объектом исследования в органической и медицинской химии, к настоящему времени получен лишь узкий круг его гетероциклических производных, а инкапсулирование колхициноидов в наночастицы для доставки к опухолевым тканям изучена на единичных примерах. Наиболее системные исследования по химии колхициноидов ведутся в научной группе профессора Г.Г. Шмальца (Кельнский университет, Германия), где разработаны и синтезированы молекулы-лиганды колхицинового сайта тубулина, проявляющие высокую антипролиферационную активность. Большой вклад в развитие химии природных соединений, в том числе алкалоидов колхицинового ряда, внесли такие выдающиеся ученые как Арнольд Бросси (Arnold Brossi) и Оливер Бойе (Olivier G. Boyé).

Целью диссертационного исследования является создание универсальных методов синтеза нерацемических гетероциклических колхициноидов, проявляющих противоопухолевую активность. Было предложено несколько стратегий формирования гетероциклического (пиррольного и фуранового) фрагментов, базирующихся на применении перициклических реакций, а также реакций кросс-сочетания. Применение данных подходов позволило получить более 40 новых гетероциклических колхициноидов, относящихся к пяти структурным типам (Рис. 1):

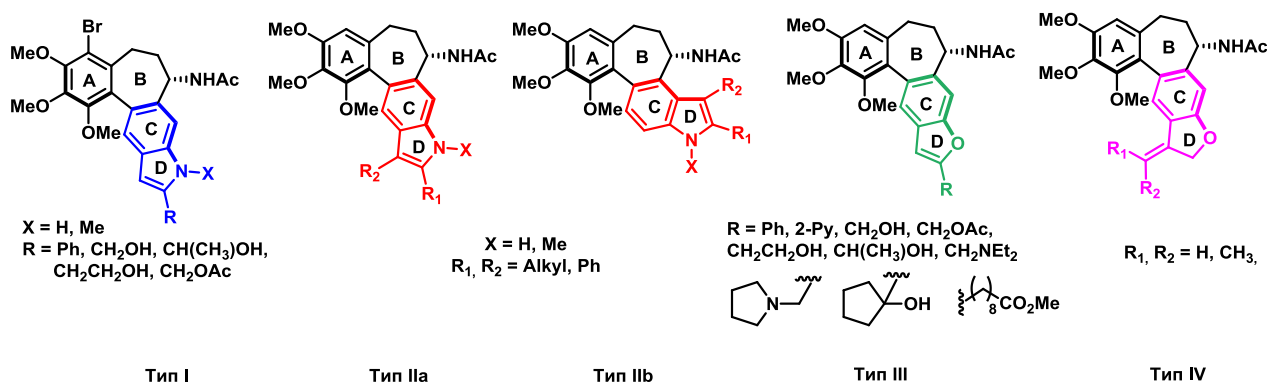


Рисунок 1. Целевые гетероциклические колхициноиды структурных типов I – IV

Была изучена цитотоксичность полученных соединений, выявлены наиболее перспективные соединения, для которых проведены исследования по влиянию на клеточный цикл, ингибированию полимеризации тубулина, а также тесты *in vivo*. Синтезированы фосфолипидные колхициноид-содержащие пролекарства, инкорпорированные в фермент-чувствительные терапевтические липосомы.

Таким образом, настоящая диссертационная работа посвящена: 1) разработке новых подходов к созданию библиотек гетероциклических аллоколхициноидов - антимитотических агентов колхицинового сайта; 2) дизайну липидных пролекарственных форм наиболее перспективных соединений и созданию терапевтических наночастиц на основе данных пролекарств с целью снижения системной токсичности интактных противоопухолевых препаратов.

Научная новизна.

1. Разработаны и реализованы подходы к получению первых нерацемических колхициноидов с гетероциклическим кольцом D.

2. Анализ корреляции «структура – биологическая активность» выявил наиболее важные фармакофорные фрагменты, ответственные за связывание с белком тубулином, на основе чего были синтезированы соединения с цитотоксической активностью в низком наномолярном и субнаномолярном диапазонах концентраций.

3. Синтезирован гидрофураноаллоколхициноид на порядок более активный по сравнению с природным колхицином, но при этом ~ в 6 раз менее токсичный ($LD_{50} = 30$ мг/кг). Для комплекса этого производного с тубулином проведен РСА, установлены аминокислотные остатки, образующие контакты с колхициноидом.

4. Впервые были синтезированы фосфолипидные колхициноид-содержащие пролекарства; получены их энзиматически-расщепляемые липосомальные формы. Данные наночастицы устойчивы в биологических средах и обладают сниженной токсичностью по сравнению с интактными молекулами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны общие методы синтеза нерацемических пирроло-, фурано- и дигидрофураноаллоколхициноидов, позволяющих получать активные молекулы-лиганды колхицинового сайта тубулина, проявляющие сниженную токсичность по сравнению с колхицином. Установлены важные для связывания с белком фармакофорные группы, что послужит ориентиром для синтеза новых антимитотических препаратов колхицинового ряда. Созданы первые липидные пролекарства колхициноидов и терапевтические наночастицы на их основе, что позволит в дальнейшем разработать эффективную систему таргетной доставки колхициноидов к поврежденным тканям и в перспективе снизить токсичность препаратов и внедрить соединения колхицинового ряда в практику противоопухолевой химиотерапии.

Методология и методы исследования. При выполнении диссертационной работы были использованы современные методы тонкого органического синтеза,

включая реакции каталитического кросс-сочетания. При работе с веществами, чувствительными к кислороду воздуха и влаге, реакции проводились с использованием техники Шленка в инертной атмосфере. Состав и строение новых соединений было подтверждено методами ЯМР, ИК, масс-спектропии, элементного анализа, очистка соединений проводилась с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Оценка активности полученных соединений проводилась с использованием МТТ-теста, испытаний *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту.

1. Экспериментальные данные о синтезе 42 новых аллоколхициноидов.
2. Результаты исследования биологической активности (*in vitro/in vivo*) полученных гетероциклических аллоколхициноидов.
3. Дизайн липидных пролекарств на основе колхициноидов и лизофосфатидилхолина и экспериментальные данные по их синтезу.
4. Результаты исследования характеристик терапевтических липосом, их цитотоксических свойств, устойчивости в различных средах, способности к энзиматическому расщеплению.

Личный вклад автора. Синтез всех новых соединений, представленных в диссертации, выполнен в полном объеме диссертантом лично. Соискатель принимал участие в постановке цели и задач исследования, разработке структур целевых биологически активных молекул и подходов к их получению, анализе данных биологических испытаний молекул и обобщении полученных результатов. Подготовка публикаций проводилась совместно с научным руководителем и соавторами работ.

Степень достоверности полученных результатов. Строение всех синтезированных в работе соединений подтверждены с использованием современных физико-химических методов, таких как ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия. Цитотоксическая активность соединений была определена с применением МТТ-теста, анализ клеточного цикла проводился методом проточной цитометрии, индукция апоптоза, образование апоптотических телец и краткосрочные эффекты фиксировались с помощью конфокальной микроскопии. Анализ размеров терапевтических наночастиц проводили с помощью динамического светорассеивания, распределение пролекарств в липидном бислое и установление их оптимальной геометрии проводили с использованием метода молекулярной динамики.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены в ходе ряда международных, всероссийских и региональных конференций: 18 конференция молодых ученых-химиков Нижегородской области (РФ, г. Н. Новгород, 2015); Dombay Organic Conference Cluster DOCC-2016 (РФ, Домбай, 2016); 20th European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2017) (Cologne, Germany, 2017); Оргхим-2016 (РФ, г. Санкт-Петербург, 2016); Winter school of organic chemistry WSOC-2017 (РФ, Красновидово, 2017); 22 Сессия молодых

ученых, (РФ, г. Арзамас Нижегородской обл., 2017); V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии (РФ, г. Владикавказ, 2018); Markovnikov congress on organic chemistry MC-150 (РФ, г. Казань, 2019).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах *J. Med. Chem.* и *Bioconjugate Chem.* (ACS), *Eur. J. Org. Chem.* (Wiley), *Eur. J. Med. Chem.* (Elsevier), *Synthesis* (Thieme), входящих в международные базы данных, а также 3 патента Российской Федерации.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, списка условных обозначений и сокращений, списка литературы, списка рисунков, таблиц и схем, приложения. Работа изложена на 191 странице машинописного текста и включает в себя 66 рисунков, 80 схем, 18 таблиц. Список литературы включает 347 наименований.

Соответствие диссертации паспорту специальности. Изложенный материал соответствует пунктам: 1. «Выделение и очистка новых соединений», 3 «развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», 7 «Выявление закономерностей типа «структура – свойство» паспорта специальности 02.00.03 – «Органическая химия».

Благодарности. Автор выражает благодарность к.б.н. сотруднику лаборатории межклеточных взаимодействий ИБХ РАН Свирщевской Е. В., за проведение биологических испытаний, д.х.н. Водовозовой Е.Л., к.х.н. Болдыреву И.А. и асп. Третьяковой Д.С. - сотрудникам лаборатории химии липидов ИБХ РАН за помощь в работе по созданию пролекарственных форм колхициноидов, проф. Шмальцу Г.Г. за возможность стажировки в Кельнском университете и выполнению работ по синтезу пирролоаллоколхициноидов, Др. Себастьяну Комбу за проведение биологических исследований, проф. Бенуа Жиганту за помощь в работе по получению рентгенограммы комплекса тубулина с колхициноидами, д.х.н. Гришину И.Д. и к.х.н. Фаерману В.И. за регистрацию масс-спектров, к.х.н. Малышевой Ю.Б. за регистрацию ЯМР-спектров.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез и биологическая активность пирролоаллоколхициноидов I

Целью данной части работы являлась разработка методов получения пирролоаллоколхициноидов структурного типа I исходя из коммерчески доступного (*aR*, 7*S*)-колхицина с сохранением центральной и аксиальной хиральности.

незначительному улучшению цитотоксических свойств полученных производных¹. Далее было проведено сокращение трополонового цикла под действием метилата натрия, в результате чего были получены кислоты **4a,b** с выходами 36% и 85% соответственно. Производное **4b** подвергалось перегруппировке Курциуса, что приводило к амину **5** (60%), из которого в результате селективного иодирования с применением NIS получали *o*-иодоанилин **6** с выходом 70%. После введения в колхициноид **6** трифторацетильного фрагмента, производное **7** подвергалось каскадной каталитической циклизации по Лароку², что приводило к целевым пирролоаллоколхициноидам **8a-e** с хорошими выходами (Схема 2, направление А).

Исходя из колхициноида **7** нами в три стадии был получен *N*-метил замещенный пирролоаллоколхициноид **8f** с суммарным выходом 28% (схема 2, направление В).

Для всех полученных пирролоаллоколхициноидов определена цитотоксическая активность по отношению к клеткам панкреатической аденокарциномы Colo-357 и MiaPaCa-2, а также к клеткам эмбрионального почечного эпителия HEK-293 (таблица 1).

Таблица 1. Цитотоксичность^a синтезированных пирролоаллоколхициноидов **8a-f**, (IC₅₀, нМ)

Клеточная линия Соединение	Colo-357	HEK-293	MiaPaCa-2
Колхицин 1	20	7	8
8a	>4 000	20 000	4 000
8b	100	800	40
8c	320	100	200
8d	90	800	10
8e	500	800	160
8g	4	1	<1

^a Концентрация вещества, вызывающая ингибирование роста 50% клеточной культуры после инкубации в течение 72 часов. Тесты проводили трижды для каждого соединения, погрешность составляет <10%

Соединение **8f** проявляет цитотоксическую активность в нано- и субнанолярных концентрациях, ингибирует клеточный цикл в G2/M фазе. Установлено, что аллоколхициноид **8f** обладает более выраженной апоптоз-индуцирующей активностью по сравнению с колхицином **1** (24% и 12,5% соответственно). Исследуемые колхициноиды приводят к практически полному ингибированию полимеризации тубулина в течение 24 часов (рисунок 2).

¹ ACS Med. Chem. Lett. **2011**, 25, 348-352

² J. Am. Chem. Soc. **1991**, 113, 6689-6690

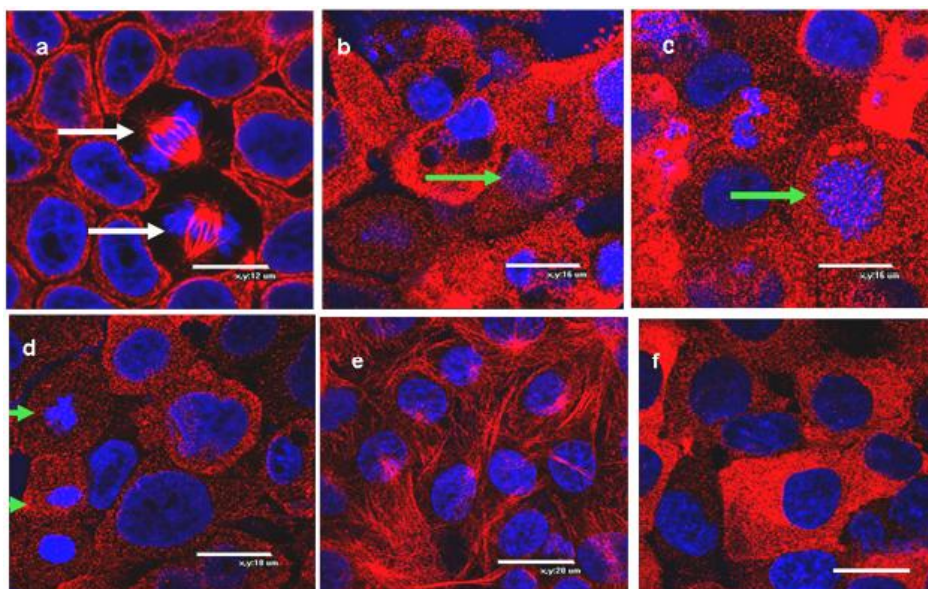


Рисунок 2. Распределение тубулина в клетках Colo-357. Клетки Colo-357 инкубировали без колхициноидов (слайды а, е) и с добавлением 5 μ М колхицина **1** (b), соединения **8b** (c), и соединения **8f** (d, f) в течение суток (a-d) и трех часов (e-f). Ядра окрашены красителем Ноеchst 33342 (синий). Масштаб фотографии 12-20 μ м.

Поскольку влияние колхицина и его производных на клеточный цикл и полимеризацию тубулина проявляется в полной мере через 20-24 часа, а первые побочные эффекты, связанные с нарушением работы ЖКТ, проявляются гораздо раньше, было изучено влияние соединения **8f** и колхицина на органеллы после 3 часов инкубации клеточной культуры. В качестве объекта исследования были выбраны клетки НТ-29 вследствие их наибольшей чувствительности к тестируемым препаратам. В данном случае как колхицин, так и аллоколхициноид **8f** вызывает увеличение потенциала митохондриальных мембран, а также перераспределение митохондрий вглубь цитоплазмы, хотя эффект от воздействия соединения **8f** менее выражен. Минимальные отличия выявлены по отношению к аппарату Гольджи, ЭПР и эндосомам. Обнаружено, что колхицин вызывает изменение мембранного потенциала лизосом, в то же время, колхициноид **8f** не оказывает на лизосомы значительного влияния.

2. Синтез и биологическая активность пирролоаллоколхициноидов II.

Нами предложен еще один способ получения нерацемических пирролоаллоколхицинов с применением в качестве ключевой стадии реакции Фишера (схема 3). В этом случае индольный фрагмент может быть образован по перициклической реакции гидразина **9** с кетонами (синтез индолов по Фишеру). Замещенный гидразин **9** доступен исходя из галоген- или псевдогалоген-аллоколхициноидов **10**, получаемых из колхицина **1**.

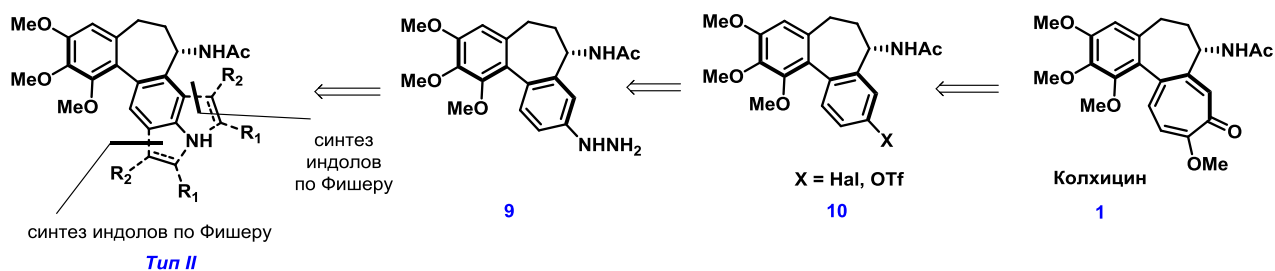


Схема 3. Ретросинтетическая схема получения аллоколхициноидов типа II

Вначале из колхицина **1** был синтезирован ариламин **3**, который по реакции Зандмейера был превращен в арилиодид **11** с выходом 60%. Последний вступал в реакцию Cu-катализируемого амидирования с *N*-Boc-защищенным гидразином. В этой реакции наряду с продуктом амидирования **12a** был получен продукт аминирования – гидразин **12b**. Колхициноид **12a** вступал в перициклическую реакцию Фишера с различными диалкилкетонами, что приводило к образованию пирролоаллоколхициноидов (таблица 2, №1-6).

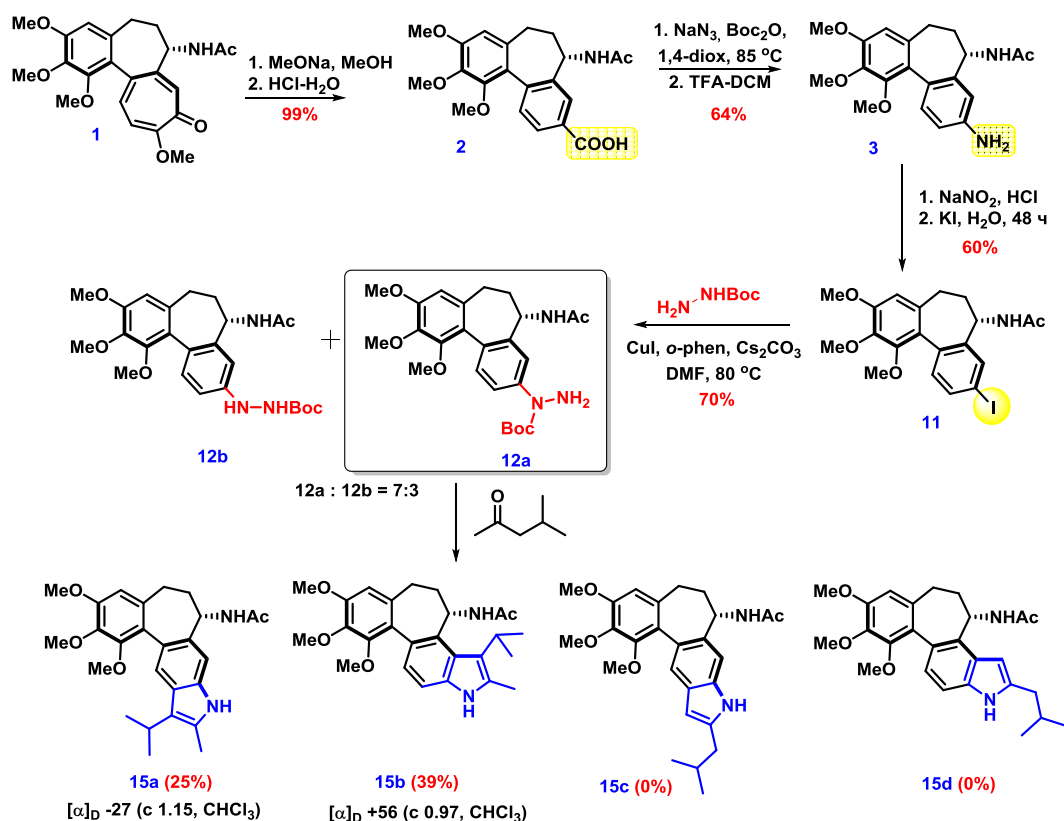
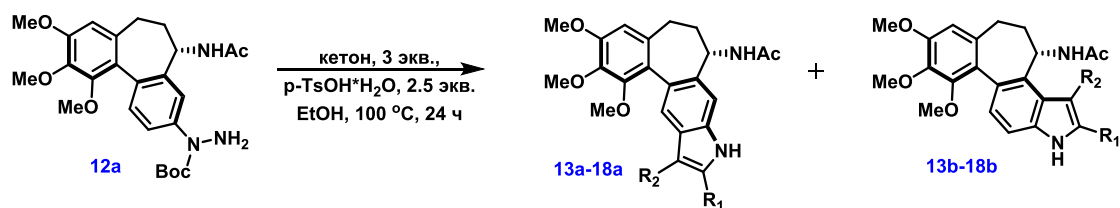


Схема 4. Синтез пирролоаллоколхициноидов по реакции Фишера

Во всех случаях было зафиксировано образование только двух (соединения **15a** и **15b** (Схема 4) из четырех возможных (соединения **15a-d**) диастереомерных пирролоаллоколхициноидов (Таблица 2).

Таблица 2. Синтез аллоколхициноидов II по реакции Фишера



№ п/п	Кетон	Продукты	Суммарный выход, %	Соотношение региоизомеров
1		13a 13b	73	13a/13b = 1 : 2.3
2		14a 14b	63	14a/14b = 1 : 3.2
3		15a 15b	64	15a/15b = 1 : 1.6
4		16a 16b	57	16a/16b = 1 : 2
5		17a 17b	57	17a/17b = 1 : 2
6		18a 18b	52	18a/18b = 1 : 2

Этот факт можно объяснить протеканием реакции через промежуточное образование «термодинамических» енаминовых интермедиатов **A** (верхняя часть Схемы 5), в результате перициклического процесса, приводящих к индолам **15a** и **15b**. Второе направление (нижняя часть Схемы 5), связанное с образованием енаминов **B** под кинетическим контролем, способных приводить к индолам **15c** и **15d**, в данных условиях не реализуется.

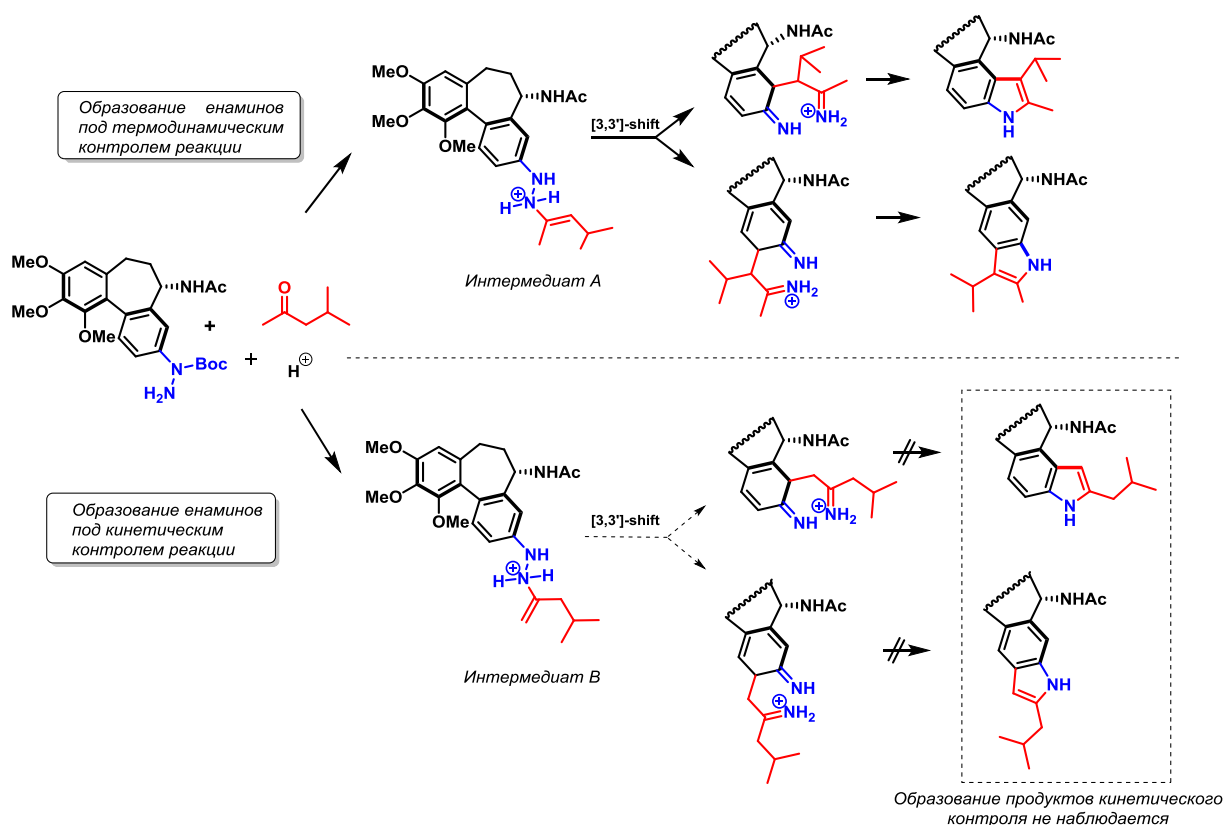


Схема 5. Объяснение региоселективности реакции индолизации по Фишеру

Доминантное образование более стерически затрудненного изомера (продукты серии “b”, таблица 2) можно объяснить возможностью дополнительной стабилизации ен-гидразина за счет образования водородной связи между атомом кислорода в ацетамидном фрагменте и водородом при положительно заряженном атоме азота (схема 6).

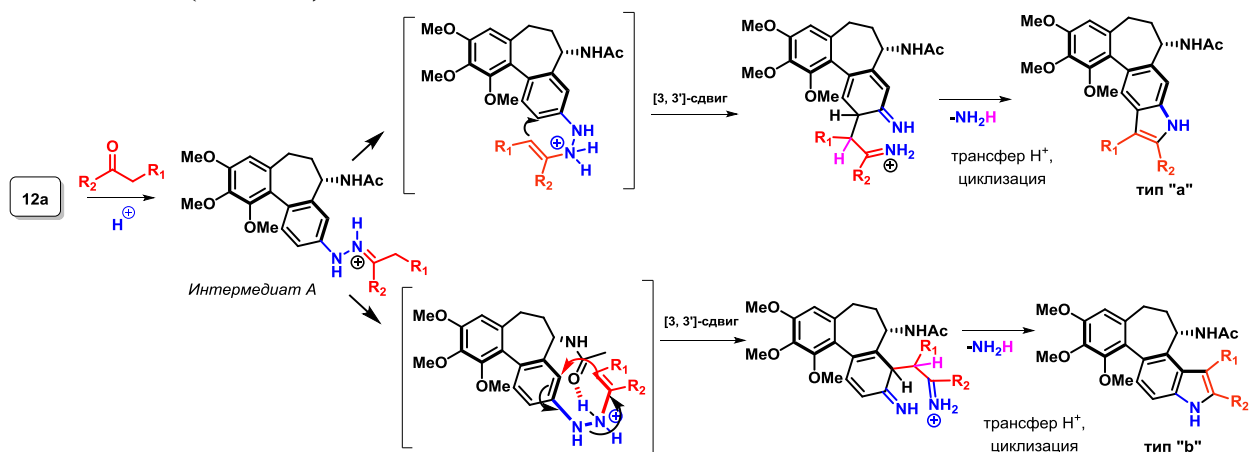


Схема 6. Возможное объяснение предпочтительного образования индолов серии “b”

Исходя из аллоколхициноидов **13a** и **13b**, нами получены *N*-метилованные аналоги **19a** и **19b** с выходами 67% и 94% соответственно (схема 7).

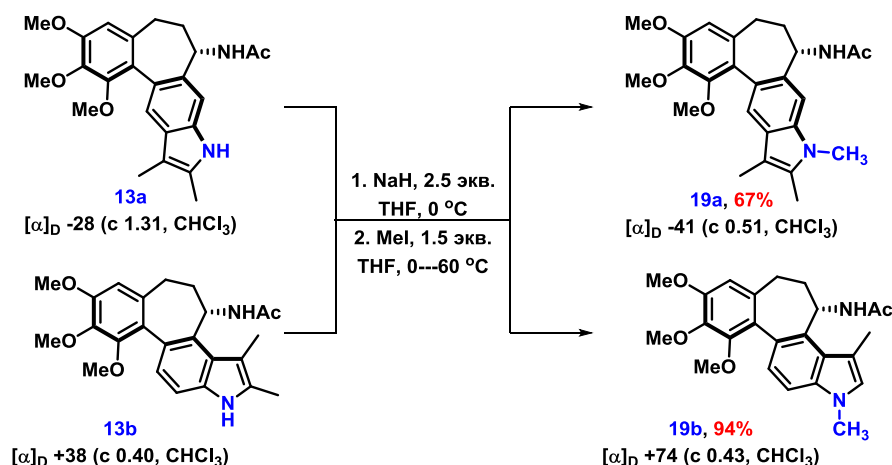


Схема 7. Получение метилированных индолов **19a** и **19b**.

Установлено, что пирролоаллоколхициноид **13b** с [2,3-*e*]-типом сочленения циклов *C* и *D* обладает большей цитотоксичностью по сравнению с региоизомером **13a** с [2,3-*f*]-сочленением (Таблица 3).

Таблица 3. Цитотоксические свойства пирролоаллоколхициноидов **13a, b** и их метилированных аналогов, IC₅₀^a, нМ

Соединение Клеточная линия	13a	19a	13b	19b
HEK-293	2000	1	160	4000
SKOV3	2000	5	800	2000

С другой стороны, в случае метилированных индолов, соединение **19a** с [2,3-*f*]-сочленением циклов *C* и *D* на 3 порядка более активно по сравнению с [2,3-*e*]-аналогом **19b**.

3. Синтез и биологическая активность аллоколхициноидов III.

Нами предложен метод, позволяющий синтезировать фураноаллоколхициноиды III в нерацемическом виде исходя из природного колхицина **1** в три стадии (схема 8).

На первом этапе проводили кислотный гидролиз метилового эфира колхицина с образованием колхицеина **20** с количественным выходом (схема 8). Колхицеин **20** в результате каскадного электроциклического сужения трополонового цикла/галогенирования превращали в иодоколхинол **21** с выходом 95%³. Последний вступал в реакцию кросс-сочетания Соногашира с терминальными алкинами с последующим *in situ* аннелированием, что приводило к фураноаллоколхициноидам **22a-j** с хорошими выходами.

³ *Heterocycles*, **2011**, 82, 1585-1600

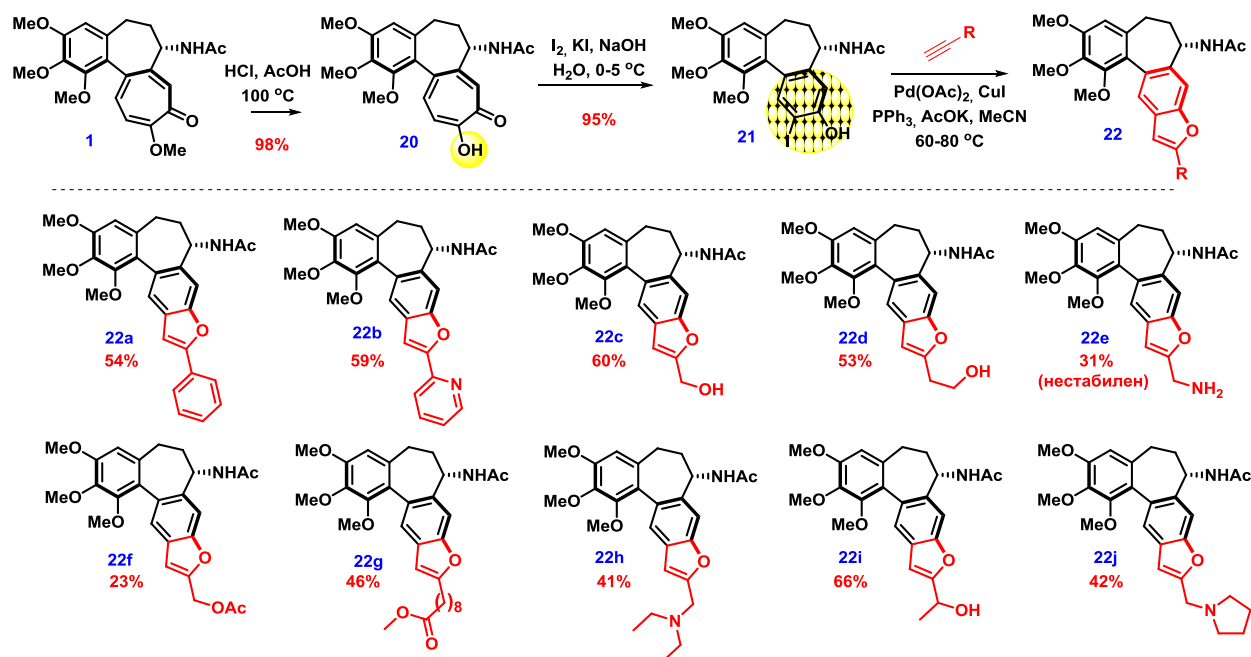


Схема 8. Синтез фураноаллоколхициноидов исходя из природного колхицина

Наиболее высокую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеточным линиям НЕК-293, Jurkat, AsPC-1, L929 и W1308 продемонстрировали соединения **22с** и **22i** (таблица 4), содержащие гидроксильную группу в псевдобензильном положении фуранового цикла (таблица 4)

Таблица 4. Цитотоксическая активность фураноаллоколхициноидов, IC₅₀, μM

Клеточная линия	22a	22b	22c	22d	22f	22g	22h	22i	22k
НЕК-293	>4	20	<0.02	0.8	0.8	nt	nt	<0.2	4
L929	>1	nt*	0.03	0.8	>1	nt	nt	0.2	8
Jurkat	4	20	<0.02	0.2	0.8	nt	nt	0.2	4
AcPC-1	20	20	<0.05	1	1	>100	nt	<0.2	4
W1308	8	10	<0.02	1	1	>100	>100	<0.2	8

* nt – не токсично

Показано, что соединение **22с** (рисунок 3а) ингибирует полимеризацию тубулина в субстехиометрических концентрациях с параметром R = 0.08 (мольное отношение общего количества ингибитора к общему содержанию тубулина в растворе). Колхициноид **22с** эффективно связывается с тубулином и останавливает клеточный цикл на стадии G2/M, что приводит к развитию позднего апоптоза.

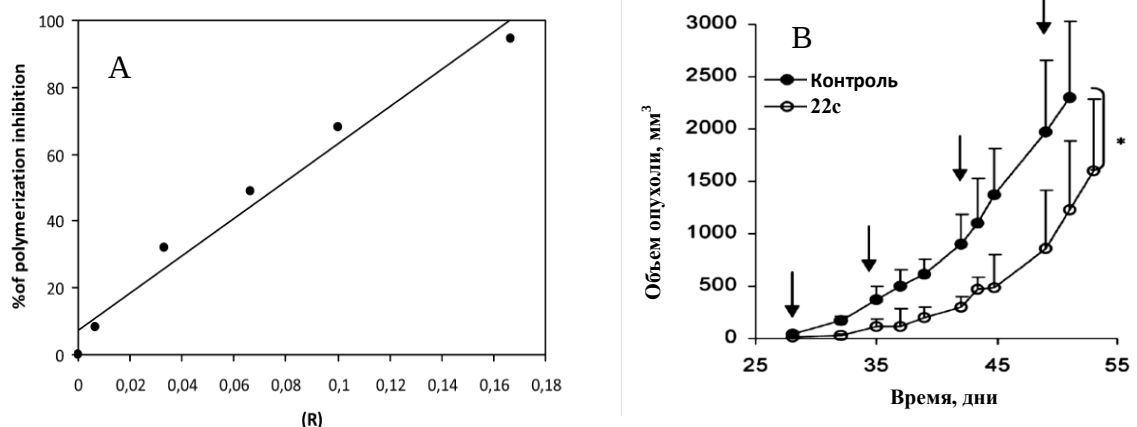


Рисунок 3. А. Ингибирование полимеризации тубулина под действием колхициноида **22c**. В. *In vivo* эффекты колхициноида **22c**. Снижение скорости роста опухоли молочной железы у мышей линии C57BL/6.

При проведении испытаний *in vivo* у мышей было зафиксировано значительное снижение роста опухоли по сравнению с контрольной группой (**рисунок 3b**). При этом у животных не наблюдалось неврологических симптомов, потери в весе, изменений в поведении и летальности. Таким образом, соединение **22c** обладает меньшей системной токсичностью по сравнению с колхицином.

4. Попытка синтеза сопряженных лактонов; Синтез и биологическая активность колхициноидов типа IV

Нами была сделана попытка получить колхициноиды, содержащие фрагмент акцептора Михаэля, способных к ковалентному связыванию с тубулином. Для этого иодо-колхинол **21** подвергали этерификации акриловыми кислотами с образованием эфиров **23a-e**, которые на следующем этапе не удалось превратить в сопряженные лактоны **23'** в условиях каталитической реакции Хека (Схема 9, направление 1). Колхициноид **21** вступал в реакцию Хека с метилакрилатом с образованием *E*-енона **24** с выходом 66%, который далее оказался не способным вступить в реакцию внутримолекулярного аннелирования (Схема 9, направление 2). С другой стороны, *Z*-енон **25'**, образующийся в результате кросс-сочетания производного **21** и *транс*-метилкротоната, подвергался переэтерификации *in situ* с образованием аллоколхицино-кумарина **25** (Схема 9, направление 3).

Алкилирование иодоколхинола **21** различными аллилбромидами приводило к образованию аллиловых эфиров **26a-d**, которые подвергались каталитической циклизации с формированием дигидрофуранового цикла *D*, содержащего экзократную связь при β -углеродном атоме (соединения **27a-d**, схема 9).

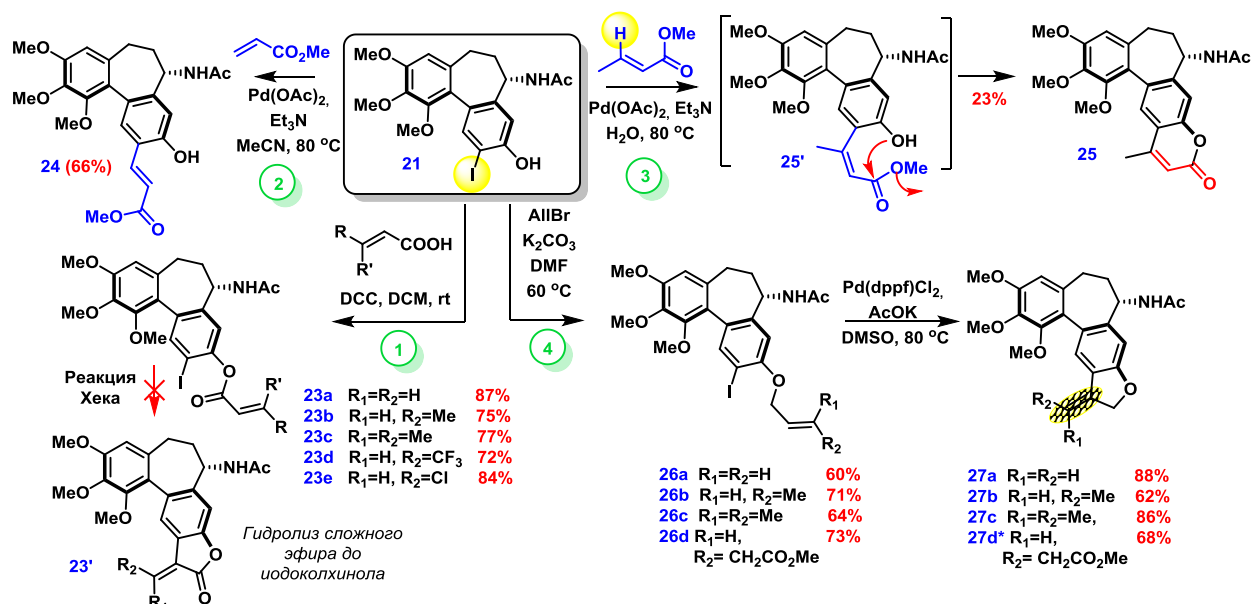


Схема 9. Синтез колхициноида, содержащего фрагмент акцептора Михаэля.

Установлено (таблица 5), что наибольшей цитотоксичностью в низких наномолярных или субнаномолярных концентрациях обладают колхициноид **27a** с незамещенной двойной связью и изомерный ему метилфуран **27e**. Учитывая легкость изомеризации и схожесть результатов МТТ-теста обоих соединений, вопрос о том, IC_{50} какого из соединений был определен в ходе эксперимента, остается открытым.

Таблица 5. Цитотоксичность колхициноидов, содержащих экзо C=C связь в цикле D, IC_{50} , нМ

Соединение	27a	27e	27b	27c	27d
Клеточная линия					
HaCaT	0.3	0.5	-*	-	800
Colon-26	1.3	0.3	0.9	160	800
HEK-293	0.8	5	3.8	478	-
Colo-357	1.7	1.3	17	528	800
PANC-1	0.8	2.1	32	800	-
HeLa	1.7	0.8	-	400	-
EL-4	0.3	-	-	-	-

* - исследование не проводилось

Для наиболее активного колхициноида **27a** был получен комплекс с тубулином и проведен РСА (рисунок 4). Изображение получено с разрешением 2.7 Å. Колхициноид образует контакты с аминокислотными остатками Ser178, Val181, Thr179, Ala180. Двойная связь ориентирована в направлении Thr314 и Met259 и находится на расстоянии 3.3 Å от метионина.

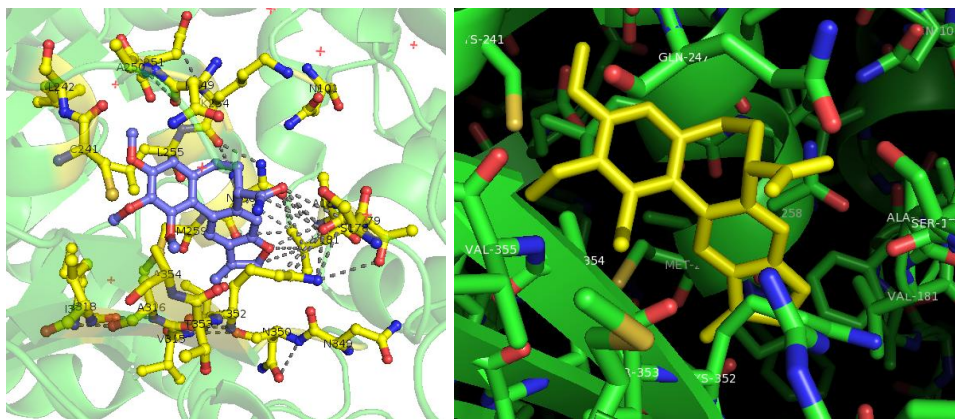


Рисунок 4. Фрагмент РСА комплекса тубулина с колхициноидом **27a**

Эксперименты *in vivo* показали снижение системной токсичности колхициноида **27a** по сравнению с колхицином примерно в 6 раз. Полулетальная доза LD₅₀ для исследуемого колхициноида составила 30 мг/кг при внутривенном введении мышам линии C57BL/6 (для колхицина LD₅₀ = 5,8 мг/кг).

5. Синтез липидных пролекарств на основе колхициноидов и их включение в состав терапевтических липосом

Для снижения системной токсичности аллоколхициноидов нами синтезированы их фосфолипидные пролекарственные формы **28a,b** (рисунок 5), способные встраиваться в энзиматически-расщепляемые липосомальные наночастицы. В липидах **28a,b** колхициноидный фрагмент связан с «полярной группой» посредством липофильного фрагмента, содержащего не менее 10 метиленовых групп, что обеспечивает селективное энзиматическое расщепление *sn*2-сложноэфирной связи фосфолипазами A₂, секретируемыми в значительных количествах в очагах воспаления и в опухолевых тканях⁴.

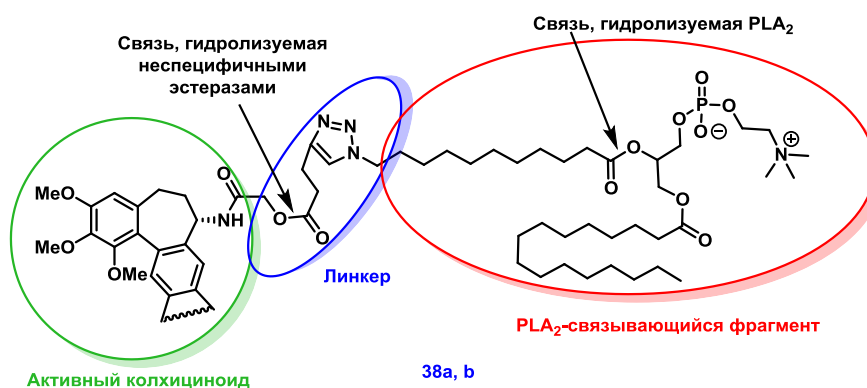


Рисунок 5. Дизайн колхицинсодержащих фосфолипидов **28a,b**

Для создания фосфолипидов **28a,b** на первом этапе нами синтезированы алкинилсодержащие колхициноиды **31** и **34** в 5 и 9 стадий соответственно (схема 10).

⁴ Biochem. Pharmacol. **2014**, 90, 338–348.

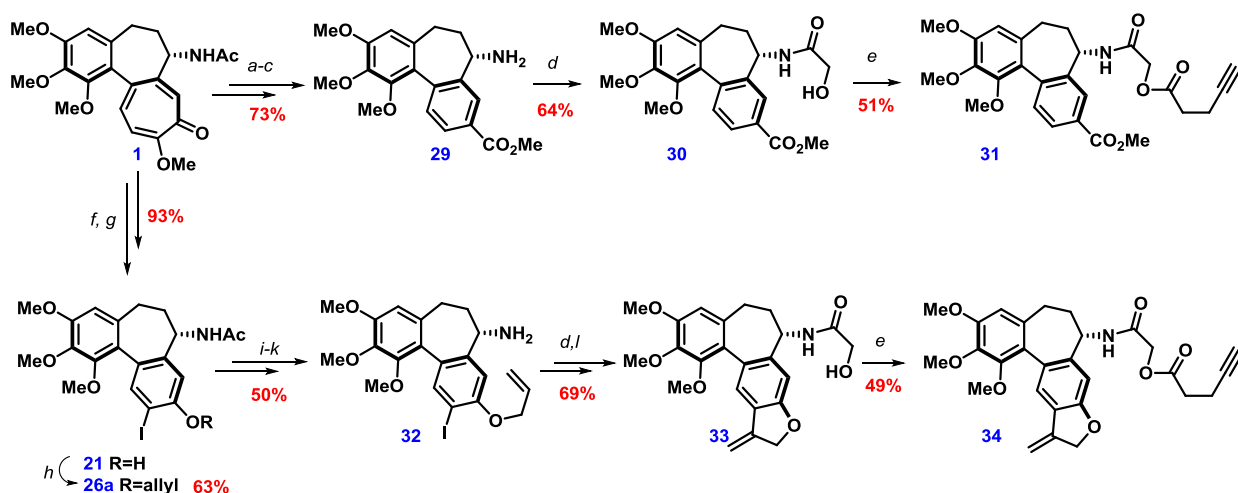


Схема 10. Синтез колхициноидов **31** и **34**. Реагенты и условия: а) Woc_2O , 4-DMAP, Et_3N , MeCN, 3 ч, 100 °С; б) MeONa, MeOH, 40 мин, 40 °С; в) TFA, DCM, 1,5 ч, 25 °С; д) гликолевая кислота, DIC, NHS, Et_3N , DCM, 20 ч, 25 °С; е) пентин-4-овая кислота, 2,4,6-трихлорбензоилхлорид, Et_3N , 4-DMAP, DCM, 0→20 °С; ф) 0,1 М HCl, AcOH, 100 °С, 3 ч; г) I_2 , KI, NaOH, H_2O , 0–5 °С, 1 ч; з) аллил бромид, Na_2CO_3 , DMF, 60 °С, 24 ч; и) Woc_2O , 4-DMAP, Et_3N , MeCN, 3 ч, 80 °С, далее $t=25$ °С, 20 ч; ж) MeONa, MeOH, 40 °С, 1 ч; к) TFA, DCM, 30 °С, 24 ч; л) $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$, AcOK, DMSO, 75 °С, 20 ч.

В случае синтеза алкина **31**, колхицин в три стадии превращали в деацетиаллоколхицин **29** (суммарный выход 73%), который затем подвергали ацилированию гликолевой кислотой в условиях реакции Штеглиха. Гидроксильированный колхициноид **30** вступал в реакцию Ямагучи с пентин-4-овой кислотой, что позволило получить целевой продукт **31** с выходом 51%.

Для синтеза колхициноида **34** на первом этапе в 3 стадии исходя из колхицина получали аллилированный иодоколхинол **26a** с суммарным выходом 59%. Аллиловый эфир **26a** подвергали деацетилированию в 3 стадии (суммарный выход 50%). Амин **32** ацилировали гликолевой кислотой в условиях реакции Штеглиха, последующая внутримолекулярная реакция Хека позволяла сформировать гидрофурановый цикл *D* с экзо-кратной связью (выход двух стадий 69%). На последнем этапе в продукт **33** вводили фрагмент пентин-4-овой кислоты в условиях реакции Ямагучи.

На следующей стадии *L*-лизо-форму фосфатидилхолина ацилировали 11-азидоундекановой кислотой **35** (схема 11). Полученный с выходом 78% азидосодержащий липид **36** вступал в реакцию CuAAC с алкинами **31** и **34**, приводя к целевым конъюгатам **28a** и **28b** с выходами 56% и 62% соответственно.

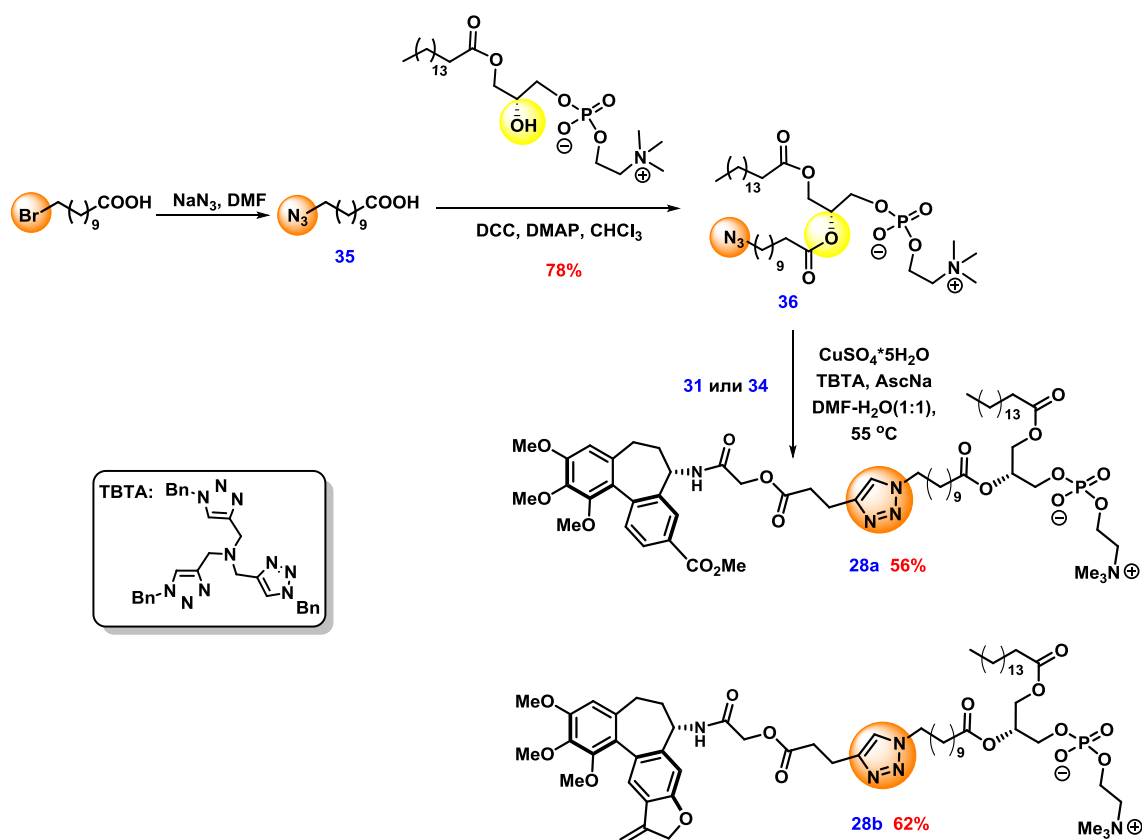


Схема 11. Синтез целевых липидных конъюгатов 28a,b

На основе липидов **28a** и **28b** методом экструзии созданы липосомальные наночастицы с диаметром ~ 110 нм (**рисунк 6, А**). В качестве матричного липида использовался фосфатидилхолин из яичного белка (ePC). В липидный бислой удалось встроить до 10% производных **28a** и **28b**. Исследование стабильности липосом, содержащих 5 мол.% терапевтического липида, продемонстрировало относительную (75-88%) устойчивость в среде плазмы крови при инкубации в течение 24 часов при использовании теста с кальцеином (**рисунк 6, В**).

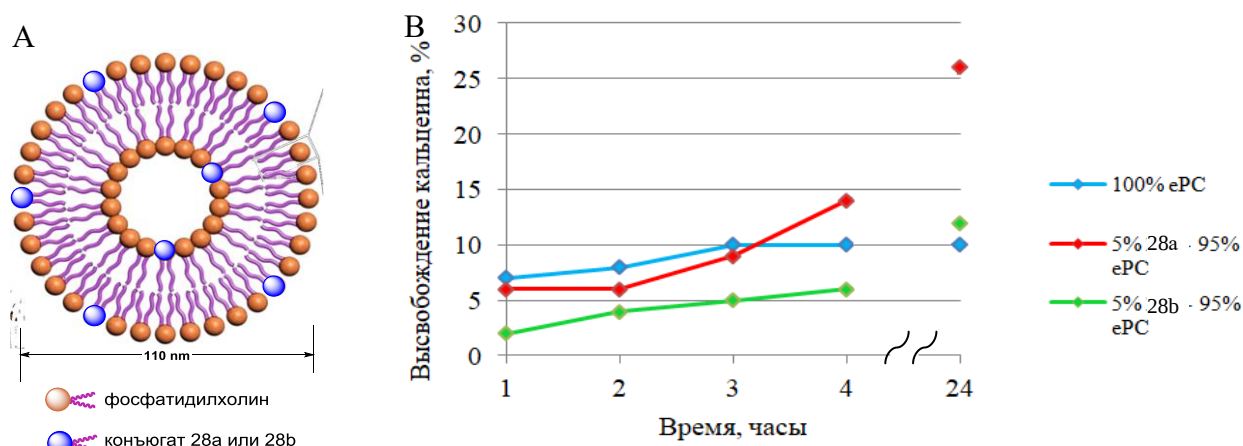


Рисунок 6. А – состав и размер терапевтических липосом, **В** – анализ устойчивости липосом в плазме крови

Анализ способности липосом к энзиматическому расщеплению оценивали при использовании двух ферментов: *vuPLA₂* – фосфолипаза, выделенная из яда змеи и *ppPLA₂* – фермент, секретируемый поджелудочной железой свиней.

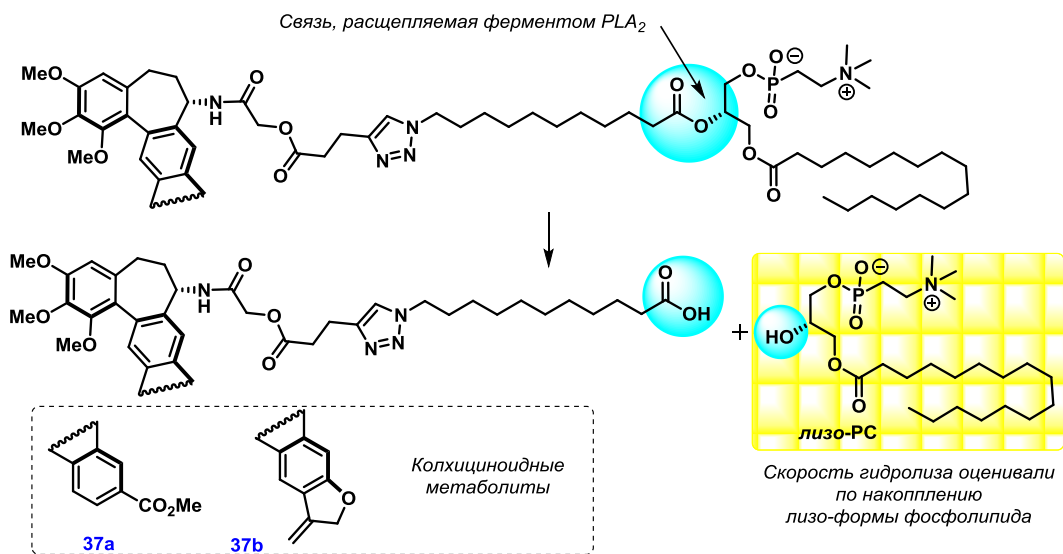


Схема 12. Гидролиз колхициноид-содержащих фосфолипидных конъюгатов под действием фосфолипазы A₂

Установлено, что начальная скорость гидролиза (при времени инкубации до 1 часа) липосом с обоими типами конъюгатов, выше в случае фермента *vuPLA₂*, что может быть объяснено отсутствием в составе этого белка аминокислотной последовательности, затрудняющей быстрое взаимодействие с поверхностью частицы. Заметное количество гидролизованной формы липида в случае обоих конъюгатов при взаимодействии с *ppPLA₂* было зафиксировано лишь через 4 часа.

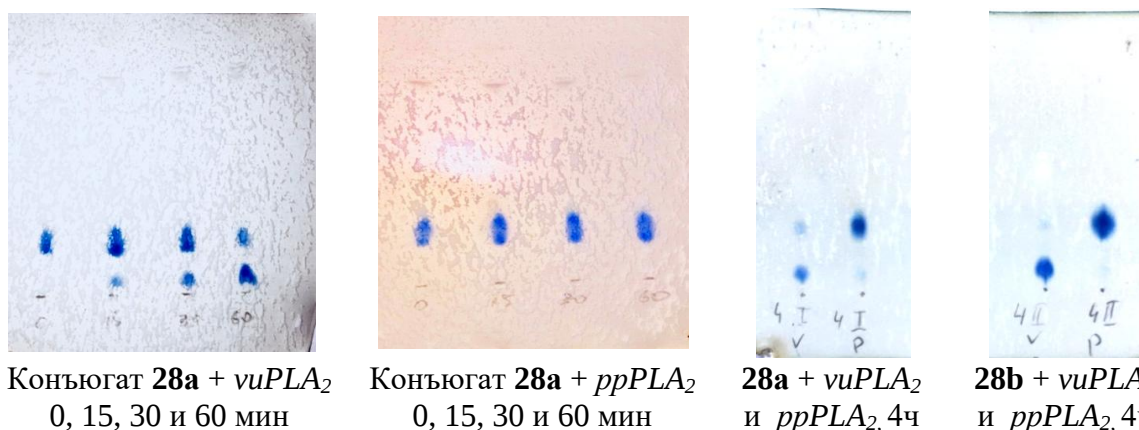


Рисунок 7. Энзиматический гидролиз терапевтических липосом фосфолипазами A₂

Была изучена цитотоксичность интактных колхициноидов **30** и **33**, липидных конъюгатов **28a,b** их липосомальных форм (состав липосом: 5 мол.% конъюгата **28a** или **28b** и 95 мол.% природного фосфатидилхолина) и колхициноидных

метаболитов **37a,b**. Интактные молекулы проявили наиболее высокую цитотоксичность по отношению к панкреатическим опухолевым клеткам штаммов PANC-1, ВхРС-3, Colo-357, а также к HaCaT. Липидные конъюгаты оказались наименее активными, липосомальные формы продемонстрировали промежуточную активность, близкую к показателям соединений-метаболитов **37a** и **37b** (таблица 6).

Таблица 6. Цитотоксические свойства колхициноидов **30** и **33**, их пролекарственных форм **28a,b**, терапевтических липосом на их основе и соединений-метаболитов **37a,b** (IC₅₀, нМ)

Соединение	PANC-1	Colo-357	ВхРС-3	HaCaT
30	80	16 (16)*	16 (16)	16 (16)
33	16	3 (3)	3 (3)	3 (3)
28a	400	400 (400)	400 (400)	400 (400)
28b	400	160 (400)	80 (80)	400 (400)
37a	240	80	16	80
37b	30	16	16	16
5% 28a – 95% ePC**	119	38 (200)	38 (200)	38 (40)
5% 28b – 95% ePC**	38	38 (50)	15 (40)	8 (40)
ePC	Не токсично	Не токсично	Не токсично	Не токсично

* Значения в скобках обозначают IC₅₀ после инкубирования в течение 48ч

** Состав липосом: 5 мол.% конъюгата **28a** или **28b** и 95 мол.% природного фосфатидилхолина, содержащего преимущественно 1-олеоил-2-пальмитоил-*sn*-фосфатидилхолин

Для снижения цитотоксичности липосомальных частиц и проведения дальнейших экспериментов *in vivo* необходимо включить в состав липосом стабилизирующие компоненты, такие как фосфатидилинозит, холестерол, производные полиэтиленгликоля, препятствующие быстрой опсонизации липосом и их распаду с высвобождением активных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан метод синтеза нерацемических пирролоаллоколхициноидов, которые могут быть получены из природного колхицина в 9 стадий с использованием в качестве ключевой стадии каталитической циклизации по Лароку и в 6 стадий с применением реакции Фишера. Полученные соединения проявляют цитотоксическую активность в нано- и суб-наномолярном диапазоне концентраций, вызывают остановку клеточного цикла на стадии G2/M и способствуют развитию апоптоза.

2. Разработан метод синтеза нерацемических фураноаллоколхициноидов, позволяющий получать целевые молекулы из природного колхицина в 3 стадии. Испытания *in vivo* продемонстрировали, что соединение-лидер обладают сниженной системной токсичностью по сравнению с колхицином и эффективно ингибируют рост опухоли у мышей.

3. Разработан метод синтеза колхициноидов, содержащих дигидрофурановый цикл D с экзо-связью углерод-углерод. Одна из полученных молекул проявляет цитотоксичность в субнанолярном диапазоне наряду со сниженной системной токсичностью и характеризуется $LD_{50} = 30$ мг/кг (в то время как LD_{50} для колхицина составляет 5,8 мг/кг).

4. Созданы липидные пролекарства на основе активных колхициноидов и лизо-фосфатидилхолина, а также терапевтические наноразмерные липосомы на их основе. Показано, что такие частицы стабильны при включении в их состав 5% терапевтического липида, устойчивы при инкубации в биологических средах, эффективно расщепляются фосфолипазой A_2 и демонстрируют снижение цитотоксичности по сравнению с интактными колхициноидами ~ на 2 порядка.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **E.S. Shchegravina**, D.S. Tretiakova, A.S. Alekseeva, T.R. Galimzyanov, Y.N. Utkin, Y.A. Ermakov, E.V. Svirshchevskaya, V.V. Negrebetsky, N.Yu. Karpechenko, V.P. Chernikov, N.R. Onishchenko, E.L. Vodovozova, A.Yu. Fedorov, I. A. Boldyrev. Phospholipidic Colchicinoids as Promising Prodrugs Incorporated into Enzyme-Responsive Liposomes: Chemical, Biophysical, and Enzymological Aspects. *Bioconjugate Chem.* **2019**, 30, 4, 1098-1113.
2. **E.S. Shchegravina**, E.V. Svirshchevskaya, H.-G. Schmalz, A.Yu. Fedorov. A Facile Synthetic Approach to Nonracemic Substituted Pyrrolo-allocolchicinoids Starting from Natural Colchicine. *Synthesis*, **2019**, 51, 1611-1622.
3. **E. S. Shchegravina**, A. A. Maleev, S. K. Ignatov, I. A. Gracheva, A. Stein, H.-G. Schmalz, A. E. Gavryushin, A. A. Zubareva, E. V. Svirshchevskaya, A. Yu. Fedorov, Synthesis and biological evaluation of novel non-racemic indole-containing allocolchicinoids, *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 141, 51-60.
4. **Shchegravina, E. S.**, Knyazev, D. I., Beletskaya, I. P., Svirshchevskaya, E. V., Schmalz, H.-G. and Fedorov, A. Yu., Synthesis of Nonracemic Pyrrolo-allocolchicinoids Exhibiting Potent Cytotoxic Activity. *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 5620–5623.
5. Yu.V. Voitovich, **E.S. Shegravina**, N.S. Sitnikov, V.I. Faerman, V.V. Fokin, H.-G. Schmalz, S. Combes, D. Allegro, P Barbier, I.P. Beletskaya, E.V. Svirshchevskaya, A. Yu. Fedorov. Synthesis and biological evaluation of furanoallocolchicinoids. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 692–704.

6. **Е.С. Щегравина**, А.Ю. Федоров, Е.В. Свирщевская "Производное 1-бромо-2',3',4'-триметоксибензо[5',6':4,5]-(aR,1S)-1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта-[3,4-f]-1H-индола и его применение", RU 2630303 C1.
7. А.Ю. Федоров, Н.С. Ситников, Ю.В. Войтович, **Е.С. Щегравина**, Е.В. Свирщевская, Производное N-((1S) -1', 2', 3'-триметокси-6,7-дигидро-1H-бензо[5',6':5,4]циклогепта[3,2-F]бензофуран-1-ил)ацетамида и его применение, RU2538982C1.
8. **Е.С. Щегравина**, А.Ю. Федоров, Е.В. Свирщевская, Ю.А. Грачёва. Производное 1'',2'',3''-триметоксибензо[5'',6'':5',4']1h-(ar,1s)-1-ацетамидо-6',7'-дигидроцикло-гепта[2',3'-f]-2,3-дигидрофурана и его применение, RU 2678440C1.
9. **Shchegravina E.**, Voitovich Yu. Sitnikov N. Svirshchevskaya E. Fedorov A. Development of new semi-synthetic approaches to heterocyclic allocolchicinoids. Материалы международной конференции Dombay Organic Conference Cluster DOCC-2016, стр. 246. РФ, Домбай, 29.06-04.06.2016.
10. **E. Shchegravina**, Y. Voitovich, E. Svirshchevskaya H.-G. Schmalz, A. Fedorov. Application of semi-synthetic approach for synthesis of heterocyclic analogues of colchicine exhibiting antitumor activity. 20th European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2018), Cologne, Germany, July 2-7, 2017
11. **Е.С. Щегравина**, Д.С. Третьякова И.А. Болдырев А.Ю.Федоров. Синтез фосфолипидных производных колхицина и создание на их основе липосомальных систем с контролируемым высвобождением терапевтического агента. V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии «ROCC-V» 10-14 сентября 2018 г. Владикавказ, Северная Осетия, РФ. Сборник тезисов, стр. 519