МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ)

На правах рукописи

. Curt

ЩЕГРАВИНА ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

Новые нерацемические гетероциклические аллоколхициноиды и наночастицы на их основе: дизайн, синтез, противоопухолевая активность

02.00.03 Органическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент, заведующий кафедрой органической химии химического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского Федоров Алексей Юрьевич

Нижний Новгород - 2019

Содержание

Список сокращений	4
Введение	5
Литературный обзор	9
1. Введение	9
2. Мишени для химиотерапии	9
3. Тубулин как мишень для химиотерапии	11
4. Классификация ингибиторов тубулина, их основные характеристики и механизм де	йствия14
5. Колхициновый сайт: структура, лиганды сайта	24
6. Структура колхицина и ее модификации	29
6.1 Модификации колхицина по кольцу А	31
6.2. Модификации колхицина по кольцу В	34
6.3 Модификации колхицина по кольцу С и D.	47
6.4 Модификации колхицина по боковым цепям	56
6.5 Гибриды и пролекарства на основе колхицина	59
7. Заключение	69
Обоснование диссертационных исследований	70
Обсуждение результатов	73
1. Синтез и биологическая активность пирролоаллоколхициноидов I.	73
2. Синтез и биологическая активность пирролоаллоколхициноидов II	86
3. Синтез и биологическая активность аллоколхициноидов III	92
4. Синтез и биологическая активность колхициноидов IV	103
5. Синтез липидных пролекарств на основе колхициноидов и их включение в состав терапевтических липосом	110
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	124
1. Общие сведения	124
2. Синтез аллоколхициноидов I	124
3. Синтез аллоколхициноидов II	133
4. Синтез аллоколхициноидов III	147
5. Синтез алоколхициноидов IV	152
6. Синтез липидных пролекарственных форм	162
7. Квантовые расчеты	170
8. Профиль поверхностного натяжения монослоев	170
9. Приготовление липидных монослойных пленок	170
10. Липосомы	170
10.1 Приготовление липосом	170
10.2 Определение дзета-потенциала	171

10.3 Динамическое светорассеивание	171
10.4. Гидролиз фосфолипазой А2	171
11. Биологические исследования in vitro	172
ВЫВОДЫ	173
БЛАГОДАРНОСТИ	174
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	175

Список сокращений

1,2-DCE – 1,2-дихлорэтан Вос – трет-бутоксикарбонил BOPC1 – бис(2-оксо-2-оксазолидинил)фосфинхлорид СА-4 – комбретастатин А-4 СА-4Р – фосфат комбретастатина А-4 COD – циклооктадиен m-CPBA – *мета*-хлорпербензойная кислота СРМЕ – метилциклопропиловый эфир Ср* – 1,2,3,4,5 - пентаметилциклопентадиен DABCO – 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан dba - дибензилиденацетон DBU – диазабициклоундецен (1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен) **DIPEA** – диизопропилэтиламин DMAP – N, N-диметиламинопиридин DMF (ДМФА) – диметилформамид DPE-phos – 2-(дифенилфосфино)фениловый эфир dppe - 1,2-бис(дифенилфосфино)этан dppf-1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен dppp – 1,2-бис(дифенилфосфино)пропан JohnPhos – 2-(ди-*трет*-бутилфосфино)бифенил LDA – диизопропиламид лития MALDI - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация МОМ – метоксиметил MsCl – метансульфонилхлорид NBS – N-бромсукцинимид NIS – N-йодсукцинимид OTf - трифторметансульфонат ТВАF – тетрабутиламмоний фторид TBS - *трет*-бутилдиметилсилил ТFА – трифторуксусная кислота TMS – триметилсилил Ts-тозил (*пара*-толуолсульфанил) ТНF ($T\Gamma \Phi$) – тетрагидрофуран S-Phos – 2-дициклогексилфосфино-2',6'-диметоксидифенил 9-ББН - 9-боробицикло[3.3.1]нонан ДАК - динитрил азобисизомасляной кислоты ДИБАЛ-Н – диизобутилалюминийгидрид ДМСО - диметилсульфоксид КХ – колоночная хроматография МТБЭ – метил-*трет*-бутиловый эфир МТТ - тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид ТСХ – тонкослойная хроматография

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Введение

Актуальность работы

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, проблема – возникновение существует еще одна нерешенная множественной лекарственной устойчивости опухолей (МЛУ). Это явление характеризуется множеством механизмов возникновения и проявляется при использовании распространенных агентов противоопухолевой терапии – паклитаксела 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 антиваскулярные 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:



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 (LD₅₀ = 30 мг/кг). Для комплекса этого производного с тубулином проведен PCA, 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 дигидро-фураноаллоколхициноидов, 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-спектроскопии, 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, массспектрометрия. Цитотоксическая активность соединений была определена с применением МТТ-теста, анализ клеточного цикла проводился методом проточной цитометрии, индукция апопотоза, 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 использование 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); Oprхим-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.* (Elsiever), *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, Dr. 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.

Литературный обзор

1. Введение

Проблема высокой смертности от онкологических заболеваний остро стоит во всех странах. Рак удерживает второе место по распространенности среди неинфекционных заболеваний. По данным ВОЗ 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 [1]; в России он один из самых высоких – 29,9%.

Круг применяемых в клинической практике противоопухолевых средств сильно ограничен. Одну из ключевых ролей в химиотерапии рака играет клеточный белок тубулин, ответственный за процесс деления клеток (митоз), внутриклеточный транспорт и метастазирование опухолей. Такая глубокая вовлеченность тубулина в процессы, связанные с канцерогенезом, делает его перспективной мишенью для химиотерапии. Соединения, действующие как антимитотические агенты, представлены, в основном, *Vinca*-алкалоидами таксанами, И например доцетаксель, эрибулин, этопозил. паклитаксель, винкристин и винорельбин. Однако они имеют значительные побочные эффекты, оказывающие воздействие на многие системы органов. Так, таксаны вызывают сенсорную и двигательную периферическую невропатию, миалгию, расстройство пищеварительной системы, потерю веса [2]. Аналогичными эффектами обладает и винкристин. 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, MDR) [3–8]. Это явление характеризуется множеством механизмов возникновения [4,6] и проявляется при использовании распространенных агентов противоопухолевой терапии – паклитакселя и винкристина [9,10].

Несмотря на огромное количество молекул-кандидатов, проходящих в данный момент клинические испытания, поиск новых химиотерапевтических агентов, обладающих низкой системной токсичностью и улучшенной биодоступностью, а также создание на основе соединений-лидеров эффективных пролекарственных форм с заданными фармакокинетическими показателями является актуальной задачей современной медицинской органической химии.

2. Мишени для химиотерапии

Началом современной эры химиотерапии принято считать 1942 год, когда Луис Гудман (Louis Goodman), Альфред Гилман (Alfred Gilman) и Густав Линдског (Gustav Lindskog) впервые применили азотистые аналоги горчичного газа – бис-β-хлорэтиламины, действующие как алкилирующие агенты, для лечения пациентов с неходжкинской лимфомой [11]. В 1965 году Национальный Институт Рака (NCI) в США объявил

масштабную программу по разработке агентов химиотерапии, в рамках которой было открыто несколько эффективных противоопухолевых средств, включая метотрексат, 5фторурацил, винкристин и таксол.

В начале 1980-х годов прогресс в развитии создания химиотерапевтических агентов существенно замедлился. Каждый небольшой шаг вперед требовал проведения многочисленных долгосрочных клинических испытаний, однако прогресс в борьбе с онкологией был невелик. Ситуацию осложняло то, что корреляция результатов испытаний на животных, на которых проводили доклинические тесты, с результатами, полученными в клинической практике, была очень низкой.

К 1985 году NCI выпускал однотипные группы антиметаболитов, алкилирующих агентов, антимитотических препаратов и ингибиторов топоизомеразы. Аналоги данных препаратов практически не имели преимуществ перед лекарствами предыдущих поколений. Используемый в то время подход к скринингу новых соединений исчерпал себя. Было необходимо развивать новые подходы к поиску и дизайну противоопухолевых средств.

B конпе 1980-x годов было открыто множество неизученных ранее внутриклеточных сигнальных путей, которые, как было установлено, значительно отличаются в нормальных и атипичных клетках. Интенсивное изучение биохимических, генетических и физиологических механизмов функционирования клеток в свете новых данных привело к началу «эры таргетных препаратов», воздействующих на специфическую молекулярную мишень, повышено экспрессируемую в опухолевых клетках. В идеальном случае такая цель должна быть уникальной, присутствовать в злокачественных образованиях в большом количестве, локализоваться на мембранах или в цитоплазме опухолевых клеток, быть стабильна с позиций генетики и играть существенную роль в развитии опухолевой клетки.

С другой стороны, существуют требования, предъявляемые к таргетным препаратам: они должны быть устойчивы к биотрансформациям, иметь продолжительный период полураспада, быть устойчивы к воздействию энзимов, например, к цитохромам P450. Молекулы-кандидаты должны обладать хорошей биодоступностью, в частности, при пероральном применении, иметь подходящий профиль токсичности в пределах эффективной дозы.

Таргетная терапия может быть разделена на опухоль-специфичную и общую. При терапии 1 типа лечение направлено на молекулярные изменения, характерные непосредственно для опухолевых клеток. При опухоль-неспецифичной терапии основной акцент делается на воздействии на межклеточные вспомогательные структуры, окружающие злокачественное образование [12].

В зависимости от объекта воздействия можно выделить следующие типы мишеней [13]:

• факторы, вовлеченные в процессы *ангиогенеза*. В растущих опухолях наблюдается интенсивное формирование кровеносных и лимфатических сосудов для удовлетворения потребностей в питательных компонентах. Ключевую роль в процессах ангиогенеза играют так называемые проангиогенные факторы (VEGF, TGF-β, FGF и другие) [14–17], ингибируя действие которых можно значительно уменьшить рост кровеносных сосудов, что приводит к дефициту жизненно необходимых компонентов опухоли.

• воздействие на ДНК-ассоциированные белки также способно нарушить работу опухолевых клеток. К таким белкам относят ДНК-синтетазы, полимеразы [18], топоизомеразы, факторы транскрипции [19] (ЕТS-фактор, NF-kB фактор, циклинзависимые киназы), системы репарации ДНК. Кроме этого, необратимые нарушения в функционировании ДНК может быть обусловлено действием метилирующих агентов [20].

• в связи с измененным метаболизмом опухолевых тканей [21] (Варбургэффект), воздействие на обмен углеводов, жирных кислот, аминокислот также является ключом к воздействию на развитие опухоли. К ключевым белками метаболизма относят переносчики глюкозы (Glut1) [22], монокарбоксилатные переносчики (МСТ1-6) [23], синтетазы жирных кислот, глутаминазу, рецепторы синтеза эстрогенов.

• эффективным фактором воздействия на развитие опухоли являются белки, контролирующие экспрессию генов. К ним относятся транскрипционный фактор p53, вовлеченный в регуляцию клеточного цикла [24], ВЕТ-белки [25], сопряженные с ацетилтрансферазами и деацетилазами гистонов, участвующих в регуляции организации генетического материала, *Р*-гликопротеин — трансмембранный белок-переносчик, сопряженный с генами, обуславливающими множественную лекарственную устойчивость [26,27].

• мишенью для терапии также могут быть компоненты иммунной системы [28,29]

• запустить процесс апоптоза опухолевых клеток возможно с помощью активации апоптоз-индуцирующих факторов (FAS/APO-1, TNFR, TRAIL - рецепторы) [30–32]

• относительно новым перспективным направлением воздействия на опухолевые клетки является нарушение многофункциональных сигнальных путей [33], связанных с белками киназами. Основными сигнальными путями являются MAPK/Ras, PI3K/Akt, PKC.

• одной из наиболее перспективных стратегий применения химиотерапии является ингибирование функционирования микротрубочек цитоскелета с использованием антимитотических агентов [34–37].

3. Тубулин как мишень для химиотерапии

Неотьемлемой частью всех эукариотических клеток являются микротрубочки – динамические структуры, локализующиеся в цитоплазме.

Если клетка находится в G0-фазе и не делится, микротрубочки позволяют фиксировать клеточные компартменты, обеспечивают внутриклеточный транспорт, участвуют в процессах роста и клеточной миграции, координируют межклеточное взаимодействие в иммунологических синапсах [38].

Поддержание динамического равновесия микротрубочек крайне важно для функционирования клеток, особенно при их пролиферации. Во время митоза (**рисунок 1**) микротрубочки формируют динамический массив – веретено деления. В прометафазе после растворения ядерной оболочки хромосомы связываются с микротрубочками посредством кинетохор – белковых структур на концах микротрубочек, к которым прикрепляется веретено деления. Сокращаясь, микротрубочки обеспечивают синхронное

расхождение хромосом к полюсам клетки и, далее, высвобождают их после прохождения клеткой контрольной точки (метафаза-анафазный переход) [39].

Динамика микротрубочек характеризуется 4-мя показателями:

- 1. скорость роста;
- 2. скорость распада;
- 3. частота перехода от фазы роста (или паузы) к распаду (катастрофе);
- 4. частота перехода от распада к паузе и росту



Рисунок 1. Стадии митоза

Для корректного функционирования микротрубочек необходимо участие МТассоциированных протеинов. Выделяют 4 группы таких белков [38]:

- транспортные (двигательные) белки, например, кинезин, использующие энергию АТФ для переноса различных частиц и молекул по микротрубочкам;

- белки, участвующие в стабилизации геометрии микротрубочек и их ансамблей;

- белки, регулирующие формирование микротрубочек;

- белки, регулирующие динамические процессы сборки и распада микротрубочек, а именно частоту перехода от полимеризации к распаду и в обратном направлении.

Микротрубочки состоят из гетеродимеров белка тубулина. Это глобулярный белок весом около 50 кДа. Гетеродимеры состоят из одной α - и одной β -субъединицы, а также включают в себя две молекулы гуанозинтрифосфата (ГТФ), причем только одна молекула может свободно диссоциировать, не подвергая структуру белка необратимым изменениям. При 37 °C и наличии в цитоплазме избыточного ГТФ гетеродимеры могут полимеризоваться по типу «голова к хвосту» (**рисунок 2**), образуя протофиламенты. По прошествии индукционного периода (обычно длится несколько минут) протофиламенты группируются, образуя протеиновый «лист», который затем преобразуется в полый цилиндр. В составе микротрубочки обычно насчитывается 12-13 филаментов, ее внешний диаметр составляет 24 нм, а внутренний 15 нм. Кроме α и β -форм для построения



микротрубочки необходим также γ-тубулин. Предполагается, что он охватывает «+»-конец микротрубочки, способствуя присоединению нового α-β гетеродимера [40].

Микротрубочка в состоянии паузы

Nature Reviews | Neuroscience

Рисунок 2. Строение микротрубочки и ее динамическое равновесие в клетке. Взято из [41]

В человеческом организме насчитывается 8 изоформ α-тубулина и 7 изоформ βкодируются различными генами, ИХ экспрессия тубулина. Они является тканеспецифичной. Изоформы тубулина имеют достаточно консервативную структуру: они практически идентичны в средней части молекулы и около N-конца, образуя достаточно жесткую глобулу. С-конец тубулина имеет разупорядоченную структуру и состоит из 18-24 аминокислотных остатков. Этот фрагмент белка содержит сайты для посттрансляционных изменений и взаимодействий с рядом других протеинов, что и определяет набор функций, характерный для конкретной изоформы. Изменения в экспрессии изоформ тубулина характерны для многих типов онкологических заболеваний. Анализ клинической практики показал, что повышенная экспрессия *βI*, *βII*, *βIII*, *βVI* и βV-изоформ коррелирует с агрессивным течением болезни, резистентностью к химиотерапии и, как следствие, с низкой выживаемостью пациентов.

Наиболее изученной в этом аспекте является абберантная форма βШ-тубулина. Высокая экспрессия этой изоформы коррелирует с низкой эффективностью химиотерапии

таксанами в случае развития рака яичников, молочных желез, желудка. Считается, что данный белок участвует в формировании резистентности опухолей к лечению, а также может указывать на терминальную стадию заболевания.

Изоформы тубулина по-разному взаимодействуют с антимитотическими агентами. Так, изоформы βШ и βVI имеют большую чувствительность к таксолу, по сравнению с βШ-изоформой, однако винкристин и винорельбин демонстрируют более слабую активность в отношении изоформы βШ по сравнению с остальными представителями βформы белка.

Ввиду своей ключевой роли в процессе деления клеток тубулин является перспективной мишенью для агентов химиотерапии. Эти соединения взаимодействуя с тубулином нарушают работу микротрубочек веретена деления на определенной стадии клеточного цикла. Как известно, в период своего развития и деления клетка проходит несколько ключевых точек. Если нарушить правильное функционирование компонентов клетки в один из этих периодов, она не сможет перейти контрольную точку и будут запущены механизмы апоптоза.

4. Классификация ингибиторов тубулина, их основные характеристики и механизм действия.

Являясь динамическими структурами, микротрубочки проявляют высокую чувствительность к антимитотическим агентам. По характеру их влияния можно выделить соединения, ускоряющие полимеризацию микротрубочек и обеспечивающие их стабилизацию, и соединения, которые, напротив, вызывают распад микротрубочек и деполимеризацию тубулина.

В составе тубулина выделяют определенные участки (сайты или домены), с которыми специфично взаимодействуют те или иные тубулиновые лиганды (см. рисунок 3)



Рисунок 3. Сайты связывания различных классов антимитотических агентов [42]



Рисунок 4. Лиганды различных сайтов тубулина

Так, с *Vinca*-сайтом специфично взаимодействуют соединения, выделенные из *Catharanthus roseus* (также известные как *Vinca*-алкалоида), а именно винкристин, винбластин, винорелбин. Кроме алкалоидов данного класса с этим доменом могут связываться криптофицин 52, галихондрин Б, эрибулин и некоторые другие соединения [43,44] (см. **рисунок 4**). Лиганды *Vinca*-домена вызывают дестабилизацию микротрубочек и деполимеризацию тубулина. Среди β-форм тубулина *Vinca*-алкалоиды проявляют наибольшую сензитивность к βIII-изоформе [44].

Vinca-сайт расположен в месте соединения двух субъединиц тубулина. Полное связывание лиганда с сайтом возможно лишь в случае объединения двух гетеродимеров белка [45]. Винкристин и другие лиганды данного сайта взаимодействуют уже со зрелой микротрубочкой, а не с растворенным тубулином. Взаимодействие данных соединений с белком происходит быстро и обратимо и почти не зависит от температуры среды в интервале $0 - 37 \,^{\circ}$ С [43].

Винкристин применяют в терапии острого лимфобластного лейкоза, лимфомы Ходжкина, нефробластомы. Первый тотальный синтез винкристина с контролем конфигурации стереоцентров (12 стадий начиная с 11-метокситаберсонина) был опубликован в 2004 году [46] (см. схему 1):



Схема 1. Ключевые моменты схемы тотального синтеза (+)-винкристина

Таксановый сайт тубулина локализован в β-субъединице белкового гетеродимера. домена являются Лигандами данного паклитаксел, доцетаксел, эпотилон А, циклострептин, элеутеробин и другие соединения [44,47]. Данные молекулы, в отличие от *Vinca*-сайта, стабилизируют микротрубочки, препятствуя распаду. лигандов ИХ Паклитаксел (таксол), первый открытый стабилизирующий агент [48], вызывает полимеризацию тубулина в клетках в неблагоприятных условиях (низкая температура, малое содержание ионов Ca²⁺) и в отсутствие ГТФ, необходимого для сборки микротрубочек в обычных условиях [47]. Предполагается, что таксол ингибирует деполимеризацию микротрубочек посредством усиления латеральных взаимодействий между филаментами тубулина [49].

Подтверждена эффективность таксола в терапии рака яичников, немелкоклеточного рака легких, метастазирующих опухолей молочных желез [50].

Первый тотальный синтез таксола был выполнен К. Николау [51] и опубликован в 1994 году. Ключевые этапы получения этого алкалоида представлена на **схеме 2**, в полном варианте она включает в себя 40 стадий, которые можно разделить на три части.



Схема 2. Ключевые этапы тотального синтез таксола, предложенного научной группой К. Николау

Еще одним хорошо изученным доменом тубулина является колхициновый домен. Он расположен преимущественно В β-субъединице, однако зафиксированы взаимодействия лигандов данного сайта и с соседней α-субъединицей, что подтверждается фактом стабилизации гетеродимера тубулина при его взаимодействии с колхицином [52]. Колхицин (1) и его аналоги взаимодействуют с растворенным тубулином, в отличие от таксанов И *Vinca*-алкалоидов. Для нормальной сборки микротрубочки важны взаимодействия между гетеродимерами как в продольном, так и в поперечном

направлении [53]. Связывание тубулина с колхицином и его аналогами вызывает сильное смещение (на расстояние порядка 9Å) в структуре соседних с сайтом цепей, а именно Мпетли, что делает невозможным установление всех необходимых контактов при формировании филамента [52]. При низких концентрациях тубулин-колхицинового комплекса образование микротрубочек сильно затруднено, а высокие концентрации лиганда индуцируют распад микротрубочек.

Колхицин является алкалоидом растения *Colchicum autumnale*. Он был впервые выделен в 1820 году французскими химиками П. Пеллетье (P.S. Pelletier) и Дж. Кавенту (J. В. Caventou) [54]. Колхицин уже много лет применяется как противовоспалительное средство при терапии подагрического артрита и Средиземноморской лихорадки [55–58], описаны случаи его положительного применения при терапии болезни Бехчета, амилоидозе и склеродермии [58–61], однако, применение колхицина в качестве химиотерапевтического агента в онкологии ограничено вследствие высокой системной токсичности и низкой водорастворимости данного соединения.

Первый тотальный синтез колхицина был осуществлен научной группой Эшенмозера в 1959 году [62]. Он включал в себя 22 стадии и предусматривал использование жестких условий, суммарный выход был очень низким и достигал 0.00006%. В качестве исходного компонента был использован пурпурогаллин, а ключевым промежуточным звеном являлся деацетиламидоколхицеин:



Схема 3. Основные этапы тотального синтеза колхицина по Эшенмозеру

Помимо стратегии, предложенной Эшенмозером, было разработано еще несколько подходов к синтезу колхицина, основанных на различных способах построения трициклической системы [63–68].

Кроме описанных выше веществ, насчитывается несколько сотен соединений, способных связываться с тубулином в различных участках его структуры, оказывая влияние на динамическое равновесие микротрубочек и вызывая нарушения в работе митотического веретена [44].

Оба класса антитубулиновых агентов (стабилизирующие и дестабилизирующие) вызывают нарушение в функционировании микротрубочек, причем механизм действия у этих соединений относительно схожий. Эту точку зрения подтверждает и тот факт, что комбинированная химиотерапия, например, таксанами и *Vinca*-алкалоидами или эстрамустином не вызывает побочных эффектов, связанных с антагонистическим характером действия данных препаратов [69].

Наряду с прямым антимитотического действием, тубулиновые агенты способны влиять на кровоснабжение опухолевых образований. Существуют два способа блокировки васкуляризации опухолей – ингибирование формирования новых сосудов (антиангиогенный путь) или разрушение существующей сети кровеносных сосудов [70]. Формирование новых кровеносных сосудов затрагивает пролиферацию и миграцию

эндотелиальных клеток. Оба эти процесса очень чувствительны к функционированию микротрубочек цитоскелета. При долговременной терапии низкими дозами антимитотических препаратов, осуществляемой через короткие промежутки времени, антиангиогенное действие таких соединений может проявляться как основное, хотя доказательство систематичности проявления таких качеств требует проведения клинических испытаний. Подобное антиангиогенное действие могут оказывать лиганды колхицинового сайта тубулина - комбретастатины и *N*-ацетилколхинол фосфат. Было показано, что введение этих препаратов в течение одного часа вызывает увеличение проницаемости кровеносных сосудов и кровотечение в 95% случаев [71]. Интересно отметить, что данные агенты проявляют высокую селективность именно к кровеносным сосудам опухоли, однако причины такой селективности пока не ясны. Возможно объяснением данному факту является то, что целевые эндотелиальные клетки не являются атипичными, и как следствие, не проявляют агрессивной резистентности по отношению к антитубулиновым агентам.

Причина того, что некоторые антимитотические агенты более эффективны против васкуляризации опухоли, чем в качестве классических антипролиферативных препаратов, может заключается в обратимости их взаимодействия с тубулином либо в способности быстрого выведения из клетки и, как следствие, кратковременного нарушения в работе микротрубочек цитоскелета [44].

Другим аспектом действия таких соединений является их апоптоз-индуцирующая активность. Апоптоз – программируемая гибель клеток. Это естественный процесс, предназначенный для утилизации поврежденных клеток, препятствующих нормальному морфогенезу и индивидуальному развитию организма [72]. В отличие от некроза, апоптоз характеризуется отсутствием воспалительных процессов в соседних клетках и тканях ввиду сохранения целостности клеточной мембраны и финального фагоцитоза апоптозирующей клетки. К отличительным признакам апоптоза относят дегидратационное сжатие клеток, нарушение межклеточных контактов, распад цитоскелета и деградацию ядерных структур [73].

Среди множества внутриклеточных апоптотических сигнальных путей можно выделить два наиболее важных: митохондриальный (внутренний) путь и внешний путь, затрагивающий так называемые «рецепторы смерти»¹. Несмотря на то, что антитубулиновые агенты способны влиять на уровень экспрессии рецепторов смерти [74], апоптоз, вызываемый этими агентами, не развивается по пути, затрагивающему рецепторы смерти [75,76].

¹ Рецепторы смерти – рецепторы на поверхности клетки, участвующие в передаче апоптоз-индуцирующих сигналов при взаимодействии со специфическими лигандами. Они способны активировать действие каспаз и вызывать апоптотическую гибель клетки в течение нескольких часов. Рецепторы смерти принадлежат к семейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). Наиболее распространенными рецепторами смерти являются Fas (синонимы: CD95, Apo1), TNFR1, DR3-5.



Рисунок 5. Сигнальные пути реализации программы апоптоза в клетке

Пермеабилизация (изменение проницаемости) митохондриальных мембран – ключевой фактор активации программ апоптоза, который действует посредством высвобождения множественных проапоптотических белков [77,78]. При первичной гиперполяризации мембран, вызываемой антитубулиновыми агентами, происходит высвобождение проапоптотических факторов. Так, ответной реакцией на терапию таксолом или эпотилоном является высвобождение цитохрома С, который способствует формированию мультифакторного комплекса апоптосом² и первичному повышению уровня активности каспазы 9³ [79] (**рисунок 5**).

Пермеабилизация митохондриальных мембран находится под контролем белков семейства Bcl-2. Оно насчитывает порядка 30 белков, которые можно разделить на три группы: Bcl-2-факторы выживания и факторы смерти, обозначаемые как Bax и BH3-only [80]. Гиперэкспрессия антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-X_L ингибирует апоптозиндуцирующее действие таксола, доцетаксела и вибластина [81], нивелируя действия данных соединений на митохондрии (в частности, нормализуют их трансмембранные потенциалы [82]) и предотвращая высвобождение находящихся в трансмембранном пространстве апоптотических факторов. Антиапоптотические белки данного семейства

² Апоптосома – высокоорганизованный белковый комплекс, формирующийся в клетках под воздействием цитохрома *C*, высвобождаемого в результате увеличения проницаемости митохондриальных мембран. Данный ферментный комплекс формируется вокруг адапторного белка Apaf1. Функционально зрелая апоптосома является платформой для активации каспазы 9

³ Каспазы – семейство циклин-зависимых цистеиновых протеаз, расщепляющих белки специфично после аспарагиновой кислоты. Каспазы играют важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспаления.

могут быть дезактивированы посредством гиперфосфорилирования, индуцируемого многими антитубулиновыми агентами, в частности, таксолом, винкристином, винфлюнином или нокодазолом [78,83,84]. В качестве вспомогательных компонентов в данном процессе могут выступать циклин-зависимые киназы (CDKs) и митогенактивируемые протеинкиназы (MAPKs)

Как известно, антитубулиновые агенты вызывают остановку клеточного цикла на стадии G₂/M. В этот момент происходит принятие решения о продолжении цикла и деления клетки либо о наступлении апоптоза. Важную роль в этом решении играет степень и временная продолжительность гиперфосфорилирования белков Bcl-2 [85]. Будучи ингибированными, белки Bcl-2 менее склонны к димеризации с Вах-подобными протеинами. В свою очередь, Вах-белки способны олигомеризоваться с образованием пор в митохондриальных мембранах [86], необходимые для переноса цитохрома С в цитоплазму [87]. Помимо данного пути инактивации белков Bcl-2, возможна их трансформация проапоптотические протеины посредством протеолитического В активированной расщепления каспазой-3 [88]. В результате образуется проапоптотический белок, принимающий участие реализации апоптоза, в индуцированного антимитотическими агентами.

Подтверждено участие тубулиновых агентов в биохимических каскадах активации каспаз в рамках митохондриального пути развития апоптоза [89]. Каспазы – семейство цистеинил-аспартат расщепляющих протеаз. В человеческом организме насчитывается 14 каспаз, которые можно разделить на два больших класса: инициаторные каспазы –1, 2, 4, 5, 8, 9, и 10 и эффекторные каспазы – 3, 6 и 7. Каспазы первой группы характеризуются способностью к автоматической активации. Находясь в активном состоянии они «включают» эффекторные каспазы.

В качестве ответной реакции на терапию таксолом или эпотилоном происходит высвобождение факторов первичной активации каспазы-9 [90]. Находясь в активном состоянии каспаза-9 активирует каспазу-3, что приводит к реализации апоптозиндуцирующих биохимических каскадов. Кроме того, таксол-активированная каспаза-3 может вызывать нарушение клеточной адгезии посредством расщепления белков β- и γкатенинов [91]. Помимо каспаза-3-ассоциированного пути таксаны способны индуцировать апоптотическую гибель клетки по другим независимым механизмам [92].

Одним из ключевых факторов, ограничивающих применение антитубулиновых агентов в качестве химиотерапевтических средств, является развитие множественной лекарственной устойчивости в ответ на терапию указанными препаратами. Резистентность к химиотерапии может быть представлена одним из двух главных типов: первичной, которая заключается в наличии механизмов, обуславливающих резистентность к терапии еще до ее начала и приобретенной, которая развивается как ответная реакция на введение противоопухолевых препаратов. Она может быть выражена, например, в активации альтернативных сигнальных путей или в пост-трансляционных изменениях белков [7]. Резистентность к антитубулиновым агентам может проявляться на различных уровнях фармакокинетики препарата, включая клеточный эффлюкс ксенобиотиков, неэффективное взаимодействие с мишенью, изменения в сигнальных каскадах, регулирующих апоптотическую гибель клеток (рисунок 6)



Рисунок 6. Ключевые точки возникновения множественной лекарственной устойчивости

Резистентные опухоли демонстрируют множественные изменения в экспрессии белков и микроРНК, влияние которых на чувствительность к терапии антитубулиновыми препаратами до сих пор малоизученна [44].

Ключевую роль в возникновении и развитии первичной множественной лекарственной устойчивости играют мембранные АТФ-связывающие кассетные белки. Данное семейство белков насчитывает 49 членов, однако определяющую роль в развитии резистентности к противоопухолевым препаратам играют три представителя этого семейства [7]:

- белок MDR1, он же Р-гликопротеин (P-gp) или ABC1;
- MDR-ассоциированный белок 1 (MRP1, он же ABCC1);
- белок резистентности опухолей молочных желез (BCRP, он же ABCG2).

Они обуславливают развитие первичной лекарственной устойчивости *in vitro*. Все эти три белка охватывают широкий спектр субстратов и обеспечивают выведение из клетки различных гидрофобных молекул, включая и распространенные противоопухолевые препараты, такие как таксаны, ингибиторы топоизомеразы и антиметаболиты⁴.

Белок MDR1 является первым открытым ABC-транспортером. Он локализован в мембранах клеток практически всех тканей, однако повышенный уровень его экспрессии наблюдается в эпителиальных клетках, выполняющих выделительную функцию [93,94]. Гиперэкспрессия MDR1 наблюдалась в случаях неэффективности терапии рака почек, печени и толстого кишечника. Аналогичная закономерность была обнаружена в случае лечения рака легких, простаты и рака молочной железы [7,95,96].

Второй член семейства АТФ-связывающих кассетных белков, MRP1, был открыт в 1992 году. В отличие от *P*-гликопротеина, который может транспортировать нейтральные и положительно заряженные субстраты, MRP1 также взаимодействует с анионными

⁴ Антиметаболиты – класс препаратов, которые взаимодействуют нормальными клеточными метаболитами, вызывая нарушение их функций. К антиметаболитам, применяемым в противоопухолевой терапии, относятся 5-фторурацил, метотрексат и пеметрексид.

органическими молекулами и метаболитами второго порядка. Набор субстратов, являющихся противоопухолевыми агентами, в случае MDR1 и MRP1 примерно одинаков. К ним относятся антрациклины, *Vinca*-алкалоиды, эпиподофиллотоксины, а также клинически значимый препарат метотрексат, не являющийся антимитотическим агентом [97].

Третий белок, BCRP, был обнаружен в различных нормальных тканях, в том числе, в плаценте, тканях толстого кишечника, печени, поджелудочной железы, почечных кортикальных канальцев, что может свидетельствовать о выполнении данным белком защитной функции [98]. Субстратами для этого переносчика являются антрациклины, кампотекины, митоксантрон, топотекан.

Необходимо отметить, что большинство попыток использовать комбинированную терапию, включающую как антимитотический агент, так и ингибитор кассетных белков, потерпели неудачу [99].

Следующим уровнем, на котором возможно формирование резистентности к терапии антитубулиновыми агентами, являются изменения в структуре микротрубочек. Конформационные и изоформные альтерации, а также изменения, связанные с активностью ГТФазы, влияют на чувствительность к действию антимитотических препаратов. Данные изменения крайне многообразны, они связаны с функционированием вспомогательных белков-регуляторов⁵: гистидиновая триада белков, МАР2, МАР4, статмин и сурвенин [100–102]. Изменения в уровне их экспрессии, внутриклеточной локализации и пост-трансляционные изменения могут влиять на восприимчивость к терапии антитубулиновым препаратам.

Еще одним фактором, влияющим на степень развития резистентности к терапии, является количественный изоформный состав микротрубочки. Установлено, что повышение содержания βШ-изоформы может обуславливать снижение эффективности терапии таксанами в случае рака легких, молочных желез и яичников [102,103]. Помимо βШ-изоформы резистентность к таксанам наблюдается и в случае увеличения содержания βШ и βV [104].

Третий уровень развития устойчивости к антитубулиновым агентам основан на изменениях, затрагивающих сигнальные пути регуляции апоптоза. Микротрубочки взаимодействуют с различными органеллами, вовлеченными в процесс клеточной смерти, например, с митохондриями и лизосомами. Кроме того, с микротрубочками связаны несколько ключевых регуляторных белков, например, белок р53⁶. Данный белок физически контактирует с диенином, моторным белком микротрубочек. Некоторые исследования установили, что р53 может влиять на чувствительности к антитубулиновым агентами посредством изменения изоморфного состава тубулина [105].

⁵ Данные белки-регуляторы выполняют широкий спектр функций. Они могут выполнять роль стабилизаторов/дестабилизаторов микротрубочек, направлять их к конкретным клеточным компартментам, сшивать микротрубочки и являться посредниками при взаимодействии с другими белками. Внутри клетки данные белки связываются непосредственно с димерами тубулина. Это связывание в большинстве случаев приводит к стабилизации структуры микротрубочек, что еще больше способствует их полимеризации.

⁶ Данный белок кодируется геном *TP53*, супрессором онкогенеза. Он обнаружен во всех клетках человеческого организма. При отсутствии повреждений ДНК он находится в спящем состоянии, а при появлении потенциально опасных мутаций активируется. Результатом активации белка является активация процессов репарации ДНК, остановка клеточного цикла и запуск механизмов апоптоза.

Еще одним серьезным ограничением в использовании антитубулиновых агентов в клинической практике является высокая системная токсичность, характерная практически для всех препаратов данного класса соединений [106]. Одним из наиболее агрессивных проявлений данного побочного эффекта является развитие нейропатии⁷. Проявление нейропатии носит дозозависимый характер. Данный вид токсичности был впервые обнаружен при применении *Vinca*-алкалоидов, однако впоследствии был выявлен и у таксанов [107–109].

Vinca-алкалоиды неспособны преодолевать гематоэнцефалический барьер, вследствие чего они не являются токсичными для ЦНС. Данные соединения преимущественно вызывают периферическую сенсомоторную нейропатию, возникающую вследствие повреждения системы микротрубочек в аксонах, и, как следствие, угнетение аксонального транспорта. Вторичным симптомом нейропатии является периферическая потеря чувствительности, сопровождающаяся болевым синдромом [106].

Периферическая нейротоксичность, вызываемая приемом таксанов, также является дозозависимой, причем в степени ее развития играет роль как однократно введенная доза препарата, так и кумулятивный эффект терапии. Наиболее тяжелые последствия наблюдаются в случае паклитаксела. При этом у 30% пациентов фиксируется 3 или 4 степень развития нейропатии [107]. Механизм ее возникновения в случае таксанов до конца не ясен, однако предполагается, что как и в случае *Vinca*-алкалоидов, происходит нарушение агрегации микротрубочек в нейронах, что ведет к нарушению аксонального транспорта [110].

Эффективного симптоматического лечения периферической нейропатии в настоящее время не найдено. И хотя через несколько месяцев после окончания терапии наблюдается восстановление пациентов, у некоторых из них симптомы могут наблюдаться в течение нескольких лет.

Одной из серьезных проблем при определении токсичности новых потенциальных препаратов является отсутствие адекватных предклинических моделей нейропатии, индуцируемой лекарственными средствами. Так, широко используемые в настоящее время глиальные клеточные культуры часто демонстрируют результаты, несоответствующие полученным в ходе клинических испытаний. Создание точной модели для определения токсичности позволило бы создавать эффективные нейропротекторные препараты и более адекватно характеризовать нейротоксические свойства лекарственных средств.

Еще одним подходом к решению проблемы нейротоксичности является обнаружение и изучение различий микротрубочек цитоскелета в клетках периферической нервной системы и опухолевых клеток. Такие особенности могут послужить основой для создания противоопухолевых препаратов со сниженным риском развития нейропатии [44].

Помимо негативного воздействия на нервную систему, антимитотические агенты оказывают отрицательный эффект на кроветворную функцию костного мозга, вызывают

⁷ Нейропатия – поражение нервных клеток различной этиологии. Это патологическое состояние характеризуется в основном дисфункцией тел моторных нейронов передних рогов спинного мозга или сенсорных нейронов спинномозговых ганглиев.

дисфункцию органов ЖКТ, проявляют кардиотоксичность и в некоторых случаях могут стать причиной развития ансуплоидии⁸.

Развитие медицинской и фармацевтической химии позволило вывести на рынок несколько препаратов, являющихся антимитотическими агентами. Подавляющее большинство из них являются лигандами таксанового и *Vinca*-сайтов тубулина. Наиболее значимыми в настоящее время являются винкристин (одобрен для терапии острого лимфобластного лейкоза, лимфомы и различных солидных опухолей), винбластин, виндестин (применяется для терапии рака легких), паклитаксел и доцетаксел (используются для лечения немелкоклеточного рака легких, рака молочной железы, простаты, желудка), иксабепилон (одобрен для терапии рака молочных желез) и некоторые другие препараты [44].

Среди представителей колхицинового сайта тубулина клинические испытания успешно прошел лишь эстрамустин, рекомендованный для лечения рака простаты [111]. Остальные соединения, взаимодействующие с данным доменом тубулина, в настоящее время либо проходят ту или иную стадию клинических испытаний (как, например, комбретастатины), либо сняты с тестирования вследствие низкой эффективности и серьезных побочных эффектов.

5. Колхициновый сайт: структура, лиганды сайта

В последние десятилетия было проведено множество исследований, посвященных разработке лигандов колхицинового сайта тубулина. Интерес к подобным соединениям объясняется тем, что наряду с такими серьезными недостатками, как высокая и слабоконтролируемая системная токсичность, низкая растворимость в воде, и, как следствие, неудовлетворительная биодоступность, представители данного класса антитубулиновых агентов имеют ряд преимуществ перед широко используемыми к клинической практике таксанами и *Vinca*-алкалоидами.

Одним из таких преимуществ является способность лигандов колхицинового сайта оказывать деструктивное влияние на кровоснабжение опухолей, предотвращая формирование новых сосудов либо разрушая уже сформированные капилляры [112]. Помимо данного преимущества, стоит отметить, что лиганды колхицинового сайта практически не подвержены множественной лекарственной устойчивости [112], которая является одним из главных ограничений для применения антимитотических агентов в клинической практике. Одним из факторов, определяющих развитие МЛУ, являются альтерации изоформ тубулина, а именно повышенная экспрессия βШ-изоформы, которая может служить индикатором резистентности к терапии таксанами или *Vinca*-алкалоидами. В свою очередь, эффективность действия препаратов колхицинового ряда и 2-метоксиэстрадиола не зависит от изоморфного состава β-тубулина [103,113]

Изучение взаимодействия колхицина и его производных с тубулином было начато достаточно давно [114]. Первая рентгенографическая структура тубулина была получена в 1998 году [115], однако данные, необходимые для идентификации топологии

⁸ Анеуплоидия — изменение организации генетического материала, при котором число хромосом в клетках не кратно гаплоидному набору. Анеуплоидия возникает в результате нарушения сегрегации хромосом в митозе или мейозе.

колхицинового сайта были получены позднее [116]. Окончательно колхициновый сайт тубулина был идентифицирован в 2004 году [52]. В данном исследовании была получена кристаллическая структура тубулина в комплексе с N-ацетил-N-(2-меркаптоацетил)колхицином, структурно очень близким к самому колхицину.

Колхициновый сайт представляет собой полость, находящуюся во внутренней части зоны взаимодействия α и β -субъединиц тубулина. В структуре сайта можно выделить три зоны: первая локализована в β -субъединице и в данном участке наблюдается связывание белка практически со всеми лигандами данного типа. Две другие зоны – вспомогательные, одна находится на поверхности α -субъединицы, а вторая более глубоко интегрирована в β -субъединицу [117]. Принимая во внимание, что колхициновый сайт расположен не на поверхности белка, для связывания с этим доменом требуются значительный изменения в структуре протеина (**рисунок 7**).



Рисунок 7. Взято из[118]. Структура димера тубулина. α-субъединицы показаны фиолетовым, β-субъединицы - зеленым, а связанные с ними молекулы ГДФ – голубым и желтым соответственно, участок RB3-SLD синим. Колхициновый сайт представлен в увеличенном варианте. На рисунке показано смещение петли T7, включающей аминокислотные остатки 244-251, вызванное связыванием с колхицином.

Сравнение конформаций свободного тубулина и белка в комплексе с колхицином обнаруживает значительные изменения: участок петли T7 от Alaβ250 до Pheβ244 смещается далеко от β-спиралей S8-S9, тем самыс связывание лиганда с колхициновым сайтом становится возможным.

Колхицин взаимодействует с растворенным тубулином постадийно. Вначале образуется комплекс с низкой энергией и способный к диссоциации. Далее тубулин претерпевает структурные изменения, которые приводят к образованию псевдонеобратимого комплекса [119]. При этом кольцо *С* колхицина взаимодействует с аминокислотными остатками α -субъединицы, образуя контакты с Val α 181, Ser α 178, Val α 315. Карбонильная группа выступает в качестве акцептора водородной связи, взаимодействуя с Val α 181. Кольцо *A* располагается в гидрофобном кармане, ограниченном остатками Lys β 352, Asn β 350, Leu β 378, Ala β 316, Leu β 254, Ala β 250, Leu β 242. Метоксигруппа в положении «З» образует водородную связь с Cys β 241 [117]

Анализ аминокислотного состава различных изоформ тубулина показал, что колхициновый сайт насчитывает 29 аминокислотных остатков, находящихся на расстоянии не более 6Å от лиганда [118]. Среди этих остатков 6 различаются при переходе от одной изоформы к другой. Эти мутации имеют большое влияние на аффинность лигандов сайта. Во-первых, данные мутации обуславливают иной набор

прямых контактов между лигандом и аминокислотными остатками. Например, замена серина β 241 на цистеин изменяет размеры сайта связывания вследствие большего радиуса атома серы по сравнению с кислородом, что может объяснять низкую аффинность колхицина по отношению к β *III*-изоформе [120]. Во-вторых, данные мутации приводят к изменению формы сайта связывания и снижают селективность взаимодействия колхицина с β *III*, β *IV*-изоформами. Например, изменение формы сайта может быть обусловлено изменениями во взаимодействии между спиралями **H9** и **H10** [121,122].

Для обобщения данных о взаимодействии различных антимитотических агентов с колхициновым сайтом была разработана фармакофорная модель данного домена. Для этого был изучен характер связывания 15 лигандов различных структурных типов [123]. На основе анализа полученных данных была составлена фармакофорная модель. Она включает в себя 7 опорных фармакофорных точек, располагающихся на двух плоскостях под углом 45°.



Рисунок 8. Фармакофорная модель колхицинового сайта тубулина [117,124]

Элементами данной модели являются 3 акцептора водородной связи A1, A2 и A3, которые образуют контакты с остатками Val β 181, Cys β 241, Ala β 250, Asp β 251 и Leu β 252; донор водородной связи D1, взаимодействующий с Thr β 179 и два гидрофобных центра H1 и H2, а также планарная группа R1 (см. рисунок 8) Было установлено, что для проявления антитубулиновой активности соединение должно иметь минимум два гидрофобных центра, один акцептор водородной связи и планарную группу.

К лигандам колхицинового сайта относится множество молекул, являющихся аналогами природных соединений, а также синтетические молекулы различных структурных типов.

1. Колхицин и его производные



Рисунок 9. Колхицин и его производные

Колхицин является первым открытым антимитотическим агентом, выделенным из растения *Colchicum Autumnale*. В 2009 году колхицин был одобрен для лечения подагры и Средиземноморской лихорадки. Несмотря на его высокую антимитотическую и противоопухолевую активность, значительные токсические эффекты (нейтропения, разрушение костного мозга, повреждение ЖКТ и анемия) не позволяют применять колхицин для лечения онкологических заболеваний. С целью снижения токсичности было синтезировано множество аналогов колхицина, к примеру, водорастворимое производное N-ацетилколхинола ZD6126 (**3**), проявляющее значительную антиваскулярную и антимитотическую активность. Однако разработка препарата была прервана на второй стадии клинических испытаний вследствие высокой кардиотоксичности соединения в высоких дозах [112]. Еще одним направлением модификации колхицин-SAHA гибриды (**4**) [125,126], сочетающие в себе действие ингибиторов тубулина и супрессоров деацетилаз гистонов. Более подробно модификации колхицина будут рассмотрены в разделе XX.

2. Комбретастатин А4 и его аналоги

Комбретастатин A4 (5) – природное соединение, выделенное из *Combretum caffrum*, имеет значительную антиваскулярную и противоопухолевую активность. Однако разработка комбретатстатина была дальнейшая затруднена вследствие низкой растворимости в воде и неудовлетворительных фармакокинетических показателей. Было установлено, что триметоксифенильное кольцо вносит значительный вклад в противоопухолевую активность соединения, что было учтено при создании аналогов комбретастатина (см. рисунок 10).



Рисунок 10. Комбретастатин А4 и его синтетические аналоги

Для увеличения стабильности *цис*-конформации колец при двойной связи было использовано мостиковое соединение этих фрагментов с помощью карбо- и гетероциклических структур [127–130]. Помимо использования гетероцикла в качестве мостикового элемента, они также применялись как заместители в кольце, что способствовало усилению гидрофильных свойств молекулы. Помимо этого, были созданы водорастворимые аналоги комбретатстатина, содержащие фосфатные (6) и аминокислотные остатки [131,132].

3. Подофиллотоксин и его аналоги

Близкими по структуре к колхицину и комбретастатину A4 являются такие соединения, как подофиллотоксин (7) и стеганацин (8) (рисунок 11).



Рисунок 11. Структуры подофиллотоксина и стеганацина

Это токсичные лигнаны, не являющиеся алкалоидами. Они взаимодействуют с тубулином быстрее колхицина. На основе подофиллотоксина были разработаны такие противоопухолевые препараты, как азетопозид, тенипозид и этопозид фосфат [133].

4. 2-Метоксиэстрадиол и его аналоги

2-Метоксиэстрадиол (2-МЕ) (9) – эндогенный метаболит эстрогена, образующийся в печени при гидроксилировании цитохромом Р450 β-эстрадиола с его последующим метоксилированием катехол-О-метилтрансферазой. 2-Метоксиэстрадиол подавляет васкуляризацию опухолей *in vivo*. Основными побочными эффектами данного препарата являются нейропатия и расстройство органов ЖКТ.



Рисунок 12. Структуры 2-метоксиэстрадиола (9) и его амидного производного (10).

Было установлено, что 2-МЕ дезактивируется в организме посредством конъюгации по положениям «3» и «17», а также окисления по положению «17». Это приводит к уменьшению его активности *in vivo* примерно на 2 порядка [134]. С целью увеличения его стабильности был создан аналог, модифицированный по положениям «3» и «17» [135].

5. Отдельные представители лигандов колхицинового сайта тубулина.

Помимо соединений, принадлежащих к вышеописанным структурным типам, отдельного внимания заслуживают такие молекулы, как нокодазол (11), курацин А (12) и индибулин (13) (рисунок 13).



Рисунок 13. Структуры отдельных представителей лигандов колхицинового сайта тубулина

Нокодазол 11 – природное соединение, проявляющее антимитотическую активность. Он подобно колхицину, стеганацину 8 и подофиллотоксину 7 взаимодействует с тубулином обратимо и с относительно большой скоростью. Однако его терапевтическое применение ограничено различными побочными эффектами, среди которых угнетение функций костного мозга, нейтропения, лейкопения и анемия [136].

Курацин А **12** первоначально выделен как основной липидный компонент цианобактерий. Он является потенциальным ингибитором роста клеток и митотического деления. Он быстро и «точно» встраивается в колхициновый сайт тубулина. Интересно отметить, что в структуре большинства лигандов данного домена содержится, как минимум, один ароматический фрагмент, а чаще два, в то время, как курацин А является исключением из данного правила и не содержит ароматических фрагментов.

Индибулин (D-24851) **13** – активный антимитотический препарат, применяемый перорально. Он эффективен против многих типов опухолей, в том числе и против таксолрезистентных. В доклинических испытаниях индибулин продемонстрировал отсутствие нейротоксических побочных эффектов. Индибулин не взаимодействует напрямую с колхициновым сайтом и демонстрирует лишь частичную конкуренцию с остальными лигандами данного домена за ингибирование белка [137]. Он не только ингибирует активность тубулина и кассетного белка MRP, но и воздействует на опухоли, проявляющие резистеность к цисплатину, ингибитору топоизомеразы SN38 [112].

6. Структура колхицина и ее модификации

Колхицин 1 является основным алкалоидом растения *Colchicum autumnale* (луговой шафран, безвременник осенний), широко произрастающего на территории Европы и Северной Африки.

Ключом к выяснению структуры колхицина было правильная интерпретация экспериментальных данных, касающихся кольца C трициклического скелета. Значительный прогресс был достигнут Дьюаром в 1945 году, который предположил, что кольцо C представляет собой циклогептатриенолон с ароматическим характером [138]. Эта гипотеза стала отправной точкой для развития химии трополонов (термин,

придуманный Дьюаром для этого класса соединений). Окончательно структура колхицина была установлена в 1952 г. с помощью рентгеноструктурного анализа [139], а абсолютная конфигурация была доказана химической деградацией соединения.





Как было ранее показано, многие элементы структуры колхицина ответственны за взаимодействие с тубулином. Известно, что в колхицине и его активных аналогах кольца A и C находятся друг к другу под углом, близким к 54°, при этом молекула закручивается в спираль, и ее направление соответствует конфигурации aS [140,141]. Практически любая модификация кольца A вызывает полную потерю связывания, в то время как модификации как B-, так и C-колец вполне допустимы (**рисунок 15**). Метокси-группы колец A и C существенны для проявления цитотоксичности соединения, однако не влияют на взаимодействие с P-гликопротеином – белком, ответственным за развитие МЛУ. Установлено, что для распознавания колхициноида P-гликопротеином необходимо присутствие атома азота при C-7 в кольце B как в виде свободного (или замещенного) амина, так и в качестве амидного фрагмента. Полное отсутствие азота в этом положении приводит к тому, что колхициноид перестает быть субстратом для P-гликопротеина [142]. В связи с этим многие исследования были сосредоточены на структурных модификациях C-7 B-кольца для обнаружения аналогов колхицина с улучшенной активностью и меньшей токсичностью или аналогов, которые преодолевают лекарственную устойчивость.



Рисунок 15. Возможные сайты модификации структуры колхицина

6.1 Модификации колхицина по кольцу А

Модификации колхицина по кольцу *А* - наименее представительная группа модификаций структуры колхицина. К ней относятся как природно-модифицированные соединения, так и искусственно синтезированные аналоги.

Природный алкалоид корнигерин 14, выделенный из *Colchicum cornigerum*, представляет собой аналог колхицина, в котором вицинальные метоксигруппы во 2 и 3 положениях образуют метилендиокси-мостик:



 IC_{50} (L1210 cells) = 0,02µM

Рисунок 16. Структура корнигерина

Было установлено, что корнигерин обладает приблизительно такими же, как и колхицин биологическими показателями, а том числе ингибирует полимеризацию тубулина, останавливает рост и деление клеток лейкемии L1210 в метафазе [143].

Синтетические модификации кольца *А* были направлены, в основном, на увеличение биодоступности соединения. Так, функционализация колхицина по метоксигруппе в 2 положении значительно повышает растворимость соединения в воде, при этом цитотоксичность данных производных снижается на 1-1,5 порядка



Схема 4. Синтез водорастовримых колхициноидов, модифицированных по кольцу А.

Соединения 16 и 17 продемонстрировали цитотоксичность в диапазоне 0,08 – 1,42 мМ по отношению к клеткам легочной карциномы А549, карциномы яичников 1А9 и эпидермальной карциномы КВ. В качестве контрольного соединения выступал немодифицированный колхицин, для которого значения цитотоксичности находятся в диапазоне 0,004-0,005 мМ для указанных клеточных линий [144].

Известны гликозидные аналоги колхицина - колхикозид 18 и тиоколхикозид 19 [145–147], в которых метоксигруппа в положении «З» замещена на углеводный остаток. Колхикозид – природный алкалоид, выделенный из растения *Gloriosa superba*, является исходным соединением для получения тиоколхикозида. Последний используется в

качестве миорелаксанта в терапии ревматологических расстройств вследствие его анальгезирующего и противовоспалительного действия.



Рисунок 17. Структура колхикозида и тиоколхикозида

Установлено, что эти производные имеют не только увеличенную растворимость в воде, но и способны ингибировать сигнальные каскады и продукты регуляции транскрипционного фактора NF-kB⁹.

Получен ряд функционализированных производных тиоколхикозида 21, проявляющих афинность к GABA- и стрихнин-чувствительным рецепторам глицина, локализованным в головном и спинном мозге [148,149]. Стартовым соединением выступал 3-деметилтиоколхицин 20, который вступал в реакцию с ацетилрованными гликозилфторидами в присутствии тетраметидгуанидина и эфирата трехфтористого бора в ацетонитриле, что приводило к получению ряда зацищенных гликозидов тиоколхицина. После удаления защитных групп была проведена модификация данных соединений по положению «б» углеводного фрагмента (схема 5).





Трансалкилирование и ацилирование метоксигруппы колхицина в положении «3» [150–153] не приводило к значительным изменениям цитотоксичности соединений, однако введение объемных заместителей является нежелательным.

⁹ Транскрипционный фактор NF-кВ — универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Нарушение регуляции NF-kB вызывает воспаление, аутоиммунные заболевания, а также развитие вирусных инфекций и рака.



Схема 6. Переалкилирование и ацилирование метоксигруппы колхицина в кольце А

Электрофильное алкилирование кольца *A* в положение «4» [154] было проведено при взаимодействии колхицина с параформальдегидом или смесью альдегида с амином в присутствии концентрированной серной кислоты. Во все случаях наблюдалось снижение цитотоксической активности производных не менее чем на 2 порядка по сравнению с колхицином.



Схема 7. Синтез алкилированных производных колхицина по положению «4» кольца А.

Некоторые из полученных производных демонстрировали практически 100% ингибирование полимеризации тубулина в низком микромолярном диапазоне концентраций, однако, как правило, изменения в кольце *А* ведут к снижению биологической активности молекул и не способствуют снижению побочных эффектов колхицина.

6.2. Модификации колхицина по кольцу В

Кольцо *B*, наряду с кольцом *A*, играет важную роль в связывании с тубулином [155], хотя изменения в данном структурном фрагменте в меньшей степени отражаются на биологической активности соединения. Варьирование заместителя при С-7 может быть реализовано с сохранением высокой цитотоксичности [156].

6.2.1. Скелетные модификации кольца В.

К скелетным модификациям кольца *В* относятся, в основном, сужение и расширение цикла, включение в него гетероатомов, а также создание бициклических структур на основе данного фрагмента молекулы. Они направлены на установление зависимости эффективности ингибирования полимеризации тубулина производными колхицина, имеющими различный диэдральный угол между кольцами *А* и *C*, который определяется, в том числе, и размером кольца *B*.

В 1993 году была опубликована работа по синтезу серии тиоколхициноидов, имеющих шестичленный цикл *В* [157] (схема 8).

Деацететилтиоколхицин 29 был получен из природного колхицина по известным литературным протоколам [158]. Последующее применение перегруппировки Демьянова [159] позволило синтезировать колхициноид 30, содержащий гидроксиметильную группу в кольце В. Ацилирование данного спирта разнообразными ацилхлоридами приводило к производным 31. Также из колхициноида 30 был получен алкен 32 по реакции гидратации с тозилхлоридом и DBU.



Схема 8. Синтез аналогов тиоколхицина с сокращенным циклом *B*. Условия проведения реакций: a) NaSCH₃, H_2O ; b) HCl, CH₃OH; c) NaNO₂, AcOH, H_2O ; d) TsCl, DBU, бензол; e) RCOCl, Py

Новые колхициноиды **30-32**, а также колхицин **1** и тиоколхицин **28** протестировали на клеточных линиях КВ (рак носоглотки), А549 (карцинома легкого), НСТ-8 (рак толстого кишечника), Р388 (штамм лейкемии), RPMI-7951 (меланома) и TE671 (рак мозга)

с целью установления способности данных молекул ингибировать клеточный рост. Было показано, что среди новых молекул сложный эфир **31**, имеющий в качестве заместителя R метильную группу, демонстрирует наибольшую цитотоксичность, сравнимую с активностью тиоколхицина.

В экспериментах по ингибированию полимеризации тубулина наилучшие результаты продемонстрировал алкен **32**, а также сложноэфирные производные, имеющие заместители небольшого размера. Высокая ингибирующая способность соединения **32** свидетельствует о том, что нахождение молекулы в S-конфигурации не является необходимым для связывания с тубулином. Это также подтверждается сравнением ингибирующей способности алкена **32** и спирта **30** (она составляет 2.4 мкМ для алкена и 3.6 мкМ для спирта соответственно), а также конкурирующим связыванием с тубулином в присутствии меченного колхицина. Подобная закономерность наблюдается и для соединений **33-35**, не содержащих стереоцентров в кольце *B* [160–163] (**рисунок 18**), однако превосходящих свои аналоги – колхицин и деацетиламидоколхицин по способности ингибировать полимеризацию тубулина.



Рисунок 18. Активные колхициноиды, не содержащие стереоцентра в кольце В

Позднее в группе профессора Г.-Г. Шмальца [164] были получены колхициноиды 37 - 40 с сокращенным циклом *B* по аналогичным методикам:



Схема 9. Синтез колхициноидов с сокращенным циклом В. Условия проведения реакций: a) Boc₂O (3.5 экв.), NEt₃ (1.0 экв.), DMAP (2.0 экв.), CH₃CN, 3 ч, кипячение; b) NaOMe (2.0 экв.), MeOH, 30 мин, rt; c) TFA, 15 мин, rt, суммарный выход трех стадий 80%; d) NaNO₂

(1.5 экв.), AcOH (2.5 экв.), H₂O, 7 ч, rt, 54%; e) DMAP (1.2 экв.), хлорформат (1.2 экв), DIPEA (1.0 экв.), CH₂Cl₂, 1 ч, rt, 76-80%; f) PPh₃ (2.0 экв.), D^tBAD (2.0 экв.), CHCl₃, 0°C \rightarrow rt, 19 ч, >99%; g) NCS (1.5 экв.), AcOH, 5 ч, 70 °C, 45%.

Наиболее перспективным является колхициноид **38** с экзо-связью в цикле В. Совместная терапия **38** с винкристином имеет значительный синергетический эффект в том числе и для штаммов клеток, резистентных к винкристину. Непосредственно колхициноид **38** проявляет активность в наномолярном диапазоне концентраций и обладает выраженной апоптоз-индуцирующей активностью.

Для расширения цикла *В* и включения в него атомов азота часто используется перегруппировка Бекмана [165]. При этом цикл *В* расширяется до 8 атомов [166,167]:



Схема 10. Синтез колхициноидов с расширенным кольцом В

В начале из колхицина был получен деацетилированный аналог **41** [166], который посредством реакции трансаминирования с использование реагента Раппопорта [168] превращали в кетон **42**, являющийся ключевым интермедиатом. Взаимодействие данного кетона с гидрохлоридом гидроксиламина с карбонатом натрия приводило к образованию оксима **43**, который был превращен в смесь лактамов **44** и **45** с применением перегруппировки Бекмана.

Преимущественно образующийся лактам **45** был восстановлен до неустойчивого соединения **46**, которое было стабилизировано введением ацетамидной группы по реакции с пентафторофенилацетатом [169] (схема **11**):



Схема 11. Синтез ацетилированного колхициноида с расширенным кольцом В

В качестве соединения-стандарта для проведения биологических тестов *in vitro* был выбран метиловый эфир *N*-ацетилколхинола **48**, который ингибирует полимеризацию тубулина несколько более эффективно, чем колхицин [170].
Ингибирование полимеризации тубулина, IC₅₀, µМ



Рисунок 19. Ингибирующая способность колхициноидов 42-45, 47, 48.

Среди синтезированных аналогов колхицина с расширенным циклом B наибольшую эффективность продемонстрировали кетон 42 и оксим 43, цитотоксичность которых равна токсичности метилового эфира N-ацетилколхинола (рисунок 19). Чуть более низкую активность продемонстрировал ацетилированный колхициноид 47, в то время как лактамы 44 и 45 оказались практически неактивными. Для наиболее активного соединения 43 была получена рентгенографическая структура. Было установлено, что угол между кольцами A и C в данном соединении составляет 53°, что соответствует таковому в наиболее активных соединениях колхицинового ряда [171].

Помимо описанных выше производных 42-47 авторами данного исследования были синтезированы колхициноиды 50 и 51, содержащие кольцо *B*, конденсированное с гетероциклами, по следующей схеме:



Схема 12. Синтез колхициноидов, содержащих кольцо *B*, конденсированное с гетероциклом. *Реагенты и условия*: (*a*) *Реагент Бредерека*[172], ДМФА, 60 °С, 24 ч; (*b*) NH_2-NH_2*2HCl , CH_3OH , rt, 24 ч; 58%; (c) C_2H_5ONa , гуанидин гидрохлорид, C_2H_5OH , кипячение, 3.5 ч, 96%.

Данные производные продемонстрировали значительную цитотоксичность по отношению к клеткам MCF-7, сравнимую с такими активными соединениями, как колхицин и метиловый эфир *N*-ацетилколхинола. При концентрации 0.05 µM и менее оба производных вызывали не только ингибирование клеточного деления, но и разрушение органелл клетки.

Похожее соединение было получено и описано в 2003 году группой профессора *B*. *Dalieli* [173]. Тетрациклический колхициноид **52** был синтезирован исходя из деацетилтиоколхицина **29** при обработке его трет.-бутилнитритом в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты (**схема 13**):



Схема 13. Синтез тетрациклического аналога тиоколхицина

Предположительно, данный тетрациклический продукт формируется после нуклеофильной атаки на крайний атом азота диазосоединения, образующегося из деацетилтиоколхицина при взаимодействии с трет.-бутилнитритом:



Схема 14. Механизм образования тетрациклического колхициноида 52

Необходимо отметить, что смена диазотирующего агента с трет.-бутилнитрита на азотистую кислоту приводила к образованию из деацетилтиоколхицина продукта **30**, описанного ранее, что может объясняться образованием другого промежуточного соединения – соли диазония, легко вступающего в перегруппировку Демьянова.

Помимо колхициноидов с расширенным циклом *В* и включением в него атома азота, существуют производные, содержащие в цикле атом кислорода. Синтез подобных соединений был осуществлен в группе профессора Г.-Г. Шмальца [174] (схема 15).

Стартовым соединением являлся легкодоступный кетон **53**. Для формирования нужной конфигурации кето-группу восстанавливали по реакции Кори-Бакши-Шибата [175], при этом получали спирт **54** с энантиомерным избытком 75% *ее*. Далее полученный спирт алкилировали с образованием пропаргилового эфира **55**, где терминальная тройная связь была защищена триметилсилильной группой. Замещение йода на остаток яблочной

кислоты было реализовано посредством предварительного иод-магниевого обмена [176] с последующим трансметаллированием с использованием CuCN·2LiCl [177]. Полученный купрат реагировал с метиловым эфиром 4-хлор-4-оксобутановой кислоты. Далее был синтезирован диазокетон, который трансформировали в ключевой интермедиат **58** с применением родий-катализируемого внутримолекулярного циклоприсоединения. Попытка превратить данный субстрат в трополоновый продукт **61** не увенчалась успехом, однако вместо него был синтезирован эпоксид **62**.



Схема 15. Синтез колхициноида, содержащего атом кислорода в кольце *B. Условия* проведения реакций: a) BH_3 ·SMe₂, THF, r.t., 3 ч; далее MeOH; (b) NaH, пропаргил бромид, $ДM\Phi A \ 0^{\circ}C, r.t., 12 \ u;$ (c) $ЛДA, T\Gamma\Phi, -78 \ ^{\circ}C, 1 \ u;$ затем $TMSCl, -78 \ ^{\circ}C \rightarrow r.t., 3 \ u;$ (d) *i*- $PrMgCl·LiCl, T\Gamma\Phi, -30 \ ^{\circ}C \rightarrow -10 \ ^{\circ}C, 30 \ muh.;$ затем $CuCN \cdot 2LiCl, -30 \ ^{\circ}C \rightarrow r.t., 2.5 \ u;$ далее метил 4-хлор-4-оксобутаноат, $-30 \ ^{\circ}C \rightarrow r.t., 2 \ u;$ (e) $LiOH, T\Gamma\Phi, 0 \ ^{\circ}C \rightarrow r.t., 20 \ u;$ (f) $ClCO_2iBu, NEt_3, THF/Et_2O \ (1:1), -20 \ ^{\circ}C, 1 \ h;$ далее $CH_2N_2/Et_2O, -5 \ ^{\circ}C, 12 \ u;$ (g) $[Rh_2(OAc)_4],$ *monyon*, 130 \ ^{\circ}C, 5 \ u; (h) L-Selectride, $T\Gamma\Phi, -78 \ ^{\circ}C, 3 \ u;$ (i) TMSOTf, $Et_3N, CH_2Cl_2, -60 \ ^{\circ}C \rightarrow -10 \ ^{\circ}C, 1.5 \ u;$ затем $K_2CO_3, MeOH, -60 \ ^{\circ}C \ r.t., 1 \ u.$

Была изучена апоптоз индуцирующая активность соединений **59** и **60** на линиях BJAB и Nalm-6 (резистентная к терапии доксорубицином), а также эффект от совместного использования данных колхициноидов с доксорубицином. В то время как производное **60** не продемонстрировало никакой значимой активности на данных клеточных линиях, продукт **59** вызывал значительную индукцию апоптоза при концентрациях 1 – 10 μM. Для обоих соединений наблюдался синергический эффект при одновременной терапии с доксорубицином: при использовании 1нМ доксорубицина и 10 μM соединения **59** увеличение популяции апоптозирующих клеток достигало 400%.

Получены новые синтетические триазолсодержащие бензоксиазепины **67** [178], являющиеся структурными аналогами известных колхициноидов [174]. Стартовым соединением для получения таких соединений выступал функционализированный бензальдегид **63** (схема 16):



Схема 16. Синтез триазолсодержащих бензоксиазепинов – структурных аналогов колхицина. Условия проведения реакций: а) NaN_3 , $CuSO_4$, метанол, 20 °C, 5 ч; b) NaH, $T\Gamma\Phi$, 24 ч, $0\rightarrow 20$ °C; c) толуол, 110°C, 24 ч. Синтез бороновых кислот проводили согласно литературному протоколу [179].

Ключевой стадией синтеза производных 67 является получение арилазидов 66, содержащих алкинильный фрагмент в боковой цепи, которые в результате термической реакции Хьюсгена [180] позволяют получить трициклические триазолы. Показано, что триметоксизамещенные производные 67 демонстрируют цитотоксичность в низких микромолярных концентрациях (IC₅₀ = 2 и 4 μ M) по отношению к клеткам T3M4 и BxPC-3, что, свидетельствует о важности триметоксизамещенного цикла *A* для проявления цитотоксической активности.

Еще одним примером триазольных производных колхицина являются тетрациклические производные, синтезированные группой профессора *W. Dehaen* с применением реакции окислительного биарильного сочетания при действии соединений гипервалентного иода [181]. Интересно отметить, что триазольные интермедиаты получались in situ в трехкомпонентной реакции 1,3-биполярного циклоприсоединения с использованием метоксилированных ароматических кетонов, гетероциклических первичных аминов и р-нитрофенилазида. Механизм образования таких соединений описан в более ранних работах авторов[182].



Схема 17. Синтез тетрациклических триазолсодержащих аналогов колхицина по реакции окислительного биарильного сочетания

В 2012 году научной группой К. Nicolaou *et al* [183] был синтезирован ряд колхициноидов с модифицированными циклами *B* и *C*. Для каждой группы схожих молекул был разработан и реализован тотальный синтез из коммерчески доступных стартовых соединений, что является существенным преимуществом в аспекте вариативности функциональных групп и путей сочленения каркаса молекулы.



Рисунок 20. Синтетические аллоколхициноиды с модифицированным кольцом *В* и их цитотоксическая активность.

Некоторые из синтезированных колхициноидов проявляют значительную цитотоксическую активность в отношении клеток колоректальной карциномы HT-29, что свидетельствует о высоком потенциале данных структур для дальнейшей разработки.

6.3.2 Модификации боковых цепей

Наиболее разнообразными вариациями боковых цепей цикла *В* колхицина являются модификации ацетамидного фрагмента при С-7.

Для увеличения биодоступности производных колхицина были получены водорастворимые гликозилированные производные **68** по реакции между метоксаминсодержащим колхициноидом **69** и рядом восстанавливающих сахаров [184] (**схема 18**):



Схема 18. Синтез гликозилированных производных колхицина по боковой цепи при C7. Условия проведения реакций: а) MeONH₂-HCl, Py, MeOH, rt, 1 ч, 99%; b) BnBr, NaHCO₃, DMF, 70 °C, 16 ч, 80%; c) BH₃-Py, 6 M, далее HCl в EtOH, 15 ч, 88%; d) (Boc)₂O, NaHCO₃, THF/H₂O (2:1), 16 ч, 96%; e) H₂, Pd/BaSO₄, EtOH, 1.5 ч, 99%; f) пентафторфенол, диизопропил карбодиимид, CH₂Cl₂/диоксан (1:1) rt, 16 ч, 80%; g) CH₂Cl₂, 20 ч, rt, 96%; h) TFA, MeOH, 72 ч, 78%; i) моносахарид, DMF/AcOH, 24 ч, 40 °C, >65%. Деацетилколхицин был синтезирован согласно литературному протоколу [185]

Вначале из глиоксалевой кислоты в 6 стадий был получен активированный эфир, который при взаимодействии с деацетилколхицином приводил к образованию метоксиамин-содержащего агликона 69. Данное соединение вводили в реакцию с моносахаридами, что позволило получить 58 гликозилированных различными производных с выходами от 14 до 78%. Синтезированные производные 68 обладают менее выраженной цитотоксической активностью (0,3 – 1 µM) по сравнению с колхицином (0,025 – 0,035 µМ) по отношению к клеточным линиям SKOV-3, ADR-Res, SF-268 и HCT-116. Наиболее интересным результатом данной работы является то, что два гликозида, содержащие дезоксипентоз, обнаруживают свойства стабилизаторов остатки микротрубочек, т.е. оказывают противоположное колхицину действие на тубулин. Это исследование является первым примером взаимопревращения этих двух различных механизмов посредством простой синтетической функционализации.

Для создания липофильных производных колхицина 71 был использован метод click-конъюгирования азидопроизводного колхицина и алкинильного сложного эфира жирных карбоновых кислот [186] (схема 19). Для этого из колхицина в три стадии был

получен деацетилколхицин 36, в котором аминогруппа была замещена на азидную с трифторметилсульфонилазида использованием [187] $(TfN_3).$ Конъюгирование с пропаргиловыми эфирами пальмитиновой и олеиновой кислот происходило в условиях 1,3-диполярного медь-катализируемого циклоприсоединения И микроволнового облучения. С применением этого метода были получены также производные аллоколхицина 73 и колхинола 77.



Схема 19. Синтез липофильных триазольных производных колхицина, аллоколхицина и колхинола. Условия проведения реакций: а) 0.1 М HCl, AcOH, 100 °C, 3 ч; b) NaOH, I₂, KI, H₂O, 0 °C, 1.5 ч; c) Zn, AcOH, 120 °C, 1 ч; d) 0.2 М HCl, MeOH, 120 °C, 65 ч; e) TfN₃, CuSO₄ (1 мол. %), NaHCO₃, H₂O, MeOH, 2ч; f) NEt₃, Boc₂O, DMAP, CH₃CN, кипячение, 3 ч; g) NaOMe (20 мол. %), MeOH, rt, 45 мин; h) TFA, rt, 15 мин; i) TfN₃, CuSO₄ (1 мол. %), K₂CO₃, H₂O, MeOH, CH₂Cl₂ 24 ч; j) MeOH, NaOMe (2 экв.), 75 °C, 1ч.

С применением данного подхода был получен широкий ряд функционализированных производных колхицина, содержащих алкильную, арильную, гетероарильную, гидроксильную, аминную, сложноэфирную группу, а также фрагменты углеводов, стероидов и металлоорганические комплексы [186,188–190].



Colch - остаток колхицна, аллоколхицина или колхинола

Рисунок 21. Примеры производных колхицина, синтезированные с применением clickконъюгирования и их цитотоксическая активность.

Металлорганические производные колхицина могут быть получены не только с использованием click-методологии с участием производных металлоценов, но также и посредством создания хелатных комплексов. Примеров такого производного колхицина является комплекс колхициноида с трикарбонилом рения **80** [191], полученный по следующей схеме:



Схема 20. Синтез комплекса колхициноида с трикарбонилом рения

Вначале из колхицина был синтезирован деацетилколхицеин **78**, который при взаимодействии с бромуксусной кислотой превращался в тридентатный комплекс колхицин-IDA **79**. Данный комплекс взаимодействовал с трикарбонильным комплексом рения-188, приводя к образованию металлосодержащего колхициноида **80**.

Комплекс колхициноида с рением-188 может быть использован не только для химио-, но и для радиотерапии опухолей. Данное соединение не подвергается трансхелатированию при выдерживании с гистидином и цистеином в течение 48 часов, имеет достаточное для использования в клинической практике время жизни. Эксперименты по биораспределению продемонстрировали накопление препарата в опухоли и извлечением его из общего кровотока. В то же время, накопление данного препарата в печени не изменяется в течение суток, что, возможно, связанно с повышенной липофильностью данного производного. Помимо данного металлокомплексного производного колхицина опубликован ряд работ, описывающих конъюгаты колхицина с комплексом гадолиния [192,193], технеция [194–196], а также кобальта в составе кобаламина [185] В 2018 году были опубликованы две работы [197,198], посвященные получению карбамидных производных колхицина по следующей схеме:





Вначале из колхицина по литературному протоколу был синтезирован деацетилколхицин **36**, который далее взаимодействовал с фенилхлорформиатом приводя к образованию уретана **81**. Данный субстрат реагировал с широким спектром ароматических аминов, что позволило синтезировать ряд карбамидных производных, причем соединения, содержащие электронодонорные заместители, образовавались с большими выходами.

Была определена цитотоксическая активность карбамидных производных колхициноидов по отношению к клеточным линиям HT-29, MCF-7, HeLa, HEK-293. Установлено, что практически все соединения обладали цитотоксчностью в нано- и субнаномолярном диапазоне концентраций, причем наличие атома хлора в *о*-положении в фенильном кольце способствовало увеличению активности соединения. Кроме того, была обнаружена способность данных соединений в концентрациях, близких к IC₅₀ и ниже, снижать экспрессию протоокногенов, связанных с активацией теломеразы: *с-тус, hTERT VEGF*. Было выделено два соединения (**82** и **83**, **схема 21**), ингибирующая способность которых не уступает сунитинибу – известному ингибитору протеинкиназ, одобренному FDA в 2006 году для терапии рака почек, резистентных гастроинтестинальных стромальных опухолей и тяжёлых случаев рака поджелудочной железы.

Родственные описанным выше колхициноидам – производные тиомочевины [199,200], также обладают цитотоксической активностью в наномолярном диапазоне (IC₅₀ по отношению к клеточным линиям A549, HT-29 и HCT116 для наиболее перспективных соединений достигали 0,3 - 5 нМ). В тестах *in vivo* соединения с этильными и *p*-*N*,*N*-диметиламинофенильными заместителями показали значительную противоопухолевую активность, при этом летальность в испытуемой группе была нулевой, у животных не наблюдалось изменений в поведении и потери в весе.



Схема 22. Синтез тиокарбамидных производных колхицина. Реагенты и условия: *a*)*CSCl*₂, *Et*₃*N*, *CH*₂*Cl*₂, 0 °*C*, 2 ч; (*b*) *RNH*₂ или *R*₂*NH*, *CH*₂*Cl*₂ или *MeOH*–*H*₂*O*, *rt*, 24 ч.

В 2007 году был опубликован синтез нового производного колхицина – СТ20126, проявляющего себя как иммуносупрессант [201].



Рисунок 22. Структура колхициноида СТ20126

Данный колхициноид ингибирует пролиферацию лимфоцитов без проявления цитотоксического эффекта, а также подавляет экспрессию генов воспаления, iNOS, TNF- α и IL-1 β в макрофагах. Он вызывает индукцию апоптоза при достижении стадии G2/M клеточного цикла наряду с активацией каспазы-3, что нехарактерно для колхицина и его аналогов. Установлено, что данный препарат проявляет антитубулиновую активность, однако, в отличие от колхицина, он вызывает быстрое разрушение микротрубочек до тубулиновых димеров, а далее индуцирует их полимеризацию в короткие филаменты [202], которые далее не могут нормально функционировать. Способность к вторичной стабилизации микротрубочек у CT20126 выше, чем у таксола [202].

Помимо амидных И карбамидных производных колхицина известны сложноэфирные аналоги, которые были синтезированы на основе тиоколхицина 28. Гидроксильная группа при С7-атоме была сформирована обработке при деацетилтиоколхицина 29 4-формил-1-метилпиридиний бензосульфонатом (FMB) по методу, предложенному Раппопортом [203]. И последующем восстановлении образовавшейся карбонильной группы борогидридом натрия.

Авторами данной работы был применен эффективный способ хроматографического разделения рацемической смеси промежуточных спиртов 91' и 91" для дальнейшего создания энантиомерно чистых сложных эфиров 92 [204]:



Схема 23. Синтез сложноэфирных аналогов тиоколхицина

Были получены сложноэфирные производные на основе алифатических, ароматических и гетероароматических кислот. Показано, что 7*R*-изомеры значительно уступают своим энантиомерам в ингибировании полимеризации тубулина. Кроме самого тиоколхицина были синтезированы сложноэфирные аналоги аллотиоколхицина по схожей методике [205]. Полученные производные более эффективно ингибируют полимеризацию тубулина по сравнению с колхицином и тиоколхицином при одинаковых условиях.

6.3 Модификации колхицина по кольцу С и D.

Трополоновый цикл колхицина играет большую роль при взаимодействии с тубулином [206,207], однако по сравнению с кольцом *A*, данный фрагмент молекулы является более толерантным к возможным структурным модификациям с позиции сохранения высокой биологической активности молекулы. Легкость синтетической модификации кольца *C* является важным фактором при разработке пролекарственных форм соединений колхицинового ряда. Следует отметить, что некоторые из таких модификаций, например, сокращение кольца до шестичленного цикла, не только не снижает активности соединения, но и увеличивает его противоопухолевые свойства.

Одним из наиболее распространенных аналогов колхицина с шестичленным кольцом *С* является *N*-ацетилколхинол **94**, а также его метиловый эфир (NAC и NCME соответственно). К настоящему моменту разработано множество подходов к получению данных соединений.

Широко распространенным способом получения *N*-ацетилколхинола **94** является модификация природного колхицина:



Схема 24. Синтез *N*-ацетилколхинола **94** из колхицина. Условия проведения реакций: а) $HCl, AcOH, 100 \,{}^{\circ}C, 3 \, u; b) I_2, NaI, NaOH, H_2O, 0 - 5 \,{}^{\circ}C, 1 \, u; c) Zn, AcOH, 4 \, u.$

На первой стадии проводят гидролиз метилового эфира в трополоновом цикле колхицина. Продуктом является колхицеин **93** [208], который далее претерпевает окислительную деградацию трополонового цикла в условиях Виндауса [186], что приводит к образованию *N*–ацетилиодоколхинола **74**. Деиодирование проводят под воздействием избытка цинка в среде уксусной кислоты. Все указанные реакции протекают с выходами, близкими к количественным.

Другой метод синтеза *N*–ацетилколхинола из природного колхицина базируется на первичной трансформации колхицина в аллоколхицин **2** [209,210] под действием метилата натрия. После гидролиза сложноэфирной группы образуется аллоколхициновая кислота **95**, карбоксильную группу которой превращали в аминогруппу посредством перегруппировки Шмидта [211]. Далее полученный амин **96** подвергали диазотированию, что приводило к получению *N*–ацетилколхинола **94**:



Схема 24. Альтернативные пути синтеза N-ацетилколхинола 94 из природного колхицина. Условия проведения реакций: а) MeONa, MeOH, 90%; b) H_2O , колич.; c) NaN₃, H_2SO_4 , CHCl₃, 40–45 °C, 22%; d) NaNO₂, HCl, H_2O , 33%; e) MeLi, THF, 75 °C, 1 ч, далее H_2O_2 , MeSO₃H, PhMe, 90%, f) распад пероксида по кумольному методу

Необходимо отметить, что воздействие метиллития на аллоколхицин с последующим окислением образующегося продукта перекисью водорода приводит к формированию *N*–ацетилколхинола по механизму, схожему с получением фенола кумольным методом.

Помимо получения *N*–ацетилколхинола из природного колхицина разработано множество стратегий тотального синтеза аллоколхициноидов [212]. Одной из ключевых стадий практически во всех вариантах синтеза является биарильное (окислительное [213–215] или восстановительное [216]) кросс-сочетание, сочетание по протоколу Сузуки [217].

Помимо широко распространенного катализа солями палладия было описано применение соединений гипервалентного иода [215] или солей таллия [214]. Формирование стереоцентра было реализовано с помощью реакций ассиметрического гидрирования карбонильной группы [218] или енамидов [219].



Схема 25. Основные направления тотального синтеза *N*-ацетилколхинола

Аналогом *N*-ацетилколхинола **94** является его метиловый эфир – NCME **98**. Однин из наиболее интересных подходов к его получению предложил *P. DeShong* [220]. Для соединения двух арильных фрагментов авторы использовали реакцию палладийкатализируемого кросс-сочетания арилгалогенидов с арилсилоксанами, а семичленный цикл *B* был сформирован посредством реакций ацилирования по Фриделю-Крафтсу и последующей перегруппировке типа Фаворского, приводящей к расширению цикла до семичленного:



Схема 26. Синтез рацемического NCME, предложенный *P. DeShong. Условия проведения реакций: a) Pd*(*OAc*)₂, *PPh*₃, *Bu*₄*NF*, *THF*, 93%; b) *NaBH*₄, *MeOH*; c) *PBr*₃, *CH*₂*Cl*₂; d) *KCN*, *DMSO*, *H*₂*O*; e) *KOH*, *EtOH*, 65°C, 54% после 4 стадий; f) *MeSO*₃*H*, 75%; g) *MeOCH*₂*Cl*, *i*-*Pr*₂*NEt*, 66%; h) *CHCl*₃, *NaOH*, *n*-*BuEt*₃*NCl*; i) *2M HCl*, *i*-*PrOH*; j) *H*₂, *Pd/C*, *NaOAc*, *EtOH*, 53% после 3 стадий; k) *NH*₄*OAc*, *NaBH*₃*CN*; l) *Ac*₂*O*, *Py*, 61% после 2 стадий, суммарный выход 8% на 12 стадий.

Норкадиеновый интермедиат 103 подвергался кислотно-катализируемой перегруппировке, сопровождающейся раскрытием циклопропанового кольца И образованием семичленного цикла В, содержащего хлорвиниловый фрагмент И карбонильную группу. Каталитическое гидрирование хлорфенильного фрагмента с последующим восстановительным аминированием и ацилированием приводили к получению рацемического метилового эфира *N*-ацетилколхинола **98** с суммарным выходом в 8% после 12 стадий.

Другой оригинальный подход к получению NCME был предложен группой *J.R. Green* [221] и основывается на внутримолекулярной реакции Николаса [222,223].



Схема 27. Синтез NCME с применением реакции Николаса

Стартовыми компонентами являлись ароматический кетон **105** и арилбороновая кислота **106**. Они вступали в реакцию кросс-сочетания Сузуки, приводящую к образованию биарила **107**. Полученный через 2 стадии пропаргиловый интермедиат **108** реагировал с октакарбонилом кобальта, приводя к образованию комплекса **109**, который претерпевал внутримолекулярную циклизацию, катализируемую кислотами Льюиса. В результате данной циклизации была образована целевая трициклическая структура колхициноида. Асимметрический центр при С-7 был сформирован с использованием реакций энантиоселективного восстановления кето-группы, нуклеофильного замещения и восстановления [224].

Необычным методом синтеза метилового эфира *N*-ацетилколхинола является способ, предложенный в 2017 году группой китайских исследователей [225]. Он основан на фотоиндуцируемом превращении колхицина в β-люмиколхицин **113**, которое сопровождается дальнейшим декарбонилированием и электроциклической перегруппировкой.



Схема 28. Фотоиндуцируемое превращение колхицина в метиловый эфир *N*-ацетилколхинола

Необходимо отметить, что авторами данной работы предложен тотальный синтез колхицина из коммерчески доступного 3,4,5-триметоксибензальдегида.

Еще одним важным биологически активным колхициноидом является аллоколхицин **2**. Разработано несколько стратегий тотального синтеза аллоколхицина:



Схема 29. Основные подходы к синтезу аллоколхицина.

Одной из основных ключевых стадий тотального синтеза аллоколхицина является реакция циклоприсоединения Дильса-Альдера [226,227]. Помимо нее получили применение реакции метатезиса [227], каталитического арилирования [228] и циклоприсоединения, катализируемого солями переходных металлов [229,230].

Получение аллоколхицина 2 из природного колхицина 1 можно осуществить в сильнонуклеофильной среде [209], в результате чего происходит присоединение метилатаниона по карбонильной группе трополонового цикла колхицина. Это присоединение вызывает перегруппировку с формированием норкадиенового интермедиата 114, который далее раскрывается с образованием аллоколхицина 2. Гидролиз метилового эфира аллоколхицина позволяет получить аллоколхициновую кислоту 95 (аллоколхицеин) и использовать ее для синтеза *N*-ацетилколхинола 94.



Схема 30. Синтез аллоколхицина из природного колхицина

Помимо указанных методов, колхицин можно перевести в аллоколхицин посредством фотохимического окисления до эндопероксида **115** с последующим восстановлением до целевого продукта трифенилфосфином [231]:



Схема 31. Фотоокисление колхицина до *N*-ацетилколхинола

Аллоколхицин 2, *N*-ацетилколхинол 94 и его метиловый эфир 98 наряду с колхицином проявляют высокую цитотоксичность по отношению ко многим типам опухолевых клеток, имеют высокое сродство к тубулину, однако все указанные соединения обладают значительными побочными эффектами, ограничивающими их применение в клинической практике.

Еще одной группой модификаций кольца *С* можно считать его сокращение до пятичленного карбо- или гетероцикла.

Большое число колхициноидов с пятичленным циклом *С* представлено в работе французских исследователей [232]. Они предложили синтез группы соединений общей формулой:



Рисунок 23. Колхициноиды с пятичленным карбоциклом С

Синтез данных молекул проводился исходя из 3,4,5-триметоксифенилпропеновой кислоты **116** или ее аналогов. Фрагмент *С* вводили в молекулу при помощи реакции ацилирования енаминов, а замыкание цикла *В* проводили по реакции ацилирования по Фриделю-Крафтсу (**схема 32**).



Схема 32. Синтез колхициноидов с пятичленным циклом С.

О биологических свойствах синтезированных колхициноидов не сообщается

Следующим типом модификации структуры колхицина можно считать создание молекул, содержащих гетероциклический фрагмент, различным образом аннелированный с кольцом *С*.

Аннелирование кольца C с гетероциклическим фрагментом D с применением реакции Дильса-Альдера описано в работе группы M. *Miller* в 2010 году [233]. Авторами предлагается создание бициклических систем на основе C-кольца колхицина при взаимодействии последнего с рядом иминонитрозо-производных. При этом наблюдается образование смеси двух региоизомеров:



Схема 33. Синтез бициклических аллоколхициноидов по реакции Дильса-Альдера

Показано, что наличие заместителя в положении «б», близкого к атому азота, важно для достижения высокой региоселективности данной реакции. Была установлена цитотоксическая активность данных колхициноидов по отношению к клеточным линиям PC-3 (карцинома предстательной железы) и MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы человека). Практически все новые производные уступают не В антипролиферационной активности колхицину и проявляют цитотоксичность при 10 – 30 нМ, однако в экспериментах по ингибированию полимеризации микротрубочек полученные соединения не только не замедляют их самосборку, но и способствуют ей в некоторых случаях.

В 2012 году были получены первые синтетические аллоколхициноиды, содержащие гетероциклическое кольцо *D* [234]. Авторами был разработан тотальный

синтез четырех структурно близких типов пирролоаллоколхициноидов *A* - *D* с различной ориентацией пиррольного фрагмента относительно цикла *C* [234–236] исходя из 3,4,5-триметоксифенилпропионовой кислоты **117** (схема **34**).



Схема 34. Синтез пирролоаллоколхициноидов структурных типов А-D

Ключевыми этапами синтеза являются получение соответствующих биарилов по каталитической реакции Сузуки-Мияура и внутримолекулярная циклизация по Фриделю-Крафтсу с участием соответствующих ацилхлоридов полученных *in situ* с применением реагента Гозе [237]. Дальнейшие трансформации функциональных групп в положении С-7 аллоколхицинового скелета позволяют синтезировать соответствующие тетрациклические кетоны, спирты, азиды, амины и ацетамиды. Следует отметить, что авторам не удалось осуществить асимметрический вариант синтеза производных *A-D*.

Для полученных соединений были исследованы биологические свойства, а именно антипролиферационная и апоптоз-индуцирующая активность по отношению к клеткам лимфомы Беркита ВЈАВ [234,236]. Установлено, что спирты и кетоны структурных типов *A* и *B*, проявляли цитотоксическую активность в нано- и субнаномолярном диапазоне концентраций, демонстрируя при этом относительно низкую неспецифическую токсичность.

Был разработан синтетический метод, позволяющий получать гетероциклические аллоколхициноиды **124** – **126** непосредственно из колхицина, не затрагивая ассиметрический центр молекулы [238–241]:



Рисунок 24. Синтез фурансодержащих производных колхицина

Формирование фуранового кольца, аннелированного с шестичленным циклом С, проводили с использованием тандемных реакций кросс-сочетания Соногашира и внутримолекулярной циклизации, катализируемой солями переходных металлов. Применение в реакции кросс-сочетания функционализированных терминальных алкинов позволило получить ряд целевых производных, содержащих различные заместители в боковой цепи гетероциклического фрагмента [238]. Установлено, что цитотоксическую активность проявляют колхициноиды 124, содержащие гидроксильную группу в псевдобензильном положении. Это может свидетельствовать о важной роли данного фармакофорного фрагмента в формировании ковалентных связей с тубулином за счет лабильных S-H остатков цистеина. Возможность ковалентного взаимодействия таких колхициноидов с тиолами была продемонстрирована на примере различных серосодержащих соединений 126 [239].

Разработан синтез бифункциональных производных колхицина **125** с гетероциклическим циклом *D* [240,241]. Анализ цитотоксической активности показал важность ацетамидного фрагмента при *C*-7, деацетилирование приводило к существенному снижению цитотоксичности колхициноидов *in vitro*.

6.4 Модификации колхицина по боковым цепям

Простейшими модификациями боковых цепей кольца *С* являются замена метоксигруппы трополонового цикла серосодержащим аналогом с образованием тиоколхицина **28** [158] и изменения положения функциональных групп в кольце с образованием изоколхицина **127** [242]:



Схема 35. Синтез тиоколхицина 28, изоколхицина 127 и колхицида 128.

Интересно отметить, что тиоколхицин **28** обладает значительной антипролиферативной активностью и способностью к ингибированию полимеризации тубулина. Он останавливает рост и деление клеток в диапазоне концентраций 0,02 – 70 нМ для клеточных линий КВ, А549, НСТ, Р388, RPMI-7951, ТЕ671 а также способен конкурировать с колхицином в скорости взаимодействия с тубулином [157]. На основе тиоколхицина были получены производные, проявляющие значительную биологическую активность [151]. В свою очередь, изоколхицин **127** не проявляет сродства к тубулину и не является цитотоксичным [243,244].

Еще одним простейшим аналогом колхицина является колхицид **128** [245] – колхициноид с отсутствующей метоксигруппой в положении «10». Колхицид получают из тиоколхицина при взаимодействии с никелем Ренея в ацетоне (**схема 35**). Несмотря на то, что долгое время метоксигруппа в трополоновом цикле колхицина считалась необходимой для взаимодействия с тубулином, колхицид демонстрирует сравнимую с колхицином активность *in vitro*, на 87% связываясь с белком при концентрации 25 µM (колхицин связывается на 90% при тех же условиях) [246]. Необходимо отметить, что в отличие от колхицина, колхицид имеет в 30 и более раз низкую токсичность при однократном внутримышечном введении.

Большое число работ было посвящено изучению биологической активности колхициноидов, содержащих аминогруппу при С-10 в цикле *С*. Выбор азотсодержащих заместителей, как правило, обусловлен тем, что такие производные не теряют своей биологической активности и, как правило, менее подвержены действию белка *P-gp*, вызывающего развитие множественной лекарственной устойчивости [247]. Полученные молекулы содержат при С-10 свободную [248], моно- и ди-замещенную аминогруппу [249, 250], аллил- и пропаргиламины [251], ароматические амины [249, 252], аминокислоты [253], этаноламины [254], морфолиновые и пиперазиновые фрагменты [249] (**рисунок 25**):



Рисунок 25. Производные колхицина, содержащие аминную и родственные функциональные группы при С-10.

Колхициноиды, содержащие небольшие (метильный или этильный) заместители при атоме азота, демонстрируют большую ингибирующую активность по отношению к тубулину, а также высокие индексы цитотоксической активности. Соединения, содержащие изопропильный радикал при атоме азота, имеют схожий профиль цитотоксической и тубулин-ингибирующей активности по сравнению с колхицином [255]. Производные, содержащие объемные заместители, демонстрируют снижение противоопухолевой активности [255,256]. Установлено, что введение аминогруппы приводит к увеличению биологической активности и одновременному снижению токсичности по сравнению с колхицином при одинаковой терапевтической дозе [257].

Было продемонстрировано, что наличие аминогруппы при C-10 уменьшает эффлюкс колхициноида белком *P-gp*, что наблюдается, вероятно, вследствие измененного механизма взаимодействия по сравнению с колхицином [249]. Аналогичные результаты по уменьшению ответной реакции *P-gp* на введение препарата при сохранении его антипролифекационной активности были зарегистрированы и при наличии галогенированных ариламинов [252].

Еще одним подтипом азотсодержащих заместителей по положению C-10 являются соединения **131** и **132**, содержащие нитрогруппу [258]:



IC₅₀ (А549, BEL, MCF-7) = 40-300 нМ

Схема 36. Синез нитросодержащих аналогов колхицина с модифицированным заместителем по C-10

Данные молекулы были синтезированы из природного колхицина. На первой стадии проводили нуклеофильное замещение метоксигруппы по реакции с этаноламином, далее на продукт воздействовали янтарным ангидридом и проводили алкилирование субстрата **130** гидроксибензилбромидом или дибромалканом. Бром замещали на нитрогруппу при взаимодействии с нитратом серебра. Синтезированные колхициноиды **131** и **132** проявляют цитотоксическую активность в диапазоне 0,02 – 0,3 µM по отношению к клеточным линиям A2780, A549, BEL7402, MCF7. Предполагалось, что такие нитропроизводные могут изменять свою биологическую активность из-за способности к генерации молекул монооксида азота, однако авторами не было проведено никаких биологических исследований в данном направлении.

Большое разнообразие вариантов функционализации боковых цепей колхицина, в особенности, положения С7, позволило создать на основе колхицина ряд гибридных молекул и пролекарств для различных типов селективной доставки.

6.5 Гибриды и пролекарства на основе колхицина

Одно из активно развивающихся направлений медицинской химии – создание гибридных лекарственных препаратов. Такие лекарства направлены на вовлечение сразу нескольких механизмов, воздействующих на ту или иную патологию. В случае онкологических заболеваний можно оказывать влияние на сигнальные пути клетки, функционирование ДНК, регуляцию клеточного цикла и апоптоза, ангиогенез. Гибридные лекарства на основе колхицина могут быть направлены как на ингибирование функций микротрубочек, так и на какие-либо другие факторы жизнедеятельности опухоли [259].

Среди гибридов на основе колхицина наиболее распространенным является сочетание в молекуле двух антитубулиновых агентов. Как правило, такие мультивалентные взаимодействия с мишенью могут быть в несколько раз эффективнее, чем исходные препараты.

На базе ингибиторов полимеризации тубулина были созданы гибриды тиоколхицина и *vinca*-алкалоидов – винорельбина и виндолина [260].



Рисунок 26. Структура гибридов тиоколхицина и *vinca*-алкалоидов

Объединение двух активных фрагментов гибрида осуществлялось с помощью реакции ацилирования по Штеглиху между дикарбоновой кислотой и деацилированными тиоколхицином и виндолином (винорельбином). Полученные конъюгаты 133 и 134 продемонстрировали более высокую биологическую активность по сравнению с исходными молекулами, причем данная активность сильно зависит от длины используемого линкера.

В 2012 году были синтезированы бивалентные ингибиторы тубулина **142**, состоящие из фрагментов колхицина и тубулизина [261]. Тубулизин взаимодействует с

остатком Cys12 в β-субъединице тубулина. Этот участок белка ответственен за обратимое связывание с молекулой ГТФ [262].

Объединение активных фрагментов молекулы было реализовано по реакции медькатализируемого 1,3-диполярного циклоприсоединения. Полученные гибриды обладают умеренной цитотоксичностью, которая сильно зависит от гидрофобности молекулы.



Схема 37. Синтез бивалентных ингибиторов тубулина на основе колхицина и тубулизина. Условия проведения реакций: а) ацетон, H_2O , 0°С—20 мин, rt—20 ч; b) $NH_2CH_2C\equiv CH$, диоксан, 100°С, 60 ч; c) $NH_2(CH_2)_2OH$, диоксан, 100°С, 60 ч, d) $HC\equiv C(CH_2)_mCOOH$, DCC, DMAP, $T\Gamma\Phi$, rt, 24 ч.

Вначале из колхицина в три стадии был получен деацетилколхицин **36**, который далее взаимодействовал с азид-содержащими карбоновыми кислотами в условиях реакции Штеглиха. Ацетиленовые блоки **140** и **141** были синтезированы из цианурхлорида **136** при последовательном его взаимодействии с метоксилированным бензиламином **137** и этаноламином. Гидроксильная группа в составе этаноламина была ацилирована кислотами, содержащими терминальную тройную углерод-углеродную связь. Конъюгация полученных фрагментов была проведена по реакции медь-катализируемого биполярного циклоприсоединения.

Гибриды разнонаправленного действия созданы при конъюгации колхицина [263] (и тиоколхицина [264]) с таксолом – колхитакселя **146**.



Схема 38. Синтез колхитакселя. Условия проведения реакций: а) глутаровый ангидрид, ДМФА; b) TBDMSCl, DMAP; c) DCC, DMAP; d) TBAF.

Известно, что как в случае колхицина, так и в случае таксола химические модификации боковой цепи кольца B могут быть проведены в широком диапазоне без существенного снижения их биологической активности. Принимая во внимание данный факт, колхитаксель **146** был получен при объединении активных фрагментов молекул с помощью линкера на основе глутаминовой кислоты при ацилировании аминогруппы С7-колхицина и гидроксильной группы кольца B таксола. Цитотоксичность колхитакселя и тиоколхитакселя находится в диапазоне 5-15 нМ в зависимости от испытуемой клеточной линии.

Все вышеописанные антитубулиновые гибриды связываются с β-субъединицей белка. Существует, однако, молекулы, имеющие фрагменты, взаимодействующие и с α-субъединицей [265]. Такие гибриды были получены при объединении колхицина с аналогами пиротенина (5,6-дигидро-α-пироном) [266].



Схема 39. Синтез конъюгатов колхицина с аналогами пиротенина

Был синтезирован ряд конъюгатов **148** – **150**, содержащих линкеры различной длины и включающие амидную и сложноэфирную группы. Помимо способности к связыванию с тубулином данные гибриды воздействуют на функционирование генов, участвующих в регуляции канцерогенеза, а именно *VEGF*, *hTERT*, *c-myc*.

Получен ряд конъюгатов колхицина и производных адамантана [267–271], содержащих сложноэфирные линкеры различной длины. Соединение колхицинового и адамантильного фрагментов было реализовано с помощью реагента EEDQ - *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина:



Схема 40. Синтез конъюгатов колхицина и адамантана

Было отмечено, что полученные соединения демонстрируют высокую цитотоксическую активность уже в низком наномолярном диапазоне концентраций. Наибольшую активность имеют производные, содержащие 5-6 фрагментов –СН₂– в линкере. Уменьшение или увеличение длины линкера сопровождается резким снижением цитотоксической активности (на 2-3 порядка). Установлено, что снижение активности

наблюдается при введении в адамантильный фрагмент полярных групп. Наличие объемных гидрофобных фрагментов, напротив, приводит к увеличению цитотоксичности конъюгата. Это может свидетельствовать о том, что адамантильный фрагмент встраивается в объемный гидрофобный карман, который, скорее всего, находится преимущественно в α-субъединице тубулина, что может объяснять способность данных производных вызывать кластеризацию гетеродимеров белка.

Кроме того, были получены конъюгаты колхицина с такими антитубулиновыми агентами, как подофиллотоксин [272], комбретастатин [273] и каулерпенин [274].



Рисунок 27. Гибриды колхицина с подофиллотоксином, комбретастатином и каулерпенином

Помимо гибридов с антимитотическим агентами известны соединения, содержащие фрагменты колхицина и биологически активных веществ иного действия. Одним из таких примеров являются колхицин-SAHA-гибриды [125,126]. Они содержат фрагмент ингибитора деацетилазы гистонов (HDAC). Деацетилазы гистонов угнетают процесс транскрипции генов, тем самым влияя на множество биохимических процессов. Колхицин-SAHA-гибриды **157** содержат фрагмент гидроксамовых кислот, который используется для координации на ион цинка, а трициклическое ядро играет роль защитное терминальной группы.



Рисунок 28. Структура колхицин-SAHA-гибридов.

Поскольку все полученные гибриды показали значительный уровень HDACингибирующей активности, можно утверждать, что колхицин является хорошей терминальной защитной группой. С другой стороны, внедрение в молекулу HDACфармакофора не ведет к снижению антитубулиновой активности, что может свидетельствовать об эффективности мультимодального действия данных конъюгатов.

Другим примером гибридных молекул с разнонаправленным биологическим действием является колхифульвин **158** [275] – гибрид колхицина и противогрибкового антибиотика гризеофульвина **159** (рисунок **29**):



Рисунок 29. Колхифульвин – гибрид колхицина и гризеофульвина

Ключевой реакцией в синтезе колхифульвина является окислительное сочетание – спироциклизация двух связанных бензольных колец, одно из которых содержит свободную гидроксильную группу, а другое – активирующие и направляющие кислородсодержащие фрагменты. Данная реакция была успешно проведена при использовании соединений гипервалентного иода – фенилиододиацетата (PIDA).



Схема 41. Синтез колхифульвина.

Несмотря на то, что синтезированный гибрид содержит в себе фрагменты, часто обнаруживаемые в биологически активных молекулах [276], цитотоксическая активность колхифульвина является очень низкой и не проявляется даже при концентрациях 100 мкМ и более. Кроме того, колхифульвин не взаимодействует с тубулином в силу отсутствия необходимых фармакофорных фрагментов для связывания с белком.

Спектр колхицин-содержащих гибридов не ограничивается приведенными примерами. Существуют конъюгаты, содержащие антиметаболит 5-фторурацил (160) [277], гликопептидные дендримеры (161) [278,279] для улучшенного проникновения через клеточную мембрану, антитубулиновые агенты SPIKET, связывающиеся с β-тубулином и соединения COBRA, являющиеся лигандами для α-субъединицы тубулина [280].



Рисунок 30. Другие гибриды на основе колхицина

Еще одну важную группу производных колхицина составляют пролекарства на его основе. Создание пролекарственных форм посредством изменения структуры активного соединения, позволяет влиять на одно или несколько ADMET-характеристик¹⁰. Кроме того, создание пролекарственных форм может быть направлено на создание сайтов селективной доставки препарата к поврежденному органу или ткани и высвобождению активного компонента в очаге патологии под воздействием внутренних факторов (pH, ферменты и др.) [281]. Таким образом, развитие методологии создания пролекарственных форм преследует следующие цели [282]:

1. Улучшение фармакологических характеристик препарата, таких как растворимость в воде, химическая стабильность, снижение факторов, вызывающих боль и раздражение у пациентов.

2. Улучшение фармакокинетических свойств: всасывание препарата при пероральном или другом применении, распределение между органами и тканями, селективная доставка к очагу патологии, изменение кинетического профиля препарата.

3. Изменение фармакодинамики препарата: влияние на терапевтический индекс, синтез комбинированных препаратов.

Одним из наиболее простых и широкоизвестных пролекарств на основе колхицина является водорастворимый *N*-ацетилколхинол фосфат (**3**) ZD6126[283] антиваскулярного действия.



Схема 42. Синтез фосфатного водорастворимого производного *N*-ацетилколхинола ZD6126

¹⁰ ADMET – группа характеристик в фармакокинетике и фармакологии, означающих поглощение, распределение, метаболизм, выведение и токсичность лекарственного средства. Эти критерии определяют возможность применения тех или иных лекарственных препаратов в клинической практике

Биологические исследования демонстрируют одинаковую аффинность к тубулину у пролекарства **3** и активного лекарственного средства **94**. Обнаружено, что *N*ацетилколхинол фосфат вызывает заметные обратимые изменения морфологии эндотелиальных клеток в субцитотоксических дозах. Исследования *in vivo* проводились с использованием мышиной модели опухоли (CaNT) с однократным введением дозы, значительно ниже максимально переносимой. Эти исследования показали значительное уменьшение объема сосудов и индукцию обширного некроза в опухолевом образовании, что согласуется с сосудистыми, а не цитотоксическими эффектами.

Распространенную группу пролекарств колхицина составляют пептидные производные. Одно из них - 162, содержащее олигопептид Ala-Ala-Asn-Val-OH [284], может быть селективно распознано и гидролизовано человеческой аспарагинилэндопептидазой.



Рисунок 31. Структура пептидного пролекарства колхицина

Биологические исследования, проведенные на клетках линий M38L, HCT116, HEK293, M4C и SW620 показали, что синтезированное пролекарство является более токсичным для клеток с повышенным содержанием аспарагинил-эндопептидазы, подтверждено энзиматическое расщепление конъюгата с высвобождением валил-колхицина как активного компонента.

Пример катепсин-В-активированного пролекарства **163**, галогенированного по положению «4» и содержащему дипептид аланина и фенилаланина, был представлен группой профессора *Yasobu* [285]:



Рисунок 32. Пептидный конъюгат колхицина, расщепляемый катепсином В

Дипептид был синтезирован по реакции ацилирования с использованием гидрокарбоната натрия в смеси вода-диметоксиэтан, а затем взаимодействовал с 4фтордеацетилколхицином, приводя к образованию целевого соединения. Биологические исследования с применением клеток HCT116 колоректальной карциномы показали способность энзима к расщеплению синтезированного пролекарства с высвобождением колхицинового агента.

Еще один вид пептидных конъюгатов колхицина (164) был синтезирован группой *Fournier-Dit-Chabert et al* [286]. Колхицин был соединен с олигопептидом посредством

модифицированной метокси-группы при С10 и был способен к расщеплению матриксными металлопротеазами:



Связь, расщепляемая матриксными металлопротеазами

Рисунок 33. Структура конъюгата, расщепляемого матриксными металлопротеазами

После гидролиза матриксными протеазами соединение обладает чрезвычайно высокой аффинностью к тубулину.

Помимо пептид-содержащих молекул к пролекарствам на основе природных полимеров относятся конъюгаты с углеводами и липидами. Примером пролекарств первого типа является соединение 165, синтезированное van Rossenberg [287]. Данный конъюгат содержит вектор селективной доставки к асиагликопротеиновым рецепторам гепатоцитов, в результате чего пролекарство является нетоксичным для нецелевых тканей.



Рисунок 34. Структура таргетного препарата на основе колхицина, конъюгированного в галактопиранозой

Кроме того, известны пролекарства колхицина, связанного с такими полисахаридами как циклодекстрин [288] и хитозан [289].



Схема 43. Синтез конъюгата колхициноида и хитозана

К липофильным пролекарствам можно отнести соединения колхицина и аллоколхицина, содержащие остатки пальмитиновой и олеиновой кислот, соединенные с колхицином через триазольный линкер 167 [290]. Соединения такого типа могут быть легко встроены в наноразмерные липосомальные системы доставки, содержащие векторные лиганды и стабилизирующие компоненты.



Рисунок 35. Схематичное представление терапевтических липосом на основе липидных пролекарств колхицина

Помимо природных полимеров для создания пролекарств могут быть использованы синтетические материалы. Одним из наиболее распространенных подходов является применение полиэтиленгликоля. Группой *Crielaard et al* [291,292] были созданы полимерсодержащие пролекарства колхицина **168**, встроенные в липосомы на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) с добавлением модифицированного 1,2-

дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DSPE-PEG2000) и действующие как антиваскулярные препараты со сниженной токсичностью. *N*-дидроксиацетилколхицин (колхифолин) был связан с полимерным остатком при помощи биодеградируемой сложноэфирной связи. Полученные наночастицы менее токсичны по сравнению с колхицином, имеют большую растовримость в воде, что приводит к изменению в биораспределении и замедленному выведению метаболизированного препарата из организма.



Рисунок 36. Схематическое описание действия пролекарства 168 на основе колхицинсодержащих терапевтических липосом. Взято из [292]. (А) Пролекарства колхицин-ПЭГ, характеризующиеся различной скоростью гидролиза, получены с применением биоразлагаемых ПЭГ-линкеров. (В) Эти пролекарства инкапсулированы в липосомы с увеличенным временем циркуляции. (С) После гидролиза пролекарства I или II во внутренней сфере липосом фармакологически активный колхициноид высвобождается из наночастиц со скоростью kI и kII (kI> kII) соответственно.

7. Заключение

Рассмотренные литературные данные позволяют оценить степень сложности биохимических и физиологических процессов канцерогенеза, количество факторов, влияющих на процесс развития опухоли. Описаны требования, предъявляемые к агентам противоопухолевой терапии. Среди большого количества потенциальных препаратов колхицин демонстрирует большой потенциал в качестве базисного компонента лекарственного средства для терапии онкозаболеваний ввиду его широкой доступности, легкости химической модификации, высокой антипролиферативной активности. Несмотря на большое количество исследований, посвященных химии колхицина и его применению в клинической практике, до сих пор не существует химиотерапевтического препарата на его основе из-за высокой неспецифической токсичности при его применении в высоких дозах. В настоящее время проводятся интенсивные исследования, посвященные подходам к направленной химической модификации структуры колхицина, позволяющей уменьшить нежелательные побочные эффекты, улучшить фармакологические и фармакокинетические характеристики соединения, а также создать на основе данного активного агента систему таргетной доставки.

Обоснование диссертационных исследований.

Несмотря на наличие широкого спектра препаратов химиотерапевтического действия, практически каждый из них обладает серьезными побочными эффектами [107,108]. К таким эффектам относят высокую токсичность, проявляющуюся в развитии нейро- и (кардио)миопатии различной степени, кардиотоксичность, угнетение функций костного мозга, полиорганную недостаточность.

Природный алкалоид колхицин (1) также обладает перечисленными выше недостатками, однако относительная простота его химической структуры и большая распространенность природных источников делает колхицин перспективной структурой для создания новых противоопухолевых препаратов.

После попадания в организм колхицин быстро всасывается из ЖКТ и максимальная концентрация в плазме крови достигается через 2-3 часа. Препарат подвергается быстрой биотрансформации в печени (а именно деметилированию и деацетилированию) за счет действия СҮР ЗА4 изоформы цитохрома Р450 [293]. 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 нарушениям в работе сердечно-сосудистой системы [294].

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 белоклигандного комплекса составляет около 35 часов [295]. Изменение характера взаимодействия, а именно быстрое образование комплекса и его диссоциация, позволят снизить общую токсичность препарата и усилить его антиваскулярные свойства [295]. Кроме того, одним из эффективных методов снижения токсичности является инкапсулирование активного препарата В наноразмерные системы доставки. высвобождающие лекарство под действием определенных факторов (температура, рН среды, облучение, ультразвук, действие энзимов).

Среди используемых в клинической практике противоопухолевых агентов антимитотического действия нет ни одного препарата, являющегося структурным аналогом колхицина. Однако химическая модификация наиболее перспективных соединений позволила создать ряд молекул, демонстрирующих эффективное ингибирование роста опухолей в тестах *in vivo* и преодоление множественной лекарственной устойчивости. В настоящее время данные соединения проходят различные стадии клинических испытаний (рисунок 37, показаны только отдельные примеры) [112]. Общими элементами для всех этих соединений является наличие гетероциклических фрагментов (индольного, фуранового, оксазольного и других), которые считаются привилегированными (часто встречающимися в фармакологических препаратах) в медицинской химии [296].



Рисунок 37. Гетероциклические производные лигандов колхицинового сайта тубулина, находящиеся на клинических испытаниях.

В 2012 году были получены первые синтетические гетероциклические аналоги колхицина (рисунок 38), содержащие индольный фрагмент, сочлененный с циклом С [234,235]. Данные соединения продемонстрировали высокую цитотоксическую лимфомы BJAB активность по отношению к клеткам Беркитта И низкую неспецифическую токсичность. Кроме того, некоторые из полученных производных оказались более активны по отношению к клеткам хронического лимфолейкоза, чем винкристин, применяемый в клинической практике для терапии лейкозов.



Рисунок 38. Первые синтетические гетероциклические аллоколхициноиды

Целью данного диссертационного исследования является создание универсальных подходов к синтезу высокоактивных гетероциклических колхициноидов исходя из природного колхицина. Нами предложено несколько стратегий формирования гетероциклического (пиррольного и фуранового) фрагментов, базирующихся на применении перициклических реакций, а также реакций кросс-сочетания, катализируемых переходными металлами. Применение данных подходов позволило получить около 40 соединений, относящихся к следующим структурным типам:



Рисунок 39. Целевые гетероциклические колхициноиды структурных типов I – IV

Полученные соединения были охарактеризованы с позиций цитотоксичности по отношению к различным линиям опухолевых клеток. Были выявлены наиболее перспективные соединения, для которых проведены исследования по влиянию на клеточный цикл, ингибированию полимеризации тубулина, а также тесты *in vivo*. На основе одного производного были разработаны липидные пролекарственные формы (**рисунок 40**) и созданы энзиматически расщепляемые терапевтические липосомы:



Рисунок 40. Дизайн липидного пролекарства на основе активных гетероциклических колхициноидов и природного фосфатидилхолина

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 липосом на основе данных пролекарств с целью снижения системной токсичности данных противоопухолевых препаратов. Цели работы полностью соответствуют современному состоянию исследований в области органической и биоорганической химии.
Обсуждение результатов

1. Синтез и биологическая активность пирролоаллоколхициноидов І.

Ввиду высокой противоопухолевой активности синтезированных ранее пирролоаллоколхициноидов [234,235], целью данной части работы являлась разработка метода получения аналогичных нерацемических производных исходя из коммерчески доступного (aR, 7S)-колхицина. В исходном соединении присутствует стереоцентр при C7-атоме углерода в цикле B и для сохранения нужной конфигурации молекулы все синтетические манипуляции проводились без участия данного фрагмента молекулы.

На **схеме 44** представлен ретросинтетический анализ соединений структурного типа I. Ключевым фрагментом синтеза являлось формирование пиррольного цикла *D*.



Схема 44. Ретросинтетическая схема синтеза пирролоаллоколхициноидов I типа исходя из природного колхицина.

Для построения данного фрагмента была выбрана *one-pot* последовательность реакций кросс-соченания Соногаширы с последующей внутримолекулярной циклизацией, катализируемой переходными металлами. Субстрат для данных каскадных превращений – ариламин 169, может быть синтезирован из аллоколхициновой кислоты 95 посредством перегруппировки Курциуса. В свою очередь, кислота 95 может быть получена из природного колхицина 1 после сокращения трополонового цикла *C* в сильнонуклеофильной среде.

Вначале нами была предпринята попытка синтеза колхициноидов типа I, не содержащих заместителя в положении «4» в кольце A. Для этого из колхицина 1 по известной методике [209] получена аллоколхициновая кислота 95 с количественным выходом (схема 45). После проведения перегруппировки Курциуса с использованием азида натрия и ди-*трет*.-бутилдикарбоната (Boc₂O) в качестве активирующего агента с выходом 64% был получен *N*-Вос-защищенный аллоколхамин. Защитную Вос-группу удаляли действием трифторуксусной кислоты в дихлорметане. На следующем этапе планировалось провести иодирование полученного субстрата 96 в *орто*-положение к аминогруппе, однако применение различных иодирующих систем не позволило добиться приемлемой региоселективности, в результате образовывалась сложная смесь продуктов иодирования ввиду близкой реакционной способности сайтов электрофильной атаки в кольцах A и C.



Схема 45. Синтез о-иоданилина 169. Реагенты и условия: а) MeONa (17 экв.), MeOH, 65 °C, 4 ч, далее H_3O^+ , 99%; б) NaN₃ (3 экв.), Boc₂O (6 экв.), DME, 75 °C, 24 ч, 64%; в) CF₃COOH, DCM, количественно.

Для реализации селективного галогенирования кольца *С* в *орто*-положение к аминогруппе было предложено «защитить» положение «4» кольца *А* посредством введения атома галогена. Как было показано ранее [285], наличие атома галогена в данном положении колхицинового скелета приводит к усилению антимитотических свойств молекулы.

Первоначально нами было проведено хлорирование и бромирование кольца *А* колхицина согласно известной методике [285], однако выход реакции оказался в несколько раз меньше ожидаемого. Применение в качестве сорастворителя трифторуксусной кислоты позволило увеличить выходы продуктов до 85% и 95% в случае хлорирования и бромирования соответственно (схема 46).



Схема 46. Оптимизация условий галогенирования колхицина

Очевидно, трифторуксусная кислота способна эффективно активировать галогенсукцинимид и способствовать генерации электрофильной частицы галогена.

На следующем этапе было реализовано сокращение трополонового цикла замещенных колхицинов, что приводило к получению галогенированных аллоколхициновых кислот 172 и 173.



Схема 47. Механизм сокращения трополонового цикла колхицина в сильнонуклеофильной среде

Механизм сокращения трополонового цикла колхицина условиях В сильнонуклеофильной среды аналогичен перегруппировке Фаворского [297] (схема 47). На первом этапе происходит нуклеофильная атака метилат-аниона на карбонильную группу в цикле С, что индуцирует перераспределение двойных связей в кольце и приводит к формированию норкадиенового интермедиата, который далее раскрывается с регенерацией метилат-аниона. Щелочной гидролиз полученного аллококолхицина с дальнейшим подкислением реакционной смеси приводил образованию к соответствующих галогенированных аллоколхициновых кислот 172 и 173.

Необходимо отметить, что введение заместителя в положение «4» существенно отразилось на выходах целевых кислот: он сократился до 89% в случае бромированного колхицина 171 и до 43% в случае хлорированного субстрата 170. Кроме того, использование твердого метилата натрия оказалось малоэффективным и требовало увеличения времени реакции до 18 часов, В то время как применение свежеприготовленного раствора позволяло достичь такой же конверсии субстрата за существенно более короткое время – 4-5 часов.

Нами были предприняты попытки провести две вышеописанные стадии (галогенирование и сокращение цикла) в обратной последовательности, однако подобрать эффективные условия для процесса галогенирования не удалось.

Далее было необходимо превратить галогенированные кислоты 172 и 173 в соответствующие амины. Было установлено, что применение ранее описанной системы (смесь азида натрия и *ди*-трет.-бутил-дикарбоната в диметоксиэтане) приводило лишь к образованию следовых количеств целевых продуктов. В связи с этим была предпринята попытка оптимизации условий данной реакции:



№ п/п	Источник N ₃ -	Добавки	Растворитель	T, ℃	Выход, %
1	DPPA*	Et ₃ N	<i>t</i> -BuOH	75	Следовые количества
2			DME	70	7
3			MeCN	60	20
4	NaN ₃	Boc ₂ O	THF	60	35
5			DMF	60	30
6			CH ₃ NO ₂	60	37

*DPPA – дифенидфосфорилазид

OPh PhO-P=O

Как видно из таблицы 1, выходы продукта 174 на данной стадии не достигают 40%. Возможно, лимитирующим фактором в данном случае является неустойчивость дифенилфосфорилазида при повышенных температурах и низкая растворимость азида натрия в органических растворителях. Применение полярных и хорошо сольватирующих растворителей позволило увеличить выход целевого продукта, однако он не превышает 40%. Кроме 4того, применение аналогичных реакционных систем лля хлораллоколхициновой кислоты 7 в качестве субстрата приводило к образованию лишь следовых количеств продукта во всех случаях, в связи с чем было принято решение отказаться от ее использования в дальнейших синтезах.

В качестве последующей оптимизации условий перегруппировки Курциуса было предложено использовать различные активирующие агенты. Для увеличения электрофильного характера ацильного атома углерода было предложено *one-pot* превратить бромоаллоколхициновую кислоту **173** в хлорангидрид **175** и далее ввести его в реакцию с триметилсилилазидом [298]. К сожалению, данную методику реализовать не удалось, поскольку наличие даже следовых количеств воды в реакционной смеси приводило к гидролизу образующегося хлорангидрида и по окончанию реакции было зафиксировано только исходное соединение (**схема 48**).

Активация кислоты с использованием цианурхлорида и *N*-метилморфолина [299] также оказалась неэффективной. Предположительно, образующийся в реакции активированный эфир **176** не вступает в дальнейшие превращения ввиду больших стерических затруднений при атаке азид-ионом (**схема 48**):



Схема 48. Попытки активации исходной 4-бромаллоколхициновой кислоты 173

Наиболее оптимальным решение было разделить перегруппировку Курциуса на несколько этапов. Вначале был синтезирован и выделен азид 4-бромаллоколхициновой кислоты 177. Реакцию проводили при комнатной температуре в тетрагидрофуране в присутствии 6 экв. NaN₃ и 8 экв. Вос₂О. Полученный ациазид 177 выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле и далее подвергали термическому разложению с дальнейшей перегруппировкой в изоцианат, который легко превращался в *N*-Восзащищенный анилин 174 в среде *трет*.-бутилового спирта в присутствии избытка Вос₂О (схема 49):



Схема 49. Поэтапное проведение реакции Курциуса и синтез *о*-иод-анилина **180**. *Реагенты и условия: а)* NaN₃ (6 экв.), Boc₂O (8 экв.), THF, 25 °C, 20 ч; b) Boc₂O (6 экв.), t-BuOH, 90 °C; c) HCl 3M, DCM, 25 °C, 3 ч; d) NIS (1,1 экв.), AcOH, 25 °C, 24 ч.

Защитную Вос-группу удаляли под действием соляной кислоты в дихлорметане при комнатной температуре. Далее было проведено иодирование полученного субстрата **179** в *орто*-положение к аминогруппе. Наиболее эффективным оказалось использование *N*-иодсукцинимида в уксусной кислоте (**таблица 2**):

Таблица 2

№ п/п	Источник I ⁺	Добавки	Растворитель	Выход, %
1	I_2	-	DCM	0
2	ICl	-	DCM	Следовые количества
3	I_2	CF ₃ CO ₂ Ag	DCM	50
4	NIS	-	CH ₃ COOH	70

Системы, используемые для иодирования амина 179

Использование данной синтетической последовательности позволило получить ключевой субстрат **180** в количестве нескольких грамм. Далее были предприняты попытки проведения тандемных реакций кросс-сочетания Соногаширы и внутримолекулярной циклизации промежуточно образующегося интернального алкина с целью получения пирролоаллоколхициноидов **181**. Для этого был проведен подбор условий данной последовательности превращений с использованием в качестве модельного алкина 2-этинилпиридина (**таблица 3**):

Таблица 3

Оптимизация условий реакции кросс-сочетания Соногаширы производного 180 и



№ п/п	Источник Pd	Источник Си	Основание	Лиганд	Выход, %
1	$Pd(OAc)_2$		AcOK	PPh ₃	
2	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂		AcOK	-	Образования
3	Pd(dppf)Cl ₂	Cul	AcOK	-	продукта не
4	$Pd(OAc)_2$		K ₃ PO ₄	PPh ₃	зафиксировано
5	$Pd(OAc)_2$		DIPEA	PPh ₃	

Как следует из **таблицы 3**, использование различных каталитических систем не приводило к образованию продукта ни в одном из случаев. Колхициноидный субстрат **180** не претерпевал изменений в ходе реакции, в то время как алкин зачастую подвергался гомосочетанию по Гляйзеру [300]. Поскольку связь С-I в кольце *C* колхициноида **180** поляризована слабо ввиду высокой электронодонорной способности аминогруппы в *орто*-положении и триметоксифенильного кольца *A*, стадия окислительного присоединения палладия оказывается затрудненной [301]. Одним из способов увеличения реакционной способности субстратов в реакциях окислительного присоединения является введение электроноакцепторных заместителей. С этой целью было предложено ввести трифторацетильную группу по NH₂-фрагменту. Полученный амид **180'** легко реагировал с алкинами в условиях реакции кросс-сочетания Соногашира и далее подвергался внутримолекулярной *5-endo-trig*-циклизации, приводящей к образованию пиррольного цикла (**схема 50**). Трифторацетамидная группа в данных условиях удаляется без применения дополнительных реагентов.



Схема 50. Синтез целевых пирролоаллоколхициноидов **181**. Реагенты и условия: а) (*CF*₃*CO*₂)₂*O* (1.8 экв.), пиридин (2.6 экв.), *DCM*, 0 °*C*, 3 ч; б) алкин (1.2 экв.), *Pd*(*OAc*)₂ (5 мол.%), *CuI* (10 мол.%), *PPh*₃ (15 мол.%), *AcOK* (3 экв.), *MeCN*, 80 °*C*, 24 ч.

Нами предложен способ получения *N*-метил-замещенного также пирролоаллоколхициноида на основе соединения 181b (схема 51). Для этого вначале был синтезирован алкин, содержащий защитную TBDMS-группу, который далее реакции Соногаширы с применением каталитической системы использование в Pd(dppf)Cl₂/CuI/DIPEA и последующей циклизацией. Пирролоаллоколхициноид 181f подвергали метилированию иодистым метилом, далее защитную группу удаляли при действии 1M раствора ТВАF в ТНF (схема 51), в результате чего метилированный продукт 181g был получен с суммарным выходом 28%.



Схема 51. Синтез *N*-метилированного пирролоаллоколхициноида 181g. Реагенты и условия: *а*) *HC*≡*CCH*₂*OTBDMS* (1.2 экв.), *Pd*(*dppf*)*Cl*₂ (5 мол.%), *CuI* (10 мол.%), *DIPEA* (3 экв.), *MeCN*, 90 °C, 6 ч; б) *NaH* (60% в минеральном масле, 2.3 экв.), *MeI* (1.5 экв.), *THF*, 0→65 °C; в) 1,0 M TBAF в THF.

Таким образом, общая схема получения гетероциклических колхициноидов **181** может быть представлена в следующем виде:



Схема 52. Общая схема получения аллоколхициноидов типа I. *Реагенты и условия: а)* алкин, $Pd(OAc)_2$, CuI, PPh₃, AcOK, MeCN, 80 °C, 8 ч; б) $HC \equiv C-CH_2OTBDMS$, $Pd(dppf)Cl_2$, CuI, DIPEA, MeCN, 80 °C, 8 ч; в) MeI, NaH, THF; г) TBAF, THF, 3 ч.

Все полученные пирролоаллоколхициноиды прошли первичные биологические испытания. Была установлена цитотоксичность полученных соединений по отношению к клеткам панкреатической аденокарциномы штаммов Colo-357 и MiaPaCa-2, а также к клеткам эмбрионального почечного эпителия НЕК-293 (таблица 4).

Таблица 4

Клеточная линия Соединение	Colo-357	HEK-293	MiaPaCa-2
Колхицин 1	0.02	0.007	0.008
181a	>4	20	4
181b	0.1	0.8	0.04
181c	0.32	0.1	0.2
181d	0.09	0.8	0.01
118e	0.5	0.8	0.16
181g	0.004	0.001	<0.001

Цитотоксические свойства^а синтезированных пирролоаллоколхициноидов **181а-g**, (IC₅₀, µM)

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

Соединение **181a**, содержащее фенильный заместитель в боковой цепи гетероцикла оказалось не эффективным по отношению ко всем типам исследуемых клеток, в то время как вещества **181b** - **181d** демонстрировали умеренную активность ($IC_{50} = 0.01-0.3 \ \mu M$). Аллоколхициноид **181g**, содержащий гидроксиметильный фрагмент в боковой цепи и метилированный по атому азота, демонстрирует наибольшую цитотоксическую активность, проявляющуюся уже в субнаномолярном диапазоне концентраций.

Ввиду своей высокой активности соединения **181g** и его аналог **181b** были выбраны для дальнейших исследований.

Было установлено, что колхицин 1 и соединения 181b и 181g одинаково влияют на клеточный цикл, останавливая развитие клетки в G2/M фазе (рисунок 41, таблица 5), однако аллоколхициноиды 181b и 181g обладают более выраженной апоптозиндуцирующей активностью (таблица 5).



Рисунок 41. Анализ влияния колхициноидов на клеточный цикл. Клетки штамма Colo-357 выдерживали (а) без добавления колхициноида; (б) с добавлением 5 µM колхицина 1; (в) 5 µM соединения 181g в течение 72 ч, анализ проводили с использованием проточной цитометрии. Участки H2 и H4 соответствуют апоптотическим клеткам, а H3 и H5 – клеткам, аккумулированным в G2/M фазе. Количественные результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

Ингибирование роста клеток штамма Colo-357 под влиянием колхицина и его аналогов **181b** и **181g**

Соединение	Апоптотические клетки, %	Фаза G, %	Фаза G2/M, %	Соотношение G1/G2
Контроль	12.4	56.6	31	1.8
Колхицин	12.4	12.6	75	0.2
181b	23	16	61	0.3
181g	25	12	63	0.2

Помимо схожего воздействия на клеточный цикл, исследуемые колхициноиды одинаково влияют на организацию сети микротрубочек, приводя к практически полному ингибированию полимеризации тубулина в течение 24 часов (рисунок 42).



Рисунок 42. Распределение тубулина в клетках Colo-357. Клетки Colo-357 инкубировали без колхициноидов (слайды а, е) и с добавлением 5 μМ колхицина 1 (b), соединения **181b** (c), и соединения **181g** (d, f) в течение суток (a-d) и трех часов (e-f). После того как клеточная мембрана стала проницаемой, в культуру добавили антитела к β-тубулину (красное окрашивание), клетки анализировали методом конфокальной микроскопии. Веретено деления показано белой стрелкой, перераспределенные хромосомы и апоптотические тела – зелеными. Ядра окрашены красителем Hoechst 33342 (синий). Масштаб фотографии 12-20 μм.

Воздействие колхицина, а также соединений **181 b**, g на клетки Colo-357 выражается в разрушении митотического веретена и перераспределении хромосом в цитозоле. На слайдах *а* и *е* отчетливо видны нити полимеризованного тубулина (выделено красным), в то время как введение в клеточную культуру тестируемых соединений разрушает микротрубочки, и гетеродимеры тубулина оказываются рассредоточенными по всей цитоплазме, что выражается в равномерном красном окрашивании при взаимодействии с антителами (слайды *b*, *c*, *d*, *f*).

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 181g и колхицина 1 на органеллы после 3 часов инкубации клеточной культуры (рисунок 43). В качестве тестируемых клеток были выбраны эпителиальные клетки толстого кишечника НТ-29 вследствие их наибольшей тестируемым препаратам. Ранее было установлено, чувствительности к аллоколхициноиды вызывают гиперполяризацию митохондриальных и лизосомальных мембран в 3D-клеточных культурах [238]. В данном случае как колхицин, так и аллоколхициноид 181g вызывает увеличение потенциала митохондриальных мембран, а

также перераспределение митохондрий от перинуклеарной области вглубь цитоплазмы, хотя эффект от воздействия соединения **181g** 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 **181g** не оказывает на лизосомы никакого значительного влияния.



Рисунок 43. Кратковременные эффекты колхицина и соединения 181g на митохондрии и лизосомы. Клетки НТ-29 (a-g) и Colo-357 (h-i) инкубировали в течение 3 часов без препарата (a, d, h), в присутствии 5 µМ колхицина (1) (b, e) и соединения 181g (c, f, i). Окрашивание проводили красным митохондриальным (a-c, h-i) и лизосомальным трекером (d-f). Ядра на слайдах (h-i) окрашивали Ноеchst 33342 (голубой).

Увеличение количества митохондрий в клетках, обработанных колхицином и его аналогами, может свидетельствовать о перестройке метаболизма клетки на режим, предполагающий большее вовлечение процессов окислительного фосфорилирования. Аэробное окисление с участием митохондрий характерно для здоровых клеток, в то время как большинство опухолевых образований исключают процессы окислительного фосфорилирования и используют гликолиз в качестве основного процесса переработки глюкозы [302]. С другой стороны, митохондрии являются важными участниками апоптотических процессов. При изменении мембранного потенциала происходит пермеабилизация мембран и нарушение их целостности. При этом из межмембранного пространства высвобождаются множественные проапоптотические факторы, запускающие биохимические каскады, приводящие к смерти клетки [303]. Принимая во внимание эти факты, а также более высокую апоптоз-индуцирующую активность колхициноидов 181b и 181g по сравнению с колхицином (таблица 5), можно объяснить различие в количестве митохондрий их вовлеченностью в процессы апоптоза в большей степени при воздействии колхициноида 181g по сравнению с колхицином (обнаружено 25% и 12,5% апоптотических клеток при инкубации с соединением 181g и колхицином соответственно). Колхицин преимущественно действует как антитубулиновый агент и блокирует митоз клеток (63% и 75% клеток останавливаются в фазе G2/М при воздействии колхициноида 181g и колхицина соответственно). Эта гипотеза также косвенно подтверждается сохранением числа лизосом в клетках, инкубированных с колхициноидом 181g, поскольку индуцированные им процессы апоптоза сопряжены с процессами аутофагии, которые протекают при непосредственном участии лизосом.

Для более детального установления причин в различии цитотоксических свойств колхициноида **181g** и его неметилированного аналога **181b** нами проведен докинг. Были рассчитаны оптимальные конформации данных соединений, а также определена энергия связывания веществ **181b** и **181g** с колхициновым сайтом тубулина.

Таблица 6

	<u> </u>
Соединение	Энергия связывания, ккал/моль
Колхицин 1	-8.66
181b	-8.26
181g	-7.96

Рассчитанные энергии образования комплекса лиганд-белок для колхицина 1 и

Необходимо отметить, что при близком значении энергий связывания с тубулином, ориентация данных соединений (при их оптимальной конформации) в колхициновом сайте существенно отличается (рисунок 44).





Рисунок 44. Расположение колхицина, соединений 181b и 181g в колхициновом сайте тубулина. (А) – наложение всех трех молекул (*красный* - колхицин, синий – 181g, желтый – 181b) в наиболее выгодных для них конформациях. (В) – наложение колхицина и метилированного производного 181g. Конформация соединения 181g совпадает с конформацией 181b при минимальном различии в энергиях связывания. (С, D) – аминокислотное окружение колхициноидов в сайте связывания белка. Показаны водородные связи.

В случае оптимальной геометрии комплекса с **181b** метоксигруппа во втором положении кольца A взаимодействует с N-H пептидной связью остатка Asn101 α , образуя водородную связь 1,95Å, а ацетамидный фрагмент кольца B оказывается локализован в области слабых взаимодействий с остатками Ala β 354 и Leu β 248. Индольный фрагмент располагается вблизи остатков Lys β 352, Asn β 258, Asn β 350, Ala β 316, Val β 315, Thr β 314, Met β 259 и Val α 181, при этом гидроксиметильный фрагмент образует связь с C=O группой аминокислоты Val β 315 (1.90Å).

Метилированное производное **181g** в своей оптимальной конформации образует водородную связь между 2-МеО-группой кольца *A* и ОН-группой остатка Serα178. Расположение ацетамидного фрагмента совпадает с таковым для **181b**, а гидроксиметильный фрагмент в пиррольном цикле формирует водородную связь с C=O группой Valβ238 (1.81 Å), в то время как метильный заместитель при атоме азота оказывается в гидрофобном кармане, образованном остатками Leu255, Ile378 и Val318.

Обнаруженные различия в цитотоксичности данных соединений нельзя объяснить, оперируя лишь значениями энергий связывания с белком и количеством образуемых водородных связей. Однако можно предположить, что введение заместителя по атому азота в пиррольном фрагменте препятствует образованию внутримолекулярной водородной связи между N-H и O-H фрагментами, которая может являться конкурирующим процессом при связывании колхициноида с белком. Кроме того, молекулы соединения **181b** потенциально могут образовывать димеры за счет межмолекулярных водородных связей, что значительно снижает мембранотропность колхициноида **181b**, и как следствие, отражается на его цитотоксических свойствах.

85



Рисунок 45. Иллюстрация возможного образования внутри- и межмолекулярных водородных связей в соединении **181b**.

2. Синтез и биологическая активность пирролоаллоколхициноидов II.

Синтезированные колхициноиды типа I продемонстрировали высокую цитотоксичность и потенциально более низкую системную токсичность для организма по сравнению с колхицином. Однако предложенный синтез достаточно трудоёмок (включает 10 линейных стадий для метилированного колхициноида **181g**) и позволяет реализовать только один тип сочленения колец *C* и *D*.

В связи с этим, целью данной части исследования является разработка метода синтеза пирролоаллоколхициноидов с различным расположением кольца *D* относительно базового трициклического скелета. Ретросинтетическую схему для получения соединений типа II можно представить в следующем виде:



Схема 53. Ретросинтетическая схема получения аллоколхициноидов типа II

Для формирования пиррольного цикла был выбран метод синтеза индолов по Фишеру [304]. Гидразиновый интермедиат, необходимый для этой стадии, может быть получен путем аминирования арилгалогенида или арилтрифлата, а также по реакции диазотирования-восстановления ариламина. В свою очередь, все указанные промежуточные продукты легко доступны из природного колхицина после сокращения трополонового цикла.

Вначале нами был применен подход, основанный на реакции каталитического аминирования по Бахвальду-Хартвигу [305,306]. На первом этапе был синтезирован *N*ацетилколхинол **94**, исходя из коммерчески доступного колхицина **1** в 3 стадии [186]. Продукт вводили в реакцию со свежеперегнанным Tf₂O. В результате был получен *N*ацетилколхинол-*O*-трифлат **182** с суммарным выходом 4 стадий 70% (схема **54**).



Схема 54. Синтез *N*-ацетилколхинол-*O*-трифлата 182 из природного колхицина

Полученный трифлат **182** использовали в качестве субстрата в реакции аминирования по Бахвальду-Хартвигу, в роли аммонийного эквивалента выступал гидразон бензофенона (**таблица 7**).

					Таблица 7
	Оп	тимизация реа	акции аминиро	ования трифлата 182	
	MeO		yc	МеО	WNHAc
	MeO	≺ + '	^{Ph}	MeO MeO	,
	MeO	UTf	Ph		N-N
	182			183	H Y H Ph
№ п/п	Катализатор	Лиганд	Основание	Растворитель, температура, °С.	Результат
1	$Pd(OAc)_2$	BINAP			Фрагментация гидразона
2	Pd(OAc) ₂	dppe		TolH, 90 °C	Только исходные
3	Pd(OAc) ₂	dppf	Cs ₂ CO ₃		вещества
4	$Pd_2(dba)_3$	XPhos			Частичное удаление
5	$Pd_2(dba)_3$	XantPhos		1,4-diox, 100 °C	–OTf группы
6	$Pd_2(dba)_3$	DavePhos			Только исходные вещества
7	Pd ₂ (dba) ₃	BINAP	NaOBu-t	TolH, 100 °C	Частичное удаление –ОТf группы
8	Pd(PPh ₃) ₄	-	AcOK	TolH, 80 °C	Только исходные вещества
9	Pd(OAc) ₂	BINAP	K ₃ PO ₄	TolH, 90 °C	Целевой продукт, 14%
10	$Pd_2(dba)_3$	XantPhos	K ₃ PO ₄	1,4-diox, 90 °C	Фрагментация
11	$Pd_2(dba)_3$	CyJohnPhos	K ₃ PO ₄	TolH, 90 °C	гидразона

Для оптимизации условий данной реакции были использованы различные каталитические системы, основания и растворители, однако образование целевого продукта **183** наблюдалось только в случае применения системы Pd(OAc)₂/rac-

ВІNAP/K₃PO₄ в толуоле при 90 °C. Но даже в этом случае выход продукта оказался слишком низким для продолжения синтеза. Основными побочными процессами являлись удаление трифлатный группы и разрыв N-N связи в гидразоне бензофенона с последующей димеризацией фрагментов. В связи с этим было решено изменить подход и использовать для получения ключевого гидразинового интермедиата *one-pot* реакцию диазотирования — восстановления ароматических аминов. Необходимый для этого ариламин **96** был синтезирован исходя из природного колхицина как это было описано ранее (см. раздел 1 обсуждения результатов).



Схема 55. Синтез ариламина **96** из природного колхицина. *Реагенты и условия: а) MeONa* (17 экв.), *MeOH*, 65 °C, 4 ч, далее H_3O^+ , 99%; б) NaN₃ (3 экв.), Boc₂O (6 экв.), DME, 75 °C, 24 ч, 64%; в) CF₃COOH, DCM, количественно.

Таблица 8

Системы для диазотирования амина 96 с последующим восстановлением



№ п/п	Система для диазотирования	Система для восстановления	Τ, °C	Результат
1	NaNO ₂ , HCl, H ₂ O	SnCl ₂	-10	MeO MeO MeO H 1:1
2	<i>t-</i> BuONO, HBF ₄ , MeCN	SnCl ₂	-10	
3	<i>t-</i> BuONO, HBF ₄ , THF	Zn, NiCl ₂ *6H ₂ O	-10	MeO MeO MeO H
4	<i>t</i> -BuONO, HBF ₄ , MeOH	PPh ₃ , HCl	-10	MeO MeO MeO NH ₂

Синтезированный амин 96 подвергали диазотированию с последующим *one-pot* восстановлением, но ни в одном из экспериментов не удалось получить необходимый продукт (таблица 8).

После окончания реакции в смеси был обнаружен либо исходный амин 96 (п. 2, 4 таблицы 8), либо продукты распада диазосоединения с замещением диазогруппы на водород (п. 1, 3 таблицы 8) или гидроксил (п. 1 таблицы 8). Наличие продуктов распада свидетельствует о возможности протекания реакции диазотирования в данных системах, однако полученный арилдиазоний не удается восстановить с сохранением С-N связи.

Возможность проведения процесса диазотирования была использована для введения атома иода вместо диазогруппы по реакции Зандмейера [307].



Схема 56. Синтез арилиодида 186 исходя из колхицина с применением реакции Зандмейера

Синтезированный арилиодид **186** был использован в качестве субстрата в реакции Си-катализируемого *C-N* сочетания [308] в присутствии *о*-фенантролинового лиганда (схема 57).



Схема 57. Синтез изомерных арилгидразинов **187a** и **187b** по реакции Сикатализируемого аминирования.

В этой реакции наряду с продуктом амидирования **187b** был получен продукт аминирования – гидразин **187a**. Производное **187b** легко вступало в реакцию с алифатическими кетонами в присутствии 2.5 экв *n*-толуолсульфокислоты, что приводило к образованию смеси региоизомерных аллоколхициноидов типа II (**таблица 9**). В то же время, производное **187a** оказывалось совершенно нереакционноспособным в данных условиях.

Во всех случаях было зафиксировано образование только из четырех возможных (соединения **190a-d**) диастереомерных пирролоаллоколхициноидов.



№ п/п	Кетон	Продукты	Суммарный выход, %	Соотношение региоизомеров
1	⊶	NH 188a H 188b	73	188a/188b = 1 : 2.3
2	∘⇒	WH 189a 189b	63	189a/189b = 1 : 3.2
3		NH 190a 190b	64	190a/190b = 1 : 1.6
4		NH 191a H 191b	57	191a/191b = 1 : 2
5	H_2°	NH 192a 192b	57	192a/192b = 1 : 2
6	o ↓ ↓ ₉	NH 193a H 193b	52	193a/193b = 1 : 2

Этот факт можно объяснить протеканием реакции через промежуточное образование «термодинамических» енаминовых интермедиатов A (схема 58, верхняя часть), в результате перициклического процесса, приводящих к индолам 190а и 190b. Второе направление (схема 58, нижняя часть), связанное с образованием енаминов B под кинетическим контролем, способных приводить к индолам 190с и 190d, в данных условиях не реализуется. Установлено, что предпотительное образование енаминов при термодинамическом или кинетическом контроле реакции сильно зависит от кислотности среды [309]. Используемая в реакции *p*-толуолсульфокислота проявляет свойства сильной кислоты в водном растворе, однако замена растворителя на этиловый спирт снижает кислотность на 3-4 порядка. В таких условиях обычно формируется продукт термодинамического контроля реакции [310], что соответствует наблюдаемым продуктам.



Схема 58. Объяснение региоселективности реакции индолизации по Фишеру

Доминантное образование более стерически затрудненного изомера (продукты серии "b", **таблица 9**) можно объяснить возможностью дополнительной стабилизации енгидразина да счет образования водородной связи между атомом кислорода в ацетамидом фрагменте и водородом при положительно заряженном атоме азота (**схема 59**).



Схема 59. Возможное объяснение предпочтительного образования индолов серии "b"

Необходимо отметить, что индольные производные типа «а» отличаются от производных типа "b" по знаку вращения плоскополяризованного света. Это наблюдается, изменения направления образуемой возможно, вследствие закрутки спирали, тетрациклическим скелетом молекулы, несмотря на сохранение изначальной

конфигурации при C-7 стереоцентре. Так, для производного **188**а $[\alpha]_D^{20}$ составляет -28° (с = 1.31 M, CHCl₃), а для соединения **188b** $[\alpha]_D^{20}$ составляет +38° (с = 0.40 M, CHCl₃).

Исходя из аллоколхициноидов **188а** и **188b**, нами получены *N*-метилированные аналоги **194a** и **194b** с выходами 67% и 94% соответственно (схема 60).



Схема 60. Получение метилированных индолов 194а и 194b.

Установлено, что пирролоаллоколхициноид **188b** с [2,3-*e*]-типом сочленения циклов *С* и *D* обладает большей цитотоксичностью по сравнению с региоизомером **188a** с [2,3-*f*]-сочленением (**Таблица 10**).

Таблица 10.

Цитотоксические свойства пирролоаллоколхициноидов **188а**, **b** и их метилированных аналогов, IC₅₀, нМ

Соединение Клеточная линия	188a	194a	188b	194b
HEK-293	2000	1	160	4000
SKOV3	2000	5	800	2000

С другой стороны, в случае метилированных индолов, соединение **194a** с [2,3-f]сочленением циклов *C* и *D* на 3 порядка более активно по сравнению с [2,3-e]-аналогом **194b**.

3. Синтез и биологическая активность аллоколхициноидов III.

Нами предложен подход, позволяющий синтезировать колхициноиды типа III, содержащие бензофурановый фрагмент и различные заместители в боковой цепи, исходя из природного колхицина в 3 стадии (схема 61).

Вначале проводили кислотный гидролиз метоксигруппы кольса *C* колхицина с образованием колхицеина **93**, который без дополнительной очистки вводили в реакцию окислительной деградации трополонового цикла в условиях Виндауса. Последующее *one*-



pot йодирование приводило к формированию йодо-колхинола 74 с выходом 93% после двух стадий.

Схема 61. Общая схема синтеза аллоколхициноидов типа III

Вначале протекает нуклеофильная атака гидроксид-аниона на карбонильную группу в трополоновом цикле колхицеина, что приводит к образованию норкадиенового сопровождается интермедиата 195. Его раскрытие 6π-электроциклизацией с одновременным йодированием, что ведет к образованию промежуточного соединения 196, которое далее подвергается спонтанному декарбоксилированию и дейодированию. Последущее йодирование фенолят-аниона приводит к получению йодо-колхинола 74 с выходом 95%. Он вступал в реакцию кросс-сочетания Соногашира с терминальными алкинами с последующим in аннелированием, приводило situ что К фураноаллоколхициноидам 197а-ј.

Для определения оптимальных условий проведения реакции был проведен скрининг каталитических систем, оснований и растворителей (**таблица 11**).

Таблица 11

N⁰	Каталитическая	Основание	Растворитель	T. °C	Выхол. %
п\п	система	0 0110201110	1 wor20 pri tor2	1, 0	22110,, 70
1		DIPEA	Ацетонитрил	25 → 50	56
2		DIPEA	Ацетонитрил	50	42
3	$ru(rrn3)_2C1_2, Cur$	DIPEA	Толуол	60	58
4		DIPEA	ДМФА	100	52
5		DIPEA	Толуол	100	0*
6		DIPEA	1,4-диоксан	100	49
7		DIPEA	Толуол	100	63
8	Pd(OAc) ₂ , PPh ₃ , CuI	K ₂ CO ₃	Толуол	100	28
9		K ₂ CO ₃	Ацетонитрил	80	1000/
10		K ₃ PO ₄	Ацетонитрил	80	100%
11		K ₃ PO ₄	Толуол	100	конвереня
12		K ₃ PO ₄	Ацетонитрил	80	86

Оптимизация условий проведения *one-pot* кросс-сочетания Соногашира и внутримолекулярной циклизации

* Контроль реакции по ТСХ

Как видно из **таблицы** 11, замена аминов в качестве оснований на карбонат или фосфат калия, как правило, способствовала увеличению выхода целевого продукта. Применение каталитической системы Pd(OAc)₂ – PPh₃ – CuI и фосфата калия в качестве основания в ацетонитриле позволило получить целевой продукт с выходом 86%. Однако проведенные в дальнейшем эксперименты показали, что в данных условиях высокие выходы целевого продукта можно получить только при использовании алкинов с ароматическими заместителями (**таблица** 12).

Таблица 12

№ п\п	Алкин	Выход, %
1		86
2	N	83
3	N N	Почти 0% конверсии*
4	MH ₂	Сложная смесь продуктов, конверсия менее 30%*
5	OAc	25
6	ОН	44
7	ОН	В реакционной смеси преобладает исходное соединение*

Синтез бензофуранов с использованием каталитический системы Pd(OAc)₂ (5%) – CuI (10%) - PPh₃(15%) и K₃PO₄ в ацетонитриле

* Контроль реакции по ТСХ

Алкины, содержащие гидроксильную, сложноэфирную и аминогруппы реагировали в данных условиях менее чем на 50%, поэтому для них была проведена дополнительная оптимизация каталитической системы. Замена фосфата калия на ацетат калия позволила увеличить выход до 86% в случае использования пропаргилового спирта (таблица 13). Более низкую эффективность показали Cs₂CO₃ и *t*-BuOK.

Таблица 13

Оптимизация условий проведения *one-pot* кросс-сочетания Соногашира и внутримолекулярной циклизации с использованием пропаргилового спирта

№ п\п	Основание	Выход, %		
1	Cs_2CO_3	23		
2	t-BuOK	48		
3	K ₃ PO ₄	<50*		
4	AcOK	84		

* Контроль реакции по ТСХ

Таким образом, с применением каталитической системы Pd(OAc)₂ (5%) – CuI (10%) - PPh₃(15%) и ацетата калия в качестве основания в ацетонитриле были синтезированы фураноаллоколхициноиды **197а-ј** с выходами 21-62% трех стадий. Необходимо отметить, что во всех случаях на стадии кросс-сочетания реакция не останавливалась и нами был выделен продукт циклизации.



Рисунок 46. Фураноаллоколхициноиды, полученные из природного колхицина

Было отмечено негативное влияние избытка алкина по сравнению с йодоколхинолом. В этом случае преимущественно протекала реакция Гляйзера [311] с образованием продукта гомосочетания терминального алкина, что особенно часто наблюдалось при использовании пропаргилового спирта и пропаргилацетата. Кроме того, реакция с пропаргилацетатом оказалась очень чувствительна к присутствию воды в растворителе, из-за протекания гидролиза сложноэфирной группы.

Азотосодержащие продукты являлись менее устойчивыми и начинали разлагаться уже через сутки при хранении их в растворе или в сухом виде при комнатной температуре. Так, в случае реакции с пропаргиламином продукт, полученный после колоночной хроматографии, содержит примерно 40% целевого соединения. Остальные сигналы, зафиксированные в спектре ЯМР, вероятно, следует отнести к продуктам разложения целевого вещества.

Для синтеза продукта **197g** нами был предварительно получен метиловый эфир ундецин-11-овой кислоты (**схема 62**). Сложностью на данном этапе являлась конкурирующая реакция внедрения генерированного *in situ* карбена по кратной С-С связи с образованием циклопропенового кольца.



Схема 62. Синтез метилового эфира ундецин-10-овой кислоты

Этот процесс становился доминирующим в случае пентин-4-овой и гепти-6-овой кислот, поэтому получить соответствующие метиловые эфиры и фураналлоколхицины по данной методике не удалось.

Соединение **197**ј было получено при взаимодействии йодо-колхинола с пропаргилбромидом и пирролидином в присутствии катализатора Pd(PPh₃)₂Cl₂ – CuI при нагревании реакционной смеси от 0 до 50 °C. В данном случае пирролидин выступал как в качестве реагента, так и в качестве растворителя.



Схема 63. Трехкомпонентный синтез фураноаллоколхициноида 197ј.

Была предпринята попытка синтеза аллоколхициноида с незамещенным фурановым кольцом D. Для предполагалось этого провести реакцию триметилсилилацетиленом, удалить силильную группу при воздействии фторид-аниона и провести циклизацию (схема 64):



Схема 64. Предполагаемый путь синтеза незамещенного фураноаллоколхициноида 197т

Ввиду низкой температуры кипения триметилсилилацетилена ($T_{кип.} = 53$ °C) реакцию Соногашира проводили при комнатной температуре. Среди протестированных каталитических систем наилучшие результаты были достигнуты в случае использования Pd(PPh₃)₂Cl₂ – CuI в присутствии диизопропилэтиламина в среде ацетонитрила. В данном случае продукт кросс-сочетания **1971** был выделен с выходом 62% (**таблица 14**).

Таблица 14

Оптимизация условий кросс-сочетания Соногашира в реакции иод-колхинола с этинилтриметилсиланом

№ п/п	Катализатор	Основание	Растворитель	T, ℃	Выход, %
1	$Pd(PPh_3)_2Cl_2-CuI$	DIPEA	DMF	65 → 80*	_**
2	$Pd(PPh_3)_2Cl_2-CuI$	DIPEA	MeCN	45	43
3	$Pd(OAc)_2 - CuI - PPh_3$	AcOK	MeCN	25→80	37
4	Pd(dppf)Cl ₂ – CuI	DIPEA	MeCN	40	62

*реакцию проводили в герметичном сосуде

**выделенное соединение являлось исходным веществом (по данным ¹Н ЯМР-спектроскопии)

Необходимо отметить, что ни в одном из экспериментов не удалось провести циклизацию промежуточного продукта. Попытки реализовать циклизацию с использованием электрофильных агентов [312] (І₂ в дихлорометане) также оказались безрезультатными.

Анализ литературных данных показал, что циклизация подобных систем реализуется при воздействии высоких температур (около 750 °C), при УФ-облучении или использовании катализаторов на основе рутения. Это, вероятно, может свидетельствовать о различии в механизмах циклизации замещенных и незамещенных *о*-алкинилфенолов (**схема 65**). Вероятно, незамещенный алкинилфенол имеет тенденцию к образованию винилиденовых интермедиатов с переходными металлам, что может быть реализуемо в случае использования в качестве катализатора циклопентадиенильных комплексов рутения [313]. Однако данный механизм нехарактерен для палладия, который вначале координируется на тройную углерод-углеродную связь, а затем образует σ -связь с sp^2 -гибридным атомом углерода. Внедрение палладия по связи C-H может быть реализовано с применением окислителя [314].



Схема 65. Различные механизмы циклизации замещенных и незамещенных *о*-алкинилфенолов.

Для синтезированных соединений была изучена цитотоксическая активность по отношению к опухолевым клеткам НЕК-293, Jurkat, AsPC-1, L929 и W1308 (таблица 15)

97

Клеточная линия	197a	197b	197c	197d	197f	197g	197h	197i	197k
HEK-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

Цитотоксическая активность фураноаллоколхициноидов, IC₅₀*, µМ

* Индекс цитотоксичности IC₅₀ был определен после инкубации клеточной культуры с растворами тестируемых соединений в разных концентрациях. Время инкубации составило 72 часа, ошибка определения 20%

Наиболее высокую цитотоксичность продемонстрировали соединения 197с и 197і (таблица 15), содержащие гидроксильную группу в бензильном положении в фурановом цикле. Напротив, соединения 197а и 197b, имеющие в боковой цепи гетероцикла арильный заместитель, оказались наименее эффективными. Колхициноид 197k, имеющий боковой объемный циклопентановый фрагмент, R цепи обладает средней цитотоксичностью, вероятно, вследствие экранирования гидроксильной группы и пространственных затруднений при встраивании в колхициновый сайт тубулина. Этерифицированный аналог колхициноида 197с – соединение 197f оказалось значительно (примерно на 2 порядка) менее токсично, что свидетельствует о важности свободной гидроксильной группы для проявления биологической активности данной группы соединений. Кроме того, значение имеет и расположение данной функциональной группы - колхициноид 197d, содержащий на одну CH₂-группу больше, чем его аналог 197c, теряет в активности примерно 1,5 порядка, что, возможно, связано с легкостью образования карбокатиона из соединения 197с и его стабильностью при протонировании гидроксильной группы.



менее стабильный карбокатион

более стабильный карбокатион

Таблица 15

Схема 66. Различие в стабильности карбокатионов, образующихся из 197с и 197d

Способность к образованию стабильных карбокатионов играет большую роль в ковалентном связывании с белком тубулином за счет взаимодействия с тиольными группами в составе цистеина.

Как уже отмечалось выше, колхициноид **197e** с аминометильным заместителем оказался неустойчив при хранении, однако его алкилированный аналог оказался достаточно стабильным при пониженной температуре (–18 °C), но цитотоксическая

активность (IC₅₀>100 µM) была низкой для всех тестируемых клеточных линий. Аналогичные результаты были получены и для колхициноида **197g** с длинной углеводородной цепью и концевой сложноэфирной группой. Исходя из полученных результатов, наиболее активные соединения **197c** и **197i** были выбраны для проведения дальнейших экспериментов.

Была исследована способность выбранных аллоколхициноидов подавлять полимеризацию тубулина. Для этого изучали зависимость скорости полимеризации белка от концентрации аллоколхициноида, а также было установлено мольное соотношение (R) ингибитор/белок, необходимое для подавления полимеризации тубулина на 50%. Показано, что в случае обоих соединений, скорость полимеризации тубулина снижалась в присутствии исследуемого вещества, причем такое снижение оказалось концентрационнозависимым (рисунок 47, А, В). Колхициноид 197с вызывает более значительное ингибирование полимеризации тубулина по сравнению с 197і при одинаковых концентрациях. 50% ингибирование полимеризации достигается при параметре R=0,08 и R=0,3 для 197с и 197і соответственно (рисунок 47, С, D), в то время как колхицин и его структурный аналог комбретастатин А4 подавляют полимеризацию тубулина при R=0.38 и R=0,09. Таким образом, можно предположить, что цитотоксическая активность препарата 197с, наиболее активного в данной серии веществ, напрямую связана с его способностью взаимодействовать с тубулином и нарушать функционирование элементов цитоскелета.



Рисунок 47. Ингибирование полимеризации тубулина колхициноидами **197с** (A,C) и **197i** (B,D) *in vitro*. Рисунки A и B демонстрируют снижение поглощения излучения сетью микротрубочек (концентрация тубулина 15 мкМ) без (а) или в присутствии (b-h) 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 и 10 мкМ **197с** (A) и **197i** (B). Рисунки C и D отражают соответствующий

процент ингибирования полимеризации белка соединениями **197c** (C) и **197i** (D) как функцию мольного отношения общего количества ингибитора к общему содержанию тубулина в растворе (R).

Помимо анализа способности к ингибированию полимеризации тубулина, было изучено влияние препарата 197с на клеточной цикл и индукцию апоптоза. В проведенных ранее экспериментах по ингибированию роста клеток колхициноид 197с не вызывал острой неспецифической токсичности в отношении эпителиальных и лимфоидных клеток. Для изучения апоптоз-индуцирующей активности были выбраны клетки W1308. Клеточную окрашивали красителями: DiOC-6 (3,3' культуру двумя дигексилоксакарбоцианин иодид), чувствительный К мембранному потенциалу митохондрий, и PI (пропидий иодид), способный проникать через мембраны мертвых или апоптозирующих клеток.



Рисунок 48. Индукция апоптоза соединениями 197с, 197i в клетках W1308. (А) Спонтанный апоптоз после 48 часов в клеточной культуре. (В–D) Индукция апоптоза и деполяризация митохондриальных мембран при воздействии 200 нМ соединений 197с (В), 197i (С). Две верхних секции соответствуют апоптотическим и пре-апоптотическим клеткам, нижняя секция соответствует живым клеткам.

Культуру клеток выдерживали в течение 48 часов с 200 нМ соединений 197с, 197i. После окончания инкубации скорость апоптоза в клетках, обработанных 197c, была сравнима со скоростью апоптоза в контрольной группе, однако обработка препаратом 197i привела к апоптозу значительной части клеточной культуры (рисунок 48). Эти данные свидетельствуют о некотором различии в механизмах действия соединений 197c и 197i. Можно предположить, что меньшая аффинность 197i к тубулину и его повышенная мембранотропность вследствие наличия гидрофобного метильного заместителя позволяет ему более эффективно взаимодействовать с мембранами митохондрий, вызывая их гиперполяризацию. Установлено, что гиперполяризация митохондриальных мембран приводит к их разрыву и высвобождению из межмембранного пространства проапоптотических факторов.

Тем не менее, эффективное связывание соединения **197с** с тубулином, приводящее к остановке клеточного цикла на стадии G2/M, в итоге выражается в реализации программы апоптоза. Действительно, после инкубации клеток W1308 с раствором **197с** концентрации 200 нМ методом конфокальной микроскопии было зафиксировано образование биядерных клеток, апоптотических телец, наблюдалась фрагментация клеток, укрупнение митохондрий, деполяризация и разрыв их мембран. Полученные результаты

свидетельствуют о том, что неспособность клеток преодолеть контрольную точку G2/M, приводит к развитию позднего апоптоза. В отличие от соединения **197с**, его азотсодержащие аналоги **181b** и **181g** способствуют развитию апоптоза уже в первые 24 часа, что может свидетельствовать о некоторых различиях в механизме их действия.



Рисунок 49. Остановка клеточного цикла и развитие позднего апоптоза под действием колхициноида **197с**. (A–D) Анализ клеточного цикла клеток AsPC-1 (A,B) и W1308 (C,D) методом проточной цитометрии. Клетки выдерживались без (А,С) и с добавлением 200 нМ 197c (B,D) в течение 72 ч, окрашивались красителем PI. Маркер М1 соответствует клеткам в G2/M фазе; M2 - G1 фазе и M3 – апоптотические клетки. (E-H) Конфокальные изображения клеток AsPC-1 в различных стадиях апоптоза: клетки с двойным ядром (Е-F, отмечено стрелками) с деполяризованными округленными митохондриями (Е-F, треугольники). Некоторые клетки подвергаются апоптозу с формированием апоптотических телец (G–H, стрелки) и разрушением митохондрий (H, треугольники). Ядра окрашены Hoecst 33342 (синий), митохондрии - MitoTreckRed (красный). Масштаб фотографий 20-30 мкм.

Поскольку в данной серии соединений препарат **197с** проявил наиболее высокую цитотоксичность и аффииность к таргетному белку, сравнимую с перспективным комбретастатином A4, была изучена противоопухолевая активность *in vivo* именно этого фураноаллоколхициноида. Вначале для определения терапевтической дозы были определены LD_{50} и LD_{100} , характеризующие острую токсичность. Эксперименты проводились на мышах линии C57BL/6. В среднем, инъекции препарата **197с** оказались более токсичны при внутрибрюшинном введении, чем при внутривенном (0.8 мг/кг и 2.0 мг/кг соответственно). LD_{50} составила 0.3 мг/кг (i.p.) и 0.8 мг/кг (i.v.).

Для установления терапевтического эффекта мышам была привита опухоль молочной железы. Инъекции **197с** проводили 1 раз в неделю внутривенно в дозе 0.4 мг/кг в течение 4 недель. В результате было зафиксировано значительное снижение роста опухоли по сравнению с контрольной группой (**рисунок 50 A**). При этом у животных не



наблюдалось неврологических симптомов, потери в весе и изменений в поведении. В течение эксперимента летальность в группе, получающей терапию, составила 0%.

Рисунок 50. *In vivo* эффекты колхициноида **197с**. А – Снижение скорости роста опухоли молочной железы у мышей линии C57BL/6. В – распределение родамина *В* вследствие интерфазного воздействия колхицина, комбретастатина A4 и колхициноида **197с** на проницаемость капилляров.

Поскольку изученных биологических характеристик многие ИЗ фураноаллоколхициноида 197с схожи с таковыми для комбретастатина А4, который, как известно, помимо цитотоксического оказывает и антиваскулярное действие, было изучено влияние на состояние кровеносных сосудов полученного аллоколхициноида в сравнении с колхицином и комбретастатином (рисунок 50 В). Для этого мышам была введена смесь родамина В с колхицином, комбретастатином и колхициноидом 197с в расчете 1мг/кг. Контрольной группе мышей вводили родамин без добавления других соединений. Через 4 часа была определяли концентрацию родамина в органах. Было обнаружено значительное накопление родамина в кишечнике, сердечной ткани и селезенке по сравнению с контрольным экспериментом. Эти данные согласуются с наиболее распространенными побочными эффектами комбретаститина А4 – лимфопенией, анемией и гипертензией. Эффект соединений на эндотелиальные клетки сосудов головного мозга (ГЭБ) обнаруживает противоположный эффект, а именно снижение накопления родамина в тканях мозга на 40% по сравнению с контрольной группой. Этот эффект может быть объяснен частичной конъюгацией родамина В с колхициноидом или комбретатстатином, что приводит к увеличению молекулярной массы соединения и возрастанию его гидрофильности, что отрицательно сказывается на проникающей способности через ГЭБ, и, как следствие, снижает концентрацию красителя в тканях мозга.



Схема 67. Возможный путь конъюгации родамина и колхициноида

Пониженная проницаемость сосудов ГЭБ для родамина по сравнению с сосудами других органов может быть объяснена наличием плотных контактов между клетками эндотелия, образованных белками окклюдином, клаудином и соединительными адгезионными молекулами. Эндотелиальные клетки сосудов органов других характеризуются лишь соединения при помощи белков интегринов. Поскольку интегрины с одной стороны связаны с элементами внеклеточного матрикса (например, коллагеном), а с другой – с белком актином, который может разрушаться при взаимодействии с колхициноидом [238], эндотелий сосудов большинства органов уязвим по отношению к колхицину и его аналогам по сравнению с эндотелием сосудов ГЭБ.

4. Синтез и биологическая активность колхициноидов IV

В 2016 году в группе профессора Г.-Г. Шмальца была синтезирован колхициноид **38**, проявляющий высокую биологическую активность [164]. Аналогичное соединение **32** с тиометильным заместителем было получено и описано в 1993 году [157].



Рисунок 51. Активные колхициноиды с двойной углерод-углеродной экзо-связью

Колхициноид **38** проявляет синергетический эффект при совместном применении с винкристином против клеток лимфомы штамма ВЈАВ. Комбинация 0.003 µМ соединения **38** и 0.3 µМ винкристина увеличивает популяцию апоптотических клеток более чем в 15 раз. Фрагментация ДНК опухолевых клеток при совместном применении возрастает на 35% в случае обычных клеток Nalm-6 и почти на 85% в случае винкристин-резистентных опухолевых клеток.

Такие изменения в биологической активности, вероятно, связаны с присутствием в молекуле доступной для атаки двойной С-С *экзо*-связи в кольце *B*, входящей в состав фрагмента акцептора Михаэля.

Способность активированных кратных связей реагировать *in vitro* или *in vivo* с биологическим тиолам (цистеин, глутатион) легла в основу создания концепции ковалентно связывающихся ингибиторов терапевтических мишеней [315].

Для реализации ковалентного связывании с белком-мишенью молекулы терапевтического агента должны содержать фрагменты акцептора Михаэля, напряженные малые циклы (электрофильные циклопропаны, эпоксиды, четырехчленные β -лактамы или β -лактоны), альдегидные функции, аминали, ацетали и другие группы, способные реагировать с нуклеофильными остатками цистеина, серина, лизина и аспаргиновой кислоты в молекулах белков (рисунок 52).



Рисунок 52. Функциональные группы, способные к ковалентному связыванию с белками

В случае акцепторов Михаэля для ковалентного связывания можно использовать широкий спектр активных функциональных групп, например, *а*,*β*-ненасыщенные амиды и лактамы [316–318], сложные эфиры, лактоны [319], *а*,*β*-ненасыщенные альдегиды, циклические и ациклические кетоны [320,321], карбоновые кислоты [322] и другие родственные соединения.

В связи с этим целью данной части работы является синтез гетероциклических аллоколхициноидов, содержащих фрагмент акцептора Михаэля или родственные структуры, позволяющие осуществлять связывание с тубулином за счет лабильных S-H связей.

Для получения колхициноидов, содержащих фрагмент акцептора Михаэля, иодоколхинол 74 подвергали этерификации акриловыми кислотами с образованием эфиров 198а-е, которые на следующем этапе не удалось превратить в сопряженные лактоны 199 в условиях каталитической реакции Хека (схема 68, направление 1). Колхициноид 74 вступал в реакцию Хека с метилакрилатом с образованием *E*-енона 200 с выходом 66%, который далее оказался не способным вступить в реакцию внутримолекулярного аннелирования (схема 68, направление 2). С другой стороны, *Z*-енон 201', получающийся в результате кросс-сочетания производного 74 и *транс*-метилкротоната, подвергался переэтерификации *in situ* с образованием аллоколхицино-кумарина 201 (схема 68, направление 3).



Схема 68. Синтез колхициноидов, содержащих фрагмент акцептора Михаэля

Синтез соединений типа **203** был осуществлен в 4 стадии исходя из колхицина (**схема 69**). Вначале в две стадии был синтезирован иодо-колхинол **74**, который далее алкилировали соответствующим аллилбромидом. На последнем этапе проводили внутримолекулярную реакцию Хека, приводящую к образованию 2,3-дигидрофуранового цикла *D*, содержащего двойную экзо-связь в положении «3».



Схема 69. Синтез производных 203а-d

После проведения реакции Хека методом ЯМР было установлено, что продуктом в случае незамещенного аллилбромида является смесь целевого колхициноида **203a** и изомерного 3-метилфурана **203e** в соотношении 3:1. Это может быть обусловлено кислотно-катализируемой изомеризацией колхициноида **203a**, образующегося в реакции изначально. Изомеризация может протекать при действии элиминируемой в реакции Хека кислоты НІ. Действительно, проведение подобной реакции с субстратом **203a** в системе трифторуксусная кислота – дихлорометан приводило к образованию продукта **203e** с количественным выходом в течение часа (**схема 70**).



Схема 70. Кислотно-катализируемая изомеризация колхициноида 203а.



Была изучена зависимость образования обоих продуктов от времени при медленном нагревании смеси до 35 °C

Рисунок 53. Зависимость образования продуктов реакции от времени и температуры.

Сразу после смешения реагентов и добавления растворителя начинается образование продукта реакции Хека **203а**, однако уже через 10-15 минут при нагревании смеси до 25 °C на спектре ЯМР становятся заметны сигналы продукта изомеризации **203е**. Его содержание увеличивается и через 40-50 минут соотношение колхициноидов **203а** и **203е** становится равным примерно 3:1, и сохраняется таковым до окончания реакции. Необходимо отметить, что полная конверсия субстрата не наступает при 35-40 °C, для полного превращения необходима температура 75-80 °C.

Были предприняты попытки хроматографического разделения соединений **203a** и **203e** на силикагеле с применением различных элюирующих систем, однако это не привело к положительному результату.

Было обнаружено, что добавление в систему 1,1 эквивалента B₂Pin₂ подавляет процесс изомеризации и снижает выход метилфурана **203e** до 6-8%. Это можно объяснить протеканием следующего процесса:



Схема 71. Возможное объяснение участия B₂Pin₂ в реакции Хека

Интермедиат, образующийся при замене атома йода на BPin, далее будет элиминировать не иодоводородную кислоту, а частицу H-B-Pin, которая уже не способна вызывать изомеризацию продукта реакции.

Необходимо отметить, что продукты 203b и 203c образовывались без примеси изомерного фурана, продукт 203d оказался полностью изомеризованным в замещенный фуран 203d*.

На основе производного 203а были синтезированы эпоксид 204 и первичный спирт 205 (схема 71):



Схема 71. Синтез эпоксида 204 и спирта 205 из колхициноида 203а

Попытки синтезировать производные с циклопропановым и азиридиновым циклами не привели к желаемому результату.

Для соединений дигидрофуранового ряда была установлена цитотоксическая активность по отношению к различным типам опухолевых клеток (HaCaT, Colon-26, HEK-293, Colo-357, PANC-1, HeLa, EL-4). Результаты представлены в **таблице 15**.

\Box							
Соединение Клеточная линия	203a	€ 203e	203b	203c	MeO 203d		
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	-	-	-	-		

Цитотоксичность колхициноидов, содержащих экзо C=C связь в цикле D, IC₅₀, нМ

Таблица 15.

* - исследование не проводилось

Как видно из **таблицы** 15, наибольшей цитотоксичностью обладают колхициноид 203a с незамещенной двойной связью и изомерный ему метилфуран 203e. Учитывая легкость изомеризации колхициноида 203a и схожесть результатов МТТ-теста обоих соединений, вопрос о том, индекс цитотоксичности какого из соединений был определен в ходе эксперимента, остается открытым.

Соединение 203b, содержащее метильный заместитель при двойной связи, демонстрирует активность на порядок ниже, чем соединения 203a и 203e. Сложноэфирное производное 203d, а также дизамещенный колхициноид 203c продемонстрировали самый низкий уровень активности ввиду большого объема заместителей. Таким образом,

активность исследуемых соединений в данной серии сильно зависит от размера и количества заместителей при двойной связи в цикле *D*. Для самого активного соединения были исследованы влияние на клеточный цикл и формирование веретена деления.



Рисунок 54. Разрушение веретена деления клеток Colo-357 и HaCaT под влиянием колхициноида **203a**. Красным окрашены ядра клеток, синим – микротрубочки/тубулин

Колхициноид 203а, так же как и колхицин, вызывает разрушение митотического веретена. Его формирование наблюдается только в контрольном эксперименте. В культурах клеток, инкубированных с колхицином и соединением 203а, формирования веретена деления не наблюдалось, диссоциированный тубулин рассредоточен по всему объему цитоплазмы.

Влияние соединения **203а** на клеточный цикл было исследовано на клетках Colo-357 и PANC-1 (**рисунок 55**). При инкубации в течение 72 часов как колхициноид **203а**, так и колхицин вызывают развитие апоптоза в клеточных культурах, а выдерживание клеток с тестируемыми соединениями в течение суток индуцирует аккумуляцию клеток в фазе G2/M (**рисунок 55**).


Рисунок 55. Влияние колхицина и колхициноида 203а на клеточный цикл. Красным отмечено действие колхициноидов, серым – контрольный эксперимент. Клетки выдерживали в течение указанного времени с раствором колхициноида с концентрацией 200 нМ, далее анализировали методом проточной цитометрии. А- апоптотические клетки, G_1 и G_2/M – маркеры, соответствующие клеткам в указанной стадии цикла.

Эксперименты *in vivo* показали снижение системной токсичности колхициноида **203а** по сравнению с колхицином примерно в 6 раз. Полулетальная доза LD_{50} для исследуемого колхициноида составила 30 мг/кг при внутривенном введении мышам линии C57BL/6 (для колхицина $LD_{50} = 5,8$ мг/кг).

Из проведенных экспериментов очевидно, что колхицин и колхициноид 203а имеют одинаковый механизм действия, однако активность колхицина на 1,5-2 порядка ниже, чем у соединения 203а. Такое различие в активности может быть обусловлено различиями в связывании с тубулином. Для определения расположения соединения 203а в колхициновом сайте тубулина и особенностей его взаимодействия с белком была получена ренгенографическая структура комплекса тубулина с колхициноидом. Для этого проводили совместную кристаллизацию двух гетеродимеров тубулина и одной единицы белка статмина (регулятора динамики микротрубочек) с колхициноидом 203а.



Рисунок 56. Фрагмент комплекса тубулина с колхициноидом 203а

Изображение было получено с разрешением 2.7 Å. Невозможно однозначно сказать, какой из изомеров (**203a** или **203e**) находятся в комплексе с тубулином. 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. Образование ковалентных связей с лабильными аминокислотными остатками не наблюдается.

Таким образом, на основании проведенных биологических испытаний нами был выбран препарат **203а** для создания липидного пролекарства на его основе и включения липидного конъюгата в состав терапевтических липосом.

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

Создание пролекарственных форм и инкапсулирование препаратов в наноразмерные системы доставки имеет ряд преимуществ перед простым введением интактного препарата [323–326]:

- снижение общей токсичности препарата;

- возможность направленной доставки к поврежденным тканям;

- увеличение времени циркуляции препарата в организме;

-увеличенная проницаемость терапевтического агента в клетку вследствие возрастании мембранотропности.

Липосомы могут быть сконструированы таким образом, чтобы высвобождать активное соединение под действием каких-либо факторов (температура, pH среды, магнитное воздействие, облучение, энзиматическое расщепление и др.) [327]. Метастазирование опухоли сопровождается повышенной экспрессией такого маркера воспаления как фосфолипаза A2 (PLA₂) [328,329]. Повышенный уровень данного фермента был зафиксирован при развитии рака груди, поджелудочной и предстательной железы.

Фосфолипаза А2 специфично расщепляет сложноэфирную связь в *sn2* положении фосфолипида (**схема 73**):



Схема 73. Расщепление фосфолипида фосфолипазой А2

При этом уходящая группа должна находиться на расстоянии не менее чем 10 -CH₂- групп от расщепляемой связи [330]. Это учитывалось при создании терапевтического липида. Кроме того, для окончательного высвобождения активной молекулы, колхициноид должен быть связан с линкером посредством биодеградируемой (амидной или сложноэфирной) связи (**рисунок 57**).



Рисунок 57. Дизайн липидного пролекарства на основе колхициноида

В качестве активной группы были выбраны аллоколхифолин 207 и синтезированный нами колхициноид 208 (рисунок 58)



Рисунок 58. Колхицин и его функционализированные аналоги

Колхифолин **206** является одним из метаболитов колхицина и проявляет схожую с ним биологическую активность, однако семичленный цикл *C* может быть легко подвергнут окислению. В связи с этом для конъюгирования с липидом был выбран аналог колхифолина с сокращенным циклом *C* – аллоколхифолин **207**. Вторым соединением для создния пролекарственной формы был выбран колхициноид 208 ввиду его хороших биологических характеристик и относительной легкости синтеза.

Синтез производных 207 и 208 был реализован согласно схеме 74:



Схема 74. Синтез колхициноидов 207 и 208. Реагенты и условия: а) Boc₂O, 4-DMAP, Et₃N, MeCN, 3 ч, 100 °C; б) MeONa, MeOH, 40 мин, 40 °C; в) TFA, DCM, 1,5 ч, 25 °C; г) гликолевая кислота, DIC, NHS, Et₃N, DCM, 20 ч, 25 °C; д) 0,1 M HCl, AcOH, 100 °C, 3ч; е) I₂, KI, NaOH, H₂O, 0–5 °C, 1ч; ж) аллил бромид, Na₂CO₃, DMF, 60 °C, 24 ч; з) Boc₂O, 4-DMAP, Et₃N, MeCN, 3h, 80 °C, далее t=25 °C, 20 ч; и) MeONa, MeOH, 40 °C, 1 ч; к) TFA, DCM, 30 °C, 24 ч; л) гликолевая кислота, DIC, NHS, Et₃N, DCM, 20 ч, 25 °C; м) Pd(dppf)Cl₂, AcOK, DMSO, 75 °C, 20 ч.

Для получения аллоколхифолина **207** колхицин был превращен в деацетилаллоколхицин **209** в три стадии. Вначале водород в ацетамидной группе был замещен на трет.-бутоксикарбонил. Введение *Вос*-группы позволило удалить ацильную группу в мягких условиях с одновременным сокращением семиченного цикла С до шестичленного. *Вос*-группа была удалена при воздействии трифторуксусной кислоты в дихлорметане. Полученный деацетилаллоколхицин **209** был далее проацилирован гликолевой (2-гидроксиуксусной) кислотой в условиях реакции Штеглиха. Целевой аллоколхифолин **207** был получен с суммарным выходом четырех стадий 47%.

Синтез колхициноида **208** начинали с получения иод-колхинола **74** [186], который далее алкилировали аллилбромидом в присутствии карбоната натрия в среде диметилформамида. Полученный аллиловый эфир **198a** вводили в реакцию с Вос₂О в присутствии триэтиламина и 4-DMAP для ступенчатого удаления ацетильной и далее *mpem*.-бутоксикарбонильной группы. Деацетилированный аллиловый эфир иод-колхинола **210** обрабатывали гликолевой кислотой в условиях реакции Штеглиха. Полученный амид на последнем этапе претерпевал внутримолекулярное кросс-сочетание, приводящее к формированию цикла *D* с экзо-кратной связью.

Производные **207** и **208**' были проацилированы 1,12-декандикарбоновой и 1,14 – додекандикарбоновой кислотами в целях дальнейшего конъюгирования с лизо-фосфатидилхолином:



Схема 75. Ацилирование производных 207 и 208' дикарбоновыми кислотами в условиях реакции Ямагучи

Полученные производные 211, 212, 215 и 216 со свободной карбоксильной группой вводили в реакции ацилирования с лизо-фосфатидилхолином. Стандартной методикой для создания сложных эфиров на основе лизо-липида является ацилирование по Штеглиху. В активирующих карбодиимидов были использованы качестве нами дициклогексилкарбодиимид (DCC), диизопропилкарбодиимид (DIC), а также гидрохлорид (3-диметиламинопропил)-*N*-этилкарбодиимида (EDC·HCl). Однако во всех случаях в смеси были обнаружены только исходные соединения. Помимо реакционной ацилирования по Штеглиху были предприняты попытки конъюгирования лизо-формы липида с колхициновым фрагментом с использованием реакции Ямагучи, Мицунобу, а также с предварительной активацией оксалилхлоридом и *N*-гидроксисукцинимидом, но во всех указанных случаях образования продукта не было зафиксировано. Ввиду того, что все попытки создания сложноэфироной связи не принесли положительных результатов, было решено протестировать полученную карбоновую кислоту 211 в реакции этерификации с менее стерически затрудненным спиртом, а именно с циклогексанолом (схема 76). После того, как и с более простым спиртом с применением разнообразных методик ацилирования не было получено положительных результатов, было решено отказаться от использования идеи прямого конъюгирования.



Схема 76. Модельная реакция ацилирования колхициноидных карбоксильных производных

В качестве альтернативного подхода для создания конъюгата была использована "click"-методология, основанная на реакции медь-катализируевомого 1,3-диполярного циклоприсоединения азидов с терминальными алкинами (CuAAC). Для этого липидный и колхициноидный блоки предварительно модифицированы. Для этого аллоколхифолин **207** и его аналог **208** были ацилированы карбоновой кислотой, содержащей концевую тройную углерод-углеродную связь. Этерификацию проводили с использованием реагента Ямагучи (схема 77):



Схема 77. Синтез колхициновых блоков с терминальной углерод-углеродной связью. *Реагенты и условия: a) пент-4-иновая кислота, 2,4,6-трихлоробензоил хлорид (TCBC), 4-*DMAP, Et_3N , DCM, 24 ч, $0 \rightarrow rt$.

Лизо-фосфатидилхолин также был модифицирован с целью внедрения азодогруппы (схема 78).



Схема 78. Синтез модифицированного *лизо*-фосфатидилхолина 220 и целевых липидных пролекарств 221 и 222

Для этого вначале из 11-бромоундекановой кислоты была получена 11азидоундекановая кислота **219** по реакции нуклеофильного замещения с азидом натрия. Далее проводили ацилирование *лизо*-фосфатидилхолина в условиях Штеглиха с выходом 78%. Полученный азидсодержащий липид **220** вступал в реакцию CuAAC с алкинами **217** и **218**, приводя к целевым конъюгатам **221** и **222** с выходами 56% и 62% соответственно. Для полученных конъюгатов было изучено их поведение в липидном бислое. Характеристики, полученные из этих экспериментов, дают представление об устойчивости бислоя при включении в него инородных элементов, в данном случае – липидных пролекарств 221 и 222. Можно определить, какой процент терапевтического липида может быть включен в состав липосомы, не вызывая при этом разрушения частицы.

Вначале было изучено пространственное и ориентационное распределение липидов 221 и 222 в бислое. Для этого были определены оптимальные геометрические параметры конъюгатов и минимальная и максимальная площади проекций (таблица 16).

 Минимальная и максимальная площади проекций конъюгатов 221 и 222

 Параметр
 221
 222

 Минимальная площадь проекции, Å²
 52.68
 57.88

 Максимальная площадь проекции, Å²
 98.01
 95.63

Таблица 16

Давление внутри бислоя старается вытеснить молекулу из области с высоким давлением и в то же время стремится скрыть гидрофобные участки включения в бислое. Равновесное положение включения в бислое является результатом этих двух сил. Поскольку колхициноиды в конъюгате связаны с липидом посредством линкера с полярной группой, это этот фрагмент оказывается вовлеченным во взаимодействие с полярными головками липида бислоя. Посредством этих контактов линкер (и сам колхициноид) оказывается интегрированным в полярную область бислоя, а неполярный фрагмент конъюгата располагается в гидрофобной области мембраны.

Энергия включения внутрь слоя может быть описана, как работа, совершенная этим слоем против латерального давления [331]:

$$W = \int_{Vmol} PdV = \int_{z1}^{z2} P_z dz$$

где *z* – координата по оси, параллельной общему направлению гидрофобных хвостов, *P_z* – латеральное давление.

Принимая, что колхициноид «прикреплен» к полярной области слоя, минимизация энергии может быть достигнута вращением относительно оси *Z* или плоскости *XY*. Учитывая гомогенность слоя вращением вокруг оси *Z* можно пренебречь и принимать во внимание только угол Θ относительно плоскости *XY* (**рисунок 59**). Вероятность распределения по углу Θ была рассчитана с применением фактора распределения Больцмана $e^{-W/kT}$.



Рисунок 59. Оптимизированная геометрия конъюгатов 221 и 222 и их распределение в монослое.

Наиболее вероятными ориентациями для обоих конъюгатов оказались положения при $\Theta = 0^{\circ}$, 90° и 180° (**рисунок 60, A**). Ввиду низкой симметрии данных веществ вероятности распределения при $\Theta = 0^{\circ}$ и $\Theta = 180^{\circ}$ неэквивалентны.

Для изучения влияния пролекарств на формирование липидной пленки были проанализированы изотермы поверхностного сжатия монослоев, состоящих из чистого матриксного липида (1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин (POPC)), чистого липидного пролекарства **221** или **222**, а также их смесей: РОРС и пролекарства в различном соотношении (**рисунок 60**, **Б**).



Рисунок 60. А – вероятность нахождения конъюгата **221** или **222** в монослое в зависимости от угла Θ к плоскости *XY*. Б – диаграммы поверхностного давления

Оба коньюгата имеют большую площадь, занимаемую одной молекулой, чем матриксный липид РОРС. При содержании терапевтического липида в смеси не более 10 мол.% изотермы поверхностного сжатия практически идентичны изотермам чистого РОРС, однако с увеличением содержания веществ **221** и **222** различия становятся все более заметными. Таким образом, можно говорить о том, что включение в состав

монослоя 10% липидных пролекарств не приводит к возникновению напряжения в слое и не ведет к разрушению липосомальных частиц. Данный показатель в несколько раз превышает максимальную «загрузку» для липосом с таксолом, где разрушение частиц наблюдается при содержании терапевтического липида более 2%.

Для проведения дальнейших исследований по стабильности терапевтических липосом были получены липосомальные наночастицы (средний диаметр частиц составил 110 нм) с содержанием конъюгата **221** или **222** 5 мол.% и 95 мол.% природного фосфатидилхолина.



Рисунок 61. Состав и схематичное изображение терапевтических липосомальных частиц

При этом внутреннее пространство полученных липосом было заполнено красителем кальцеином. Для этого липидные пленки гидратировали в смеси фосфатного буферного раствора с кальцеином, формировали липосомы методом экструзии, а неикапсульнованный кальцеин удаляли с помощью эксклюзионной хроматографии¹¹.



Рисунок 62. Структура кальцеина

Была изучена стабильность таких частиц в буферном растворе (фосфатный буфет, pH=7.4) и в плазме крови. Деградация липосом в плазме связана, в первую очередь, с адсорбцией на поверхности липосомы белков плазмы крови, в частности, альбуминов. Поскольку включение в состав частиц пролекарств может изменять свойства поверхности, то взаимодействие с белками также будет иным по сравнению с «пустыми» липосомами.

¹¹ Эксклюзионная хроматография - вид хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры.

Стабильности частиц оценивали по флуоресценции кальцеина, высвободившегося при разрушении липосом (рисунок 63).



Рисунок 63. Стабильности липосом в буферном растворе и плазме крови.

Липосомы, состоящие из 100% фосфатидилхолина (еРС) показали высокую стабильность (**рисунок 63**, **A**) и, как следствие, низкую степень высвобождения кальцеина (3% в буферном растворе, что можно объяснить простой диффузией кальцеина через стенки липосом и 10% в плазме крови при инкубации в течение 24 часов). Включение в состав липосом 5% конъюгата **222** не привело к значительным изменениям в высвобождении кальцеина (**рисунок 63**, **C**) и составило 11% и 14% при выдерживании частиц в буферном растворе и в плазме соответственно. В то же время, липосомы с содержанием конъюгата **221** продемонстрировали значительное (27%) «вытекание» кальцеина при инкубации в плазме в течение суток. Такое значительное изменение стабильности не может быть объяснено только электростатическим взаимодействием, поскольку ζ-потенциалы для обоих типов липосом приблизительно равны (**таблица 17**). Возможное объяснение состоит в том, что конъюгат **221** содержит полярную группу –СО₂Ме, которая может способствовать адсорбции альбумина на поверхности липосомы, тем самым провоцируя распад наночастицы.

Таблица 17

Липосомы	Диаметр, нм	ζ-потенциал, мВ	
5% липида 221 –95% еРС	111.0 ± 0.3	-5.4	
5% липида 222 –95% еРС	111.1 ± 0.3	-3.5	

Физические характеристики полученных липосом

Для изучения взаимодействия липосом с фосфолипазой A2 были выбраны 2 фермента: фосфолипаза, секретируемая поджелудочной железой у свиней ($ppPLA_2$) и фермент из яда степной гадюки ($vuPLA_2$), имеющий непанкреатическое происхождение. По своему аминокислотному составу и третичной структуре $ppPLA_2$ гомологична человеческой панкреатической фосфолипазе.



Рисунок 64. Различие в строении ферментов $ppPLA_2$ и $vuPLA_2$. А: $ppPLA_2$ (PDB ID 3O4M); голубая спираль с синим участком отображает аминокислоты, ответственные за распознавание поверхности и связывание с субстратом. Активный сайт отмечен светлосиним цветом (His48, Tyr52, Tyr73 и Asp99[332]). В: гомолог для $vuPLA_2$ (аммодитоксин A из *Vipera ammodytes ammodytes*; гомологичность >90%; PDB ID 3G8G); светло-фиолетовая спираль с темной пурпурной вставкой отображает аминокислоты, участвующие в распознавании поверхности, розовый участок – активный сайт белка (His48, Tyr52, Tyr73, Asp99[333]).

Два выбранных фермента имеют существенное различие в своем строении, а именно в составе свиной фосфолипазы присутствует так называемая панкреатическая петля – спирализованный фрагмент, принимающий участие в распознавании поверхности и связывании с ней (**рисунок 64**) [334]. Наличие такой петли замедляет взаимодействие фермента с липидным слоем, однако после образования «комплекса» с поверхностью фосфолипаза не открепляется от своего субстрата и взаимодействие происходит эффективно. В составе непанкреатической фосфолипазы, содержащейся в змеином яде, такая петля отсутствует, что влияет на скорость расщепления субстрата данным ферментом.

Предполагается, что под действием фосфолипазы полученные липидные конъюгаты, находящиеся в составе липосом, будут расщепляться до лизо-липида и колхициноидного метаболита в соответствии со схемой:



Схема 79. Расщепление терапевтических липидов фосфолипазой А2

Протекание энзиматического гидролиза контролировали по TCX. Для этого были отобраны пробы одинаковой концентрации липосом, состоящих из 5% конъюгата **221** или **222** и 95% матриксного липида (природного фосфатидилхолина). В каждую из проб добавили буферный раствор, обеспечивающий оптимальный рН для каждого из ферментов. Далее в каждую из проб добавили одинаковое количество фермента (концентрация фермента 1 мкМ). Время выдерживания пробы с ферментом составляло 0, 10, 30, 60 минут, 4 часа и 24 часа. Для ингибирования активности фермента в пробу добавляли раствор соли кальция и ЭДТА. После соответствующей пробоподготовки на TCX-пластину наносили по 2 мкл смеси и элюировали смесью хлороформ-этанол-вода (10-1-1).



Конъюгат 221 + $vuPLA_2$ Конъюгат 221 + $ppPLA_2$ 221 с 222 с Конъюгат 221 + PLA_2 0, 15, 30 и 60 мин 0, 15, 30 и 60 мин обеими обеими P.P. и V.U., 24 ч PLA_2 , 4ч PLA_2 , 4ч

Рисунок 65. ТСХ-контроль протекания энзиматического расщепления липосом с конъюгатами 221 и 222.

Накопление *лизо*-липида в смеси отслеживали по окраске с реагентом Васьковского, который селективно взаимодействует с фосфолипидами и окрашивает пластину в синий цвет [335]. По плотности цвета можно было оценить относительное содержание обычного липида и его *лизо*-формы в смеси. Накопление колхициноидного метаболита можно было зафиксировать при облучении пластины в УФ-свете, однако количественна оценка в данном случае невозможна.



Рисунок 66. Анализ плотности цвета на ТСХ при воздействии реагента Васьковского. Площади под кривыми пропорциональны относительному содержанию РОРС и липидных пролекарств (пики в левой части диаграмм) и лизо-формы липидов (пики в правой части диаграмм). Диагараммы отражают гидролиз липосом еРС–конъюгат **221** (сплошная линия) и еРС–конъюгат **222** (прерывистая линия) с *vuPLA*₂ (A, B) и *ppPLA*₂ (C, D) в течение 1 часа (A, C) и 24 часов (B, D).

Из полученных результатов следует, что энзим $ppPLA_2$ гораздо медленнее взаимодействует с обоими типами липосом. В течение первого часа фермент $vuPLA_2$ гидролизует частицы ePC-221 на 13%, а ePC-222 на 63%, за это же время $ppPLA_2$ расщепляет липосомы ePC-222 на 10%, а ePC-221 остаются негидролизованными (**рисунок 66, A, C**). Визуально заметное количество лизо-липида после воздействия $ppPLA_2$ образуется лишь после 4 часов (**рисунок 65**). Анализ смеси после инкубации в течение 24 часов показал, что частицы ePC-221 под действием $vuPLA_2$ гидролизуются на 59%, а под действием $ppPLA_2$ - на 11%. Для ePC-222 соответствующие результаты составляют 84% и 90% (**рисунок 66 B, D**).

Таким образом, начальная скорость гидролиза под действием $vuPLA_2$ существенно выше в случае обоих типов липосом, что объясняется наличием панкреатической петли в структуре фермента панкреатического происхождения. В то же время, липосомы ePC-222 являются более чувствительными к действию обоих ферментов. Этот факт может быть обусловлен различиями в гидрофобности поверхности липосом. Вероятно, в случае частиц с конъюгатом 221, количество полярных групп на поверхности липосомы больше, что затрудняет прикрепление фосфолипазы $ppPLA_2$ к поверхности частицы. Этот же фактор может влиять на повышенную адсорбцию белков плазмы и, как следствие, разрушение липосом и вытекание кальцеина, что объясняет результаты теста на устойчивость частиц в различных средах.

Исходя из полученных данных можно утверждать, что синтезированные терапевтические липосомы имеют достаточную устойчивость в плазме крови и могут эффективно взаимодействовать с фосфолипазой A2 в течение этого времени и использоваться как энзиматически-расщепляемые системы доставки противоопухолевых препаратов, однако предпочтение следует отдавать фосфолипазам непанкреатического происхождения.

Для установления цитотоксической активности полученных колхициноидных пролекарств **221** и **222**, а также их липосомальных форм были выбраны три типа клеток панкреатического происхождения (PANC-1, BxPC-3, Colo-357), а также клетки HaCaT – неизмененные иммортализованные кератиноциты. Выбор клеточных линий обусловлен тем фактом, что в 90% случаях развития рака поджелудочной железы наблюдается повышенный уровень экспрессии фермента PLA2 GIIAв плазме крови.

В соответствии с гипотезой о постадийном гидролизе липидных пролекарств вначале до жирных кислот 223 и 224 (схема 38), и далее до колхициноидов 207 и 208, для эксперимента были использованы все указанные пролекарственные и интактные формы соединений.



Схема 80. Ступенчатый гидролиз липидных пролекарств до интактных колхициноидов

Таблица 18

Цитотоксические свойства колхициноидов **207** и **208**, их пролекарственных форм **221**, **222**, терапевтических липосом на их основе и соединений-метаболитов **223**, **224** (IC₅₀, нМ)

PANC-1	Colo-357	BxPC-3	HaCaT
80	$16(16)^{6}$	16 (16) ⁶	$16(16)^6$
16	3 (3) ⁶	3 (3) ⁶	3 (3) ⁶
400	400 (400) ⁶	400 (400) ⁶	400 (400) ⁶
400	160 (400) ⁶	80 (80) ⁶	400 (400) ⁶
240	80	16	80
30	16	16	16
	PANC-1 80 16 400 400 240 30	PANC-1Colo-357 80 $16 (16)^6$ 16 $3 (3)^6$ 400 $400 (400)^6$ 400 $160 (400)^6$ 240 80 30 16	PANC-1Colo-357BxPC-3 80 $16 (16)^6$ $16 (16)^6$ 16 $3 (3)^6$ $3 (3)^6$ 400 $400 (400)^6$ $400 (400)^6$ 400 $160 (400)^6$ $80 (80)^6$ 240 80 16 30 16 16

5% липида 221 –95% еРС ^с	119	38 (200) ⁶	38 (200) ⁶	38 (40) ⁶
5% липида 222 –95% еРС ^с	38	38 (50) ⁶	15 (40) ⁶	8 (40) ⁶
ePC	Не токсично	Не токсично	Не токсично	Не токсично

[a] IC₅₀-концентрация вещества, вызывающая ингибирование роста и деления 50% популяции клеток после инкубирования в течение 72 часов.

[б] Значения в скобках обозначают IC50 после инкубирования в течение 48ч

[с] Состав липосом: 5 мол.% конъюгата 221 или 222 и 95 мол.% природного фосфатидилхолина,

содержащего преимущественно 1-олеоил-2-пальмитоил-sn-фосфатидилхолин

Наиболее активными среди тестируемых соединений оказались интактные колхициноиды 207 и 208, которые проявляют цитотоксичность в наномолярном диапазоне концентраций, причем соединение 208 оказалось самым активными. Липидные пролекарства 221 и 222 оказались менее активными (на 1,5-2 порядка), чем их аналоги 207 и 208, что хорошо согласуется с литературными данными [290]. Метаболиты 223 и 224 занимают промежуточное положение между липидными формами и интактными соединениями.

Несмотря на ожидаемую низкую цитотоксичность липосомальных форм, наночастицы (при инкубации в течение 72 часов) продемонстрировали активность, сравнимую с активностью жирнокислотных производных 223 и 224. Этот факт может быть объяснен с двух позиций. Во-первых, в течение 72 часов может происходить спонтанный распад липосом, сопровождающийся частичным гидролизом конъюгатов 221 и 222 с высвобождением активных соединений. Это подтверждается тем, что сокращение времени инкубации с 72 до 48 часов снижает цитотоксичность липосомальных форм, однако не влияет на активность индивидуальных соединений 207, 208, 221, 222 (таблица 18, результаты в скобках). Во-вторых, внутреннее содержимое липосом способно быстро проникать в клетку посредством либо облегченного эндоцитоза, либо посредством слияния с клеточной мембраной, в результате чего высвобождение активных компонентов внутри клетки происходит очень быстро [336,337]. По этой причине цитотоксическая активность липосомальных форм практически совпадает с активностью исходных В связи с этим, для последующих экспериментов in vivo необходимо соединений. включить в состав липосом стабилизирующие компоненты, такие как фосфатидилинозит [338,339], холестерол [340–342], производные полиэтиленгликоля [343], препятствующие быстрой опсонизации липосом и их распаду с высвобождением активных соединений.

Таким образом, в ходе проведения данного исследования были разработаны новые подходы к синтезу гетероциклических аллоколхициноидов из природного колхицина, на основании биологических испытаний определены соединения-лидеры, на базе которых были созданы липосомальные пролекарственные формы. Следующим этапом является создание водорастворимых форм, усовершенствование систем доставки активных соединений, а также более детальное изучение токсичности целевых соединений и способов снижения побочных эффектов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Общие сведения

Спектры ЯМР¹H, ³¹Р и ¹³С регистрировали на спектрометрах Agilent DD2 400, Bruker Avance DRX 500, Bruker AV 300, Bruker ARX 200 в CD₃OD, CDCl₃ и ДМСО. Химические сдвиги приведены в шкале б относительно Me₄Si. Спектры MALDI регистрировали на спектрометре Bruker Microflex LT. Элементный анализ проводили с использованием аппарата Elementar (Vario Micro Cube); конечные соединения имеют чистоту> 95%. ЕІ масс-спектры (70 эВ) были получены на DSO II масс-спектрометре (Thermo Electron Corporation) с квадрупольным масс-анализатором. ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Prestige-21-Shimadzu. Оптическое вращение [α]_D измеряли на поляриметре PerkinElmer 341 при 20 °C и λ = 589 нм (длина кюветы: 1,0 см, проведения колоночной хроматографии объем: 1,0 мл). Для использовали AlfaAesarSilicagel 60 (70-230 mesh). Коммерчески доступные реагенты («Aldrich», «AlfaAesar», «Acros») использовали без предварительной очистки. Растворители готовили к использованию с применением стандартных методик очистки. Применяли петролейный эфир с интервалом кипения 40-70 °С.

2. Синтез аллоколхициноидов I



В колбу Шленка поместили 300 мг (0,75 ммоль) колхицина 1, 201 мг (1,5 ммоль) *N*хлорсукцинимида, заполнили шленк аргоном. Добавили 5 мл смеси растворителей (4 мл TFA + 1 мл AcOH), оставили перемешиваться при температуре 70 °C в течение 4 ч. После завершения реакции в смесь добавляли 200 мг Na₂SO₃, добавляли 2,5N раствор NaOH до достижения pH=7-8. Проводили экстракцию этилацетатом (50 мл * 5), промывали насыщенным раствором NaCl, экстракт сушили над Na₂SO₄. Растворитель отгоняли под вакуумом, продукт очищали методом колоночной хроматографии (Элюент: петролейный эфир-этилацетат-этанол 8 : 1 : 1). Полученный продукт – ярко-оранжевые кристаллы. Выход продукта 90% (293 мг).

Т.пл. = 111-112°С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 8.60$ (д, J = 7.3 Гц, 1H), 7.10 (д, J = 5.2 Гц, 2H), 7.01 (д, J = 10.8 Гц, 1H), 4.21 (дт, J = 13.4, 6.8 Гц, 1H), 3.89 (с, 3H), 3.87 (с, 3H), 3.86 (с, 3H), 3.51 (с, 3H), 3.08 (дд, J = 13.4, 5.2 Гц, 1H), 2.08 (тд, J = 13.4, 6.6 Гц, 1H), 1.92 (дд, J = 14.9, 8.2 Гц, 1H), 1.83 (с, 3H), 1.78 (дд, J = 12.1, 6.1 Гц, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 179.29, 172.55, 168.09, 152.03, 150.76, 148.94, 142.36, 140.93, 134.32, 133.59, 132.83, 130.02, 119.24, 116.21, 60.65, 60.62, 60.62, 56.57, 52.76, 36.34, 27.83, 22.75.

Масс-спектр: 391.96 (100%), 389.96 (93%), 376.93 (41%), 374.95 (33%), 476.97 (30%), 477.98 (28%).

Элементный анализ: для C₂₂H₂₄ClNO₆ рассчитано: C, 60.90; H, 5.58; найдено: C, 60.76; H, 5.37.

Синтез 4-бромколхицина 171



В колбу Шленка, снабженную магнитной мешалкой, поместили колхицин 1 (3,00 г, 7,5 ммоль) и *N*-бромосукцинимид (1,476 г, 9 ммоль). В колбу прилили смесь уксусной и трифторуксусной кислот (1:4) в атмосфере аргона. Смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. После окончания реакции добавили избыток тиосульфата натрия и раствор 3*N* NaOH до pH=9. Образовавшийся раствор проэкстрагировали AcOEt (3x50 мл). Объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄. Растворитель удалили при пониженном давлении. Продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использовании смеси петролейного эфира – этилацетата – этилового спирта (5:1:1)в качестве элюента. 4-бромколхицин 171 был получен с выходом 95% (3,412 г)в виде зеленовато-коричневых кристаллов.

Т.пл. = 126-128°С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): δ = 8.63 (д, *J* = 7.2 Гц, 1H), 7.13 (с, 1H), 7.10 (д, *J* = 10.8 Гц, 1H), 7.02 (д, *J* = 10.8 Гц, 1H), 4.25 – 4.19 (м, 1H), 3.90 (с, 3H), 3.89 (с, 3H), 3.85 (с, 3H), 3.53 (с, 3H), 3.11 - 3.09 (м, 1H), 2.23 - 2.14 (м, 1H), 1.99 - 1.91 (м, 1H), 1.86 (с, 3H), 1.82 - 1.76 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 178.0, 168.7, 164.0, 150.3, 150.1, 149.9, 146.0, 134.8, 134.0, 133.1, 130.3, 130.2, 112.4, 111.8, 61.3, 60.8, 60.7, 56.1, 51.2, 33.8, 28.77, 22.4.

Масс-спектр: 391.96 (100%), 389.96 (93%), 376.93 (41%), 374.95 (33%), 476.97 (30%), 477.98 (28%).

Элементный анализ: для C₂₂H₂₄BrNO₆ рассчитано: C, 55.24; H, 5.06; найдено: C, 55.31; H, 4.97.

Синтез 4-хлораллоколхициновой кислоты 172



В колбу Шленка поместили 0,9 г (17 экв., 39,1 ммоль) металлического натрия и порционно добавляли к нему безводный метанол в атмосфере аргона при 0°С до полного растворения натрия. Полученный раствор метилата натрия в метаноле по каплям добавляли к 4-хлорколхицину **170** (1 г, 2,3 ммоль, 1 экв) в инертной атмосфере. Смесь перемешивали при 65 °С в течение 6 часов, после чего растворитель удаляли при пониженном давлении, а к остатку добавляли 10 мл концентрированной соляной кислоты. Полученный раствор экстрагировали этилацетатом (70 мл х 4), промывали насыщенным

раствором хлорида натрия, сушили над Na₂SO₄. Растворитель удаляли при пониженном давлении, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, элюент PE-EtOAc-EtOH 3 : 1 : 1. Продукт получен с выходом 43% (431 мг).

Т.пл. = 196-198°С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 11.05$ (c, 1H), 8.61 (д, J = 8.2 Гц, 1H), 7.97 (c, 1H), 7.91 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 7.48 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 4.50 – 4.44 (м, 1H), 3.91 (c, 3H), 3.89 (c, 3H), 3.50 (c, 3H), 3.12 – 2.96 (м, 2H), 2.12 (дт, J = 12.3, 6.5 Γц, 2H), 1.90 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 170.57, 168.14, 152.37, 147.51, 143.24, 142.88, 141.85, 136.52, 130.89, 129.49, 128.07, 127.66, 126.13, 120.29, 60.68, 60.67, 60.65, 51.04, 38.07, 27.23, 22.76.

Элементный анализ: для C₂₁H₂₂ClNO₆ рассчитано: C, 60.08; H, 5.28; найдено: C, 60.21; H, 5.17.





В колбу Шленка поместили 4-бромоколхицин 171 (5,00 г, 10,39 ммоль), прилили к субстрату свежеприготовленный раствор метилата натрия (17 экв., 4,06 г натрия растворили в 45 мл безводного MeOH) в метаноле при интенсивном переменивании. Реакцию проводили при нагревании до 65 °C в течение 16 часов. После завершения реакции (ТСХ контроль) метанол удалили при пониженном давлении. К остатку добавили 20 мл дистиллированной воды и перемешиваль 20 минут для гидролиза сложного эфира. Раствор подкислили соляной кислотой до pH=1 и проэкстрагировали этилацетатом (40 мл х 3). Объединенный органический слой сушили над сульфатом натрия, растворитель удалили при пониженном давлении. 4-бромоаллоколхициновая кислота была выделена в виде желто-коричневых кристаллов с выходом 89%.

Т.пл. = 188-189 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 13.06$ (c, 1H), 8.62 (д, J = 8.1 Гц, 1H), 7.97 (c, 1H), 7.91 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 7.46 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 4.49-4.42 (м, 1H), 3.90 (c, 3H), 3.87 (c, 3H), 3.50 (c, 3H), 3.08-3.04 (м, 1H), 2.15-2.07 (м, 1H), 1.98-1.93 (м, 1H), 1.90 (c, 3H), 1.89-1.81 (м, 1H). ¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 179.4$, 168.6, 150.4, 150.0, 145.8, 140.5, 137.6, 133.7, 130.6, 129.8, 128.4, 127.2, 124.1, 112.9, 61.2, 60.8, 60.7, 48.1, 36.5, 29.5, 22.6.

Масс-спектр: 405.93 (100%), 403.94 (97%), 464.92 (60%), 462.91 (59%), 390.92 (30%), 388.93 (28%), 406.90 (26%), 404.91 (25%).

Элементный анализ: для C₂₁H₂₂BrNO₆ рассчитано: С, 54.32; Н, 4.78; найдено: С, 54.21; Н, 4.99.

Синтез ацилазида 4-бромоаллоколхициновой кислоты 177



В колбу шленка поместили 4-бромоаллоколхициновую кислоту 173 (1 экв., 2,6 ммоль, 1,00 г), азид натрия (6 экв., 15,58 ммоль, 1,01 г) и ди-трет.бутил-дикарбонат (8 экв., 20,8 ммоль, 1,74 г). Колбу заполнили аргоном и добавили 20 мл сухого ТГФ. Реакцию проводили при перемешивании в течение суток при комнатной температуре. После окончания реакции избыток азида натрия отфильтровали, фильтрат сконцентрировали при пониженном давлении. Продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (13:1:1). Колхициноид 177 был выделен в виде светло-желтого порошка с выходом 87%. **Т.пл.** = 99-101 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): δ = 8.65 (д, *J* = 8.0 Гц, 1H), 7.98 (c, 1H), 7.94 (д, *J* = 8.1 Гц, 1H), 7.54 (д, *J* = 8.0 Гц, 1H), 4.48- 4.42 (м, 1H), 3.91 (c, 3H), 3.88 (c, 3H), 3.51 (c, 3H), 3.09-3.05 (м, 2H), 2.15-2.09 (м, 2H), 1.91 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 171.7, 168.7, 150.7, 150.0, 145.8, 141.3, 139.8, 133.6, 130.4, 129.5, 127.9, 127.0, 123.8, 113.0, 61.1, 60.8, 60.7, 48.1, 36.3, 29.4, 27.1.

Масс-спектр: 402.97 (100%), 400.97 (95%), 463.98 (83%), 461.97 (81%), 403.97 (50%), 405.97 (31%), 462.97 (34%), 464.99 (16%), 491.02 (5%), 489.03 (4%).

Элементный анализ: для C₂₁H₂₁BrN₄O₅ рассчитано: C, 51.55; H, 4.33; найдено: C, 51.47; H, 4.25.

 $[\alpha]_{D} = -102.2$ (CHCl₃, c = 1.000, 19°C).

Синтез (*aR*, *5S*)-*N*-(3-*трет*-бутилкарбамат-8-бромо-9, 10, 11-триметокси-6, 7дигидро-5*H*-дибензо[а,с]циклогептен-5-ил)ацетамида 174



Ацилазид **178** (3,22 ммоль, 1,58 г), полученный на предыдущей стадии, вводили в реакцию с Вос₂О (5,00 ммоль, 3,51 г) в трет.бутиловом спирте в инертной при 90 °С. После перемешивания в течение 36 часов растворитель удалили при пониженном давлении. Продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (10:1:1). 81% оf *Boc*-защищенный амин 174 был выделен в виде светло-желтого порошка с выходом 81%.

Т.пл. = 105-106 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 9.44$ (c, 1H), 8.43 (д, J = 7.9 Гц, 1H), 7.50 (c, 1H), 7.38 (д, J = 8.4 Γц, 1H), 7.22 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 4.36- 4.29 (м, 1H), 3.88 (c, 3H), 3.84 (c, 3H), 3.44 (c, 3H), 3.05- 3.02 (м, 1H), 2.08-1.98 (м, 3H), 1.88 (c, 3H), 1.49 (c, 9H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 168.5, 152.8, 150.0, 149.5, 145.8, 140.8, 139.3, 133.7, 129.6, 129.3, 126.7, 115.9, 112.9, 112.6, 79.0, 61.1, 60.7, 60.4, 48.4, 40.4, 36.3, 29.6, 28.1.

Масс-спектр: 435.1 (100%), 437.1 (92%), 436.1 (88%), 434.2 (74 %), 419.1 (49%), 421.1 (56%), 464.1 (40%), 465.2 (36%), 534.1 (42%), 536.2 (40%), 480.1 (30%), 478.0 (29%). Элементный анализ: для C₂₅H₃₁BrN₂O₆ рассчитано: C, 56.08; H, 5.84; найдено: C, 55.94; H, 5.88.

Синтез (a*R*, 5*S*)-*N*-(3-амино-8-бром-9, 10, 11-триметокси-6, 7-дигидро-5*H*дибензо[а,с]циклогептен-5-ил)ацетамида 179



Амин 174 (3,34 ммоль, 1,78 г) растворили в 3N HCl в DCM. Смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. После окончания реакции добавляли 10% NaOH (водн.) до достижения pH=10. Смесь эстрагировали DCM (3x100 мл). Объединенный органический слой сушили над сульфатом натрия, растовритель удаляли при пониженном давлении. Продукт выделили в виде желтого порошка с выходом 64%. Т.пл. = 230-232 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 8.43$ (д, J = 8.0 Гц, 1H), 7.00 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 6.55 (с, 1H), 6.51 (д, J = 7.9 Гц, 1H), 5.23 (с, 2H), 4.35 - 4.24 (м, 1H), 3.86 (с, 3H), 3.82 (с, 3H), 3.44 (с, 3H), 3.04 - 2.99 (м, 1H), 2.13 - 1.99 (м, 3H), 1.88 (с, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 168.4, 150.0, 148.8, 148.5, 145.7, 140.9, 133.7, 130.4, 130.0, 120.4, 112.5, 111.7, 108.6, 61.1, 60.8, 60.3, 48.2, 36.8, 29.9, 22.7.

Масс-спектр: 433.96 (100%), 435.97 (98%), 376.96 (46%), 374.95 (43%), 361.92 (34%), 363.91 (31%).

Элементный анализ: для C₂₀H₂₃BrN₂O₄ рассчитано: C, 55.18; H, 5.33; найдено: C, 55.24; H, 5.25.

Синтез (a*R*, 5*S*)-*N*-(2-иодо-3-амино-8-бромо-9, 10, 11-триметокси-6, 7-дигидро-5*H*-дибензо[а,с]циклогептен-5-ил)ацетамида 180



Амин 179, полученный на предыдущей стадии, (0,93 ммоль, 0,42 г) вводили в реакцию с *N*-иодосукцинимидом (0,93 ммоль, 0,21 г) в растворе уксусной кислоты в интертной атмосфере в течение 24 часов. После окончания реакции смесь нейтрализовали добавлением водного раствора гидроксида натрия, избыток иода удалили при действии тиосульфата натрия. Смесь проэкстрагировали этилацетатом (50 мл х 3). Объединенный органический слой сушили над сульфатом натрия, растворитель удалили при пониженном давлении. Продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент петролейный эфир – этилацетат - этанол (9:1:1). Колхициноид 180 был выделен в виде оранжево-желтого порошка с выходом 70%.

Т.пл. = 203 – 205 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): δ = 8.37 (д, *J* = 7.9 Гц, 1H), 7.49 (c, 1H), 6.71 (c, 1H), 5.38 (c, 2H), 4.28 – 4.21 (м, 1H), 3.88 (c, 3H), 3.83 (c, 3H), 3.47 (c, 3H), 3.02 – 3.00 (м, 1H), 2.07 – 2.04 (м, 2H), 1.87 (c, 3H), 1.84 – 1.81 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 168.4, 151.5, 149.8, 149.3, 148.1, 145.7, 141.7, 138.9, 133.7, 128.6, 122.7, 112.6, 108.9, 80.1, 61.1, 60.7, 60.4, 48.1, 36.1, 22.6.

Масс-спектр: 434.07 (100%), 426.08 (96%), 419.02 (67%), 421.06 (63%), 375.04 (65%). 377.05 (63%), 534.11 (42%), 536.15 (40%), 480.04 (39%), 478.07 (37%).

Элементный анализ: для C₂₀H₂₂BrIN₂O₄ рассчитано: C, 42.80; H, 3.95; найдено: C, 42.69; H, 4.07.

Синтез (а*R*, 5*S*)-*N*-(2-иод-3-трифторацетамидо-8-бром-9, 10, 11-триметокси-6, 7дигидро-5*H*-дибензо[а,с]циклогептен-5-ил)ацетамида 180'



4-бром-10-иодоколхамин **179** (0,91 ммоль, 0,53 г) поместили в колбу Шленка, заполнили колбу аргоном и прилили 5 мл дихлорометана. Раствор охладили до 0 °С, далее прикапали пиридин (2,37 ммоль, 0,19 г) и полученный раствор перемешивали 5 минут при 0 °С. Далее в смеси добавили по каплям ангидрид трифторуксусной кислоты (1,64 ммоль, 0,34 г). Далее смесь медленно нагревали до комнатной температуры. Через 1 час смесь вылили в 20 мл холодной воды, проэкстрагировали этилацетатом (50 мл х 3), объединенный органический слой сушили над сульфатом натрия, растворитель удалили при пониженном давлении. Продукт был получен в виде красно-оранжевых кристаллов с выходом 92% и использован без даленьйшей очистки.

Т.пл. = 113-115 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): δ = 11.30 (c, 1H), 8.48 (д, *J* = 8.2 Гц, 1H), 7.89 (c, 1H), 7.30 (c, 1H), 4.42 – 4.35 (м, 1H), 3.91 (c, 3H), 3.87 (c, 3H), 3.55 (c, 3H), 3.10 – 3.06 (м, 1H), 2.15 – 2.08 (м, 1H), 2.03 – 1.98 (м, 1H), 1.87 (c, 3H), 1.85 – 1.82 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 168.7, 155.3, 154.9, 150.5, 149.9, 145.8, 141.9, 139.8, 133.7, 127.0, 123.0, 112.9, 108.2 (кв, J_{C-F} = 208 Γц), 104.2, 95.1, 61.1, 60.8, 60.7, 47.9, 36.3, 29.5, 22.6.

Масс-спектр: 473.05 (100%), 471.04 (94%), 532.11 (86%), 530.09 (74%), 655.93 (36%), 657.99 (26%), 598.89 (33%), 597.01 (27%).

Элементный анализ: для C₂₂H₂₁BrF₃IN₂O₅ рассчитано: C, 40.21; H, 3.22; найдено: C, 40.29; H, 3.17.

Методика синтеза пирролоаллоколхициноидов 181а-е Общая методика

В колбу Шленка поместили субстрат **180'** (1 экв.), ацетат палладия (0,05 экв.), иодид меди (I) (0,1 экв.), трифенилфосфин (0,15 экв.) и ацетат калия (З экв.). Колбу заполнили аргоном, в интертной атмосфере добавили растворитель – ацетонитрил. На последненм этапе к смеси добавили алкин (1,2 еq.) и нагрели содержимое колбы до 80 °C, реакцию проводили в течение 6-12 часов. После окончания реакции растворитель удалили при пониженном давлении, целевой продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле.

1'-бромо-2', 3', 4'-триметоксибензо[5', 6':4, 5]1*H*-(*aR*, 1*S*)1-ацетамидо-6,7дигидроциклогепта[3, 4-*f*]1*H*-2-фенилиндол 181а



Колхициноид **181а** был синтезирован согласно методике, описанной выше. Вместо ацетата калия в качестве основания был использован фосфат калия. В качестве элюента для КХ использовали смесь растоврителей петролейный эфир – этилацетат – этанол (20:1:1). Продукт был выделен с выходом 50%.

Т.пл. = 147-149 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 11.61$ (c, 1H), 8.58 (д, J = 8.3 Гц, 1H), 7.87 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 7.50 (c, 1H), 7.46 (т, J = 7.7 Гц, 2H), 7.39 (c, 1H), 7.31 (т, J = 7.4 Гц, 1H), 6.92 (c, 1H), 4.55 – 4.49 (м, 1H), 3.92 (c, 3H), 3.87 (c, 3H), 3.40 (c, 3H), 3.06 – 3.03 (м, 1H), 2.09 – 2.05 (м, 2H), 1.92 (c, 3H), 1.90 – 1.86 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 168.3, 150.2, 149.2, 145.9, 137.9, 137.0, 134.6, 133.8, 132.2, 130.8, 128.9, 128.6, 128.3, 127.0, 124.9, 124.8, 121.1, 112.5, 105.7, 61.2, 60.7, 60.3, 54.9, 48.5, 36.6, 22.7.

Масс-спектр: 534.09 (100%), 536.10 (97%), 535.08 (32%), 537.12 (30%), 536.12 (5%), 538.12 (5%).

Элементный анализ: для C₂₈H₂₇BrN₂O₄ рассчитано: C, 62.81; H, 5.08; найдено: C, 62.76; H, 5.17.

1'-бромо-2', 3', 4'-триметоксибензо[5', 6':4, 5]1*H*-(*aR*, 1*S*)1-ацетамидо-6,7дигидроциклогепта[3, 4-*f*]1*H*-2-гидроксиметилиндол 181b



Колхициноид **181b** был синтезирован согласно общей методике. Смесь петролейного эфира – этилацетата – этанола (15:1:1) была использована в качестве элюента для КХ. Продукт был получен в виде белого порошка с выходом 40%. **Т.п.** = 144-145 °C.

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ = 11.27 (с, 1Н), 8.53 (д, J = 8.4 Гц, 1Н), 7.47 (с, 1Н), 7.33 (с, 1Н), 6.47 (с, 1Н), 5.18 (д, J = 12.8 Гц, 2Н), 4.52 – 4.47 (м, 1Н), 3.90 (с, 3Н), 3.86 (с, 3Н), 3.40 (с, 3Н), 3.04 – 3.00 (м, 1Н), 2.06 – 1.93 (м, 2Н), 1.90 (с, 3Н), 1.86 – 1.79 (м, 1Н).
¹³С ЯМР (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 168.4, 150.1, 149.2, 145.9, 136.3, 134.6, 133.7, 133.6, 130.8, 125.9, 124.5, 121.3, 112.5, 105.7, 102.2, 61.2, 60.7, 60.3, 59.0, 48.4, 31.3, 22.7, 20.7.
Масс-спектр: 412.94 (100%), 410.90 (57%), 472.90 (74%), 470.94 (53%), 473.94 (61%), 471.91 (73%), 428.90 (45%), 430.96 (34%), 488.02 (27%), 488.96 (10%), 490.81 (7%).
Элементный анализ: для С₂₃H₂₅BrN₂O₅ рассчитано: С, 56.45; Н, 5.15; найдено: С, 56.39; Н, 5.19.

1'-бромо-2', 3', 4'-триметоксибензо[5', 6':4, 5]1*H*-(*aR*, 1*S*)1-ацетамидо-6, 7дигидроциклогепта[3, 4-*f*]1*H*-2-(1-гидроксиэтил)индол 181с



Колхициноид **181с** был синтезирован согласно общей методике. Смесь петролейного эфира – этилацетата – этанола (15:1:1) была использована в качестве элюента для КХ. Продукт был получен в виде светло-желтого порошка с выходом 48%. **Т.п.** = 160-161 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 11.26$ (c, 1H), 8.54 (д, J = 6.9 Гц, 1H), 7.45 (c, 1H), 7.32 (c, 1H), 6.42 (д, J = 6.8 Гц, 1H), 5.99 (д, J = 7.0 Гц, 1H), 4.52 – 4.45 (м, 1H), 3.90 (c, 3H), 3.85 (c, 3H), 3.40 (c, 3H), 3.04 – 3.01 (м, 2H), 2.05 (уш.с., 3H), 1.90 (c, 3H), 1.86 – 1.81 (м, 2H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 169.8, 168.4, 149.2, 145.9, 138.7, 136.0, 134.4, 133.8, 130.9, 125.7, 124.4, 121.2, 112.5, 105.6, 99.4, 66.0, 61.2, 60.7, 60.3, 48.5, 36.6, 31.0, 22.7, 21.0. **Масс-спектр**: 501.93 (100%), 503.92 (93%), 422.94 (79%), 444.93 (78%), 411.96 (61%), 413.99 (57%), 429.94 (41%), 427.93 (28%).

Элементный анализ: для C₂₄H₂₇BrN₂O₅ рассчитано: С, 57.26; Н, 5.41; найдено: С, 57.31; Н, 5.32.

1'-бромо-2', 3', 4'-триметоксибензо[5', 6':4, 5]1*H*-(*aR*, 1*S*)1-ацетамидо-6, 7дигидроциклогепта[3, 4-*f*]1*H*-2-ацетоксиметилиндол 181d



Колхициноид **181d** был синтезирован согласно общей методике. Смесь петролейного эфира – этилацетата – этанола (17:1:1) была использована в качестве элюента для КХ. Продукт был получен в виде светло-желтого порошка с выходом 52%. **Т.п.** = 139-140 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 11.27$ (c, 1H), 8.53 (д, J = 8.3 Гц, 1H), 7.47 (c, 1H), 7.33 (c, 1H), 6.47 (c, 1H), 5.18 (уш.с., 2H), 4.51 – 4.46 (м, 1H), 3.90 (c, 3H), 3.85 (c, 3H), 3.40 (c, 3H), 3.04 – 3.01 (м, 1H), 2.03 (м, 1H), 1.98 (c, 3H), 1.90 (c, 3H), 1.86 – 1.81 (м, 2H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 168.4, 150.1, 149.2, 145.9, 136.3, 134.6, 133.7, 133.7, 130.8, 125.9, 124.5, 121.3, 118.9, 112.5, 105.7, 102.2, 61.2, 60.7, 60.3, 59.8, 59.0, 29.0, 22.7, 20.8, 20.7.

Масс-спектр: 531.92 (100%), 529.94 (97%), 470.95 (88%), 472.92 (81%), 412.97 (68%), 410.97 (60%).

Элементный анализ: для C₂₅H₂₇BrN₂O₆ рассчитано: C, 56.51; H, 5.12; найдено: C, 56.44; H, 5.19.

1'-бромо-2', 3', 4'-триметоксибензо[5', 6':4, 5]1*H*-(*aR*, 1*S*)1-ацетамидо-6, 7дигидроциклогепта[3, 4-*f*]1*H*-2-(2-гидроксиэтил)индол 181е



Колхициноид **181e** был синтезирован согласно общей методике. Смесь петролейного эфира – этилацетата – этанола (15:1:1) была использована в качестве элюента для КХ. Продукт был получен в виде светло-желтого порошка с выходом 62%. **Т.п.** = 127 – 128 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): δ = 10.92 (c, 1H), 8.50 (д, *J* = 8.4 Гц, 1H), 7.37 (c, 1H), 7.25 (c, 1H), 6.17 (c, 1H), 4.79 – 4.76 (м, 1H), 4.52 – 4.46 (м, 1H), 3.90 (c, 3H), 3.85 (c, 3H), 3.73 – 3.71 (м, 2H), 3.41 (c, 3H), 3.00 – 2.88 (м, 1H), 2.88 – 2.84 (м, 2H), 2.08 – 1.99 (м, 2H), 1.89 (c, 3H), 1.85 – 1.80 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 205.4, 154.7, 153.0, 151.2, 141.4, 140.8, 140.4, 135.8, 128.3, 121.8, 112.3, 107.9, 107.8, 94.8, 91.0, 60.8, 60.5, 56.2, 55.9, 54.9, 47.6, 40.2, 40.0, 29.1. **Масс-спектр**: 502.11 (100%), 504.14 (98%), 503.01 (27%), 505.04 (26%), 506.09 (15%), 504.12 (11%).

Элементный анализ: для C₂₄H₂₇BrN₂O₅ рассчитано: С, 57.26; Н, 5.41; найдено: С, 57.11; Н, 5.35.

Синтез 1'-бромо-2', 3', 4'-триметоксибензо[5', 6':4, 5]1*H*-(*aR*, 1*S*)1-ацетамидо-6, 7-дигидроциклогепта[3, 4-*f*]1*H*-1-метил-2-гидроксиметилиндола 181g



Синтез TMS-замещенного алкина

a.



Данное соединение было синтезировано согласно литературной методике (*J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 5017). К раствору пропин-2-ола-1 (44,1 мл, 0,758 моль) в дихлорометане (300 мл), добавили *трет.*-бутилдиметилсилил хлорид (120 г, 0,796 моль) и имдазол (103,2 г, 1,516 моль) при 0 °С. Через 1 час смесь промыли водой, высушили над Na₂SO₄ и затем сконцентрировали под вакуумом. Продукт был ввделен в виде бесцветной жидкости с применением колоночной хроматографии с использованием смеси петролейный эфир – этилацетат (10:1) в качестве элюента. Выход продукта составил 78%. ¹H **ЯМР** (400 МГц, CDCl₃): $\delta = 4.31$ (с, 2H), 2.38 (с, 1H), 0.91 (с, 9H), 0.13 (с, 6H).

b. Синтез 1'-бромо-2', 3', 4'-триметоксибензо[5', 6':4, 5]1*H-(aR, 1S)*1-ацетамидо-6, 7-дигидроциклогепта[3, 4-I]1*H-2-трет.*-бутилдиметилсилилоксиметилиндола 181f



В колбу Шленка поместили субстрат **180'** (1 экв., 80 мг, 0,12 ммоль), Pd(dppf)Cl₂ (0,05 экв., 4,4 мг, 0,006 ммоль), иодид меди (I) (0,1 экв., 2,3 мг, 0,012 ммоль). Колбу заполнили аргоном и в инертной атмосфере прилили ацетонитрил. На последнеим этапе в колбу добавили *N*,*N*-диизопропилэтиламин (3 экв., 95 мкл, 0,366 ммоль) и алкин (1,2 экв., 30 мкл, 0,146 ммоль) после чего температуру реакционной смеси повысили до 90 °C и перемешивали в течение 8 часов. После окончания реакции растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент петролейный эфир – этилацетат – этанол (5:1:1). Продукт выделили в виде светло-бежевого масло с выходом 51%.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): δ = 11.06 (c, 1H), 8.55 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.42 (c, 1H), 7.31 (c, 1H), 6.31 (c, 1H), 4.78 (c, 2H), 4.48 – 4.41 (м, 1H), 3.89 (c, 3H), 3.84 (c, 3H), 3.36 (c, 3H), 2.07 – 1.96 (м, 4H), 1.90 (c, 3H), 0.89 (c, 9H), 0.09 (c, 6H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 168.7, 150.3, 149.2, 146.0, 139.0, 136.3, 133.9, 133.9, 131.1, 126.2, 124.3, 121.1, 112.6, 105.7, 99.5, 61.3, 60.9, 60.5, 58.8, 48.6, 36.8, 29.9, 26.0, 22.8, 18.2, -5.0.

с. Метилирование и удаление защитной группы

Пирролоаллоколхициноид **181f** (1 экв., 48 мг, 0,079 ммоль), синтезированный на предыдущем этапе, вводили в реакцию с гидридом натрия (60% в минеральном масле, 2,3 экв., 0,19 ммоль, 7,6 мг) и метилиодидом (1,5 экв., 0,125 ммоль, 17,7 мг) в сухом ТГФ. Температуру повышали от 0 °C до 65 °C. Реакцию проводили в течение 6 часов, после чего растовритель удалили при пониженном давлении, остаток профильтровали через малеький слой силикагеля. Неочищенный продукт был растворен в 4 мл ТГФ, к раствору добавили 45 мкл 1N ТВАF в ТГФ и перемешивали смесь в течение 3 часов. После завершения реакции растворитель удалили, продукт выделили метом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (15:1:1). Продукт был выделен в виде белого порошка с выходом 55% на 2 стадии.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d6): $\delta = 8.51$ (д, J = 8.3 Гц, 1H), 7.46 (c, 1H), 7.37 (c, 1H), 6.38 (c, 1H), 5.22 (т, J = 5.0 Гц, 1H), 4.64 (д, J = 5.1 Гц, 2H), 4.60 – 4.56 (м, 1H), 3.91 (c, 3H), 3.86 (c, 3H), 3.77 (c, 2H), 3.34 (c, 3H), 3.04 – 2.99 (м, 1H), 2.10 – 2.05 (м, 1H), 2.02 – 1.97 (м, 1H), 1.93 (c, 3H), 1.84 – 1.79 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d6): δ = 168.5, 150.1, 149.1, 145.8, 140.7, 137.2, 133.8, 133.7, 130.2, 125.2, 124.3, 121.2, 112.5, 103.6, 100.1, 61.2, 60.7, 60.2, 55.5, 48.3, 37.0, 29.8, 29.7, 22.80.

Масс-спектр: 502.08 (100%), 504.09 (91%), 443.09 (79%), 445.08 (78%), 431.10 (50%), 429.08 (39%) 414.06 (61%), 416.08 (60%), 401.07 (29%), 399.09 (28%).

Элементный анализ: для C₂₄H₂₇BrN₂O₅ рассчитано: С, 57.26; Н, 5.41; найдено: С, 57.33; Н, 5.54.

3. Синтез аллоколхициноидов II

Синтез (а*R*,5*S*)-*N*-(3-гидрокси-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*-дибензо-[а,с]циклогептен-5-ил)ацетамида 94



Колхицин 1 (1.20 g, 3.00 ммоль) растворили в 11.5 мл ледяной AcOH, 70 мл 0.1 N HCl было добавлено и получившийся растовр перемешивали в течение 3 часов при 100 °C. После окончания реакции смесь охладили до комнатной температуры и нейтрилизовали добавлением твердого NaHCO₃ до pH=6, далее экстригировали хлороформом (60 мл х 3). Объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄, растворитель удалили при пониженном давлении. Колхицеин **93** был получен в виде зеленоватой пены (1.13 г, 2.83 ммоль, 98%) и использован на следующем этапе без дополнительной очистки.

Т.пл. 150 - 151 °C; лит.[186] = 150 °C.

ИК: 3254, 3045, 2992, 2829, 1704, 1656, 1601, 1592, 1541, 1485, 1349, 1320, 1273, 1134, 1091, 1005, 983, 955, 854, 771, 726 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, CDCl₃): δ = 7.49 (д, *J* = 7.9 Гц, 1H), 6.54 (с, 1H), 6.87 (с, 1H), 5.91 (д, *J* = 8.1 Гц, 1H), 5.75 (д, *J* = 8.1 Гц, 1H), 4.81–4.72 (м, 1H), 3.92 (с, 3H), 3.88 (с, 3H), 3.53 (с, 3H), 2.54–2.26 (м, 4H), 2.04 (с, 3H).

Колхицеин **93** (1.07 г, 2.68 ммоль, 1 экв.), полученный на предыдущем этапе, растворили в 26 мл H₂O, NaOH (1.11 г, 27.75 ммоль, 10 экв.) был добавлен и смесь охлодили до 0 °C. NaI (9.30 г, 62.00 ммоль, 23 экв.) и I₂ (2.06 г, 8.11 ммоль, 3 экв.) растворили в 120 мл H₂O, полученный раствор медленно прикапывали к раствору колхицеина в течение 1 ч, сохраняя температуру ниже 5 °C. После окончания добавления иода смесь перемешивали еще 1 час при температуре 0 °C. После окончания реакции смесь нагрели до комнатной температуры, избыток иода нейтрализовали добавлением твердого Na₂S₂O₃, полученный раствор подкислили pH = 2 концентрированной соляной кислотой и проэкстрагировали этилацетатом (50 мл х 3). Объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄, растворитель удалили при пониженном давлении. Иодоколхинол **74** был получен в вимде желтого порошка (1.24 г, 2.56 ммоль, 95%) и использовался без дальнейшей очистки.

Т.пл. = 235 - 238 °С; лит. = 238 °С.

ИК: 3256, 2989, 2930, 2849, 2250, 1647, 1595, 1538, 1433, 1371, 1321, 1276, 1191, 1156, 1049, 954, 927, 862, 791, 758, 726 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 10.28$ (c, 1H), 8.38 (д, J = 8.0 Гц), 7.56 (c, 1H), 6.86 (c, 1H), 6.76 (c, 1H), 4.40 – 4.33 (м, 1H), 3.82 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.48 (c, 3H), 2.50 – 2.44 (м, 1H), 2.16 – 2.07 (м, 2H), 1.93 – 1.88 (м, 1H), 1.87 (c, 3H).

К смеси иодоколхинола 74 (1.00 г, 2.06 ммоль) и цинковой пыли (2.95 г, 45.4 ммоль, 22 экв.) добавили ледяную уксусную кислоту (25 мл). Раствор перемешивали при 120 °C 3 ч. После охлаждения до комнатной температуры смесь вылили в емкость со льдом, разбавили холодной водой и промыли уксусной кислотой, далее профильтровали. Фильтрат проэкстрагировали хлороформом (40 мл х 3). Объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄, растворитель удалили при пониженном давлении. *N*-ацетилколхинол 94 получили в виде белого кристаллического вещества (0.74 г, 2.06 ммоль, 99%). Т.пл. = 211 - 214 °C; лит. = 213-215 °C.

ИК: 3288, 3065, 2986, 2849, 2679, 2150, 1703, 1644, 1605, 1540, 1478, 1449, 1322, 1221, 1191, 1099, 1048, 1002, 960, 926, 818, 755, 729 см⁻¹

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 9.40 (c, 1H), 8.33 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.11 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 6.76 (д, *J* = 2.3 Гц, 1H), 6.74 (c, 1H), 6.68 (дд, *J* = 8.3 Гц, 2.3 Гц, 1H), 4.51 – 4.42 (м, 1H), 3.81 (c, 3H), 3.46 (c, 3H), 3.76 (c, 3H), 2.49 – 2.41 (м, 1H), 2.15 – 2.02 (м, 2H), 1.87 (c, 3H), 1.86 – 1.79 (м, 1H).

Синтез (a*R*,5*S*)-*N*-(3-трифторметилсульфонилокси-9,10,11-триметокси-6,7дигидро-5*H*-дибензо[a,c]циклогептен-5-ул)ацетамида 182



N-ацетилколхинол **94** (200 мг, 0.56 ммоль) растворили в сухом CH_2Cl_2 (15 мл). Пиридин (0,12 мл, 1.45 ммоль, 2.6 экв.) добавили к раствору по каплям и охладили его до 0 °C. Ангидрид трифторметансульфоновой кислоты (0.168 мл, 1 ммоль, 1.8 экв.) добавили к охлажденной смеси и перемешивали раствор 3 ч, при этом температуру плавно поднимали до комнатной. После окончания реакции к смеси добавили 10% HCl (1 мл), Органический слой промыли насыщенным раствором NaHCO₃, после чего водный слой был повторно проэкстрагирован дихлорометаном. Органические слои объединили, растворитель удалили при пониженном давлении, остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир - AcOEt – EtOH 8:1:1). Продукт **182** был выделен в виде светло-желтого порошка (207 мг, 0,33 ммоль, 76%).

Т.пл. 165 - 167 °С;

ИК: 3270, 3237, 3193, 3063, 29338, 2866, 1662, 1583, 1547, 1415, 1327, 1220, 1135, 1100, 881, 734 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.49$ (д, J = 8.3 Гц, 1H), 7.50 (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.43 (дд, J = 8.5, 2.6 Гц, 1H), 7.34 (д, J = 2.6 Гц, 1H), 6.83 (с, 1H), 4.57 – 4.47 (м, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.79 (с, 3H), 3.55 (с, 3H), 2.60 – 2.52 (м, 1H), 2.27 – 2.15 (м, 1H), 2.07 – 1.89 (м, 2H), 1.88 (с, 3H),

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.60, 153.10, 150.24, 148.17, 143.66, 140.50, 134.81, 134.69, 131.82, 122.48, 118.95, 117.94, 116.68, 108.25, 60.77, 60.53, 55.87, 48.22, 38.15, 29.80, 22.50.

Элементный анализ: рассчитано для C₂₁H₂₂F₃NO₇S: C, 51.53; H, 4.53. Найдено: C, 51.30; H, 4.25.

[α]_D²⁰ -47 (*c*=1.12, CHCl₃)

Синтез (а*R*,5*S*)-*N*-(3-(2-дифенилметилен)гидразинил)-9,10,11-триметокси-6,7дигидро-5*H*-дибензо[а,с]циклогептен-5-ил)ацетамида 183



Трифлат 182 (40 мг, 0.08 ммоль), гидразон бензофенона (24 мг, 0.12 ммоль, 1.5 экв.), Pd(OAc)₂ (2 мг, 0.01 ммоль, 0.1 экв.), *rac*-BINAP (15 мг, 0.024 ммоль, 0.3 экв.) и K₃PO₄ (35 мг, 0.16 ммоль, 2 экв.) поместили в колбу Шленка, заполнили ее аргоном. К смеси добавили сухой толуол (5 мл) и перемешивали при 80 °C в течение 10 часов. После окончания реакции растворитель удалили, продукт 183 выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир – AcOEt – EtOH 16:1:1 \rightarrow 7:1:1) в виде желтого порошка с выходом 14% (6 мг).

Т.пл. 126 - 128 °С.

ИК: 3329, 3296, 3090, 2924, 1651, 1645, 1602, 1563, 1487, 1444, 1320, 1236, 1101, 955, 773, 764 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (300 МГц, ДМСО-d₆): δ = 8.44 (д, *J* = 8.2 Гц, 1H), 7.74 – 7.51 (м, 12H), 7.47 (д, *J* = 6.0 Гц, 2H), 6.82 (c, 1H), 4.58 – 4.44 (м, 1H), 3.84 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.55 (c, 3H), 2.22 – 2.11 (м, 1H), 2.09 – 2.01 (м, 1H), 1.95 - 1.84 (м, 2H), 1.72 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.38, 153.10, 150.36, 140.48, 135.01, 132.00, 131.57, 131.52, 131.48, 131.43, 128.82, 128.80, 128.71, 127.99, 127.64, 126.96, 123.16, 108.17, 69.80, 60.88, 60.52, 55.88, 48.28, 27.97, 22.43.

Элементный анализ: рассчитано для C₃₃H₃₃N₃O₄: C, 74.00; H, 6.21. Найдено: C, 73.77; H, 6.50.

Синтез аллоколхициновой кислоты 95



В колбу Шленка поместили колхицин 1 (3.00 г, 7.50 ммоль). Свежеприготовленный раствор метилата натрия в метаноле (2.90 г металлического натрия растворили 45 мл безводного MeOH) был добавлен через септу при интенсивном перемешивании. Реакцию проводили при нагревании при 65 °C в течение 4 ч. После окончания реакции растворитель удалили при пониженном давлении. К остатку добавили 15 мл дистиллированной воды и перемешивали в течение 20 минут. Раствор подкислили концентрированной соляной кислотой до pH = 1, осадок отфильтровали и сушили в вакууме при 60 °C. Аллколхициновую кислоту получили в виде светло-желтого порошка с количественным выходом (2.88 г, 7.50 ммоль) и использовании без дополнительной очистки.

Т.пл. 260 - 261 °С; (лит. 260-262 °С).

ИК: 3496, 2934, 2855, 1723, 1687, 1596, 1456, 1405, 1322, 1101, 1096, 997, 834, 739 см⁻¹. **¹Н ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 8.62 (д, *J* = 8.4 Гц, 1H), 7.97 (с, 1H), 7.87 (д, *J* = 8.0 Гц, 1H), 7.43 (д, *J* = 8.0 Гц, 1H), 6.82 (с, 1H), 4.60 – 4.52 (м, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.50 (с, 3H), 2.58 – 2.52 (м, 1H), 2.21 – 2.14 (м, 1H), 2.11 – 2.01 (м, 1H), 1.98 – 1.92 (м, 1H), 1.89 (с, 3H).

Синтез (a*R*,5*S*)-*N*-(3-Амино-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*-дибензо[a,c]цикло-гепта-5-ил)ацетамида 96



Аллоколхициновая кислота **95** (3.00 г, 7.83 ммоль) взаимодействовала с NaN₃ (1.50 г, 23.07 ммоль, 3 экв.) и ди-*трет*.-бутилдикарбонатом (10.20 г, 46.8 ммоль, 6 экв.) в 1,4диоксане (40 мл) при 90 °C в течение 2 дней. Избыток NaN₃ был отфильтрован, фильтрат сконцентрировали при пониженном давлении. Продукт был выделен методом колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир-AcOEt-EtOH 10:1:1). *Вос*-защищенный аллоколхамин был выделен в виде светло-желтых кристаллов (2.75 г, 6.03 ммоль, 77%). **Т.п.** 103 - 105 °C;

ИК: 3397, 2939, 2927, 1776, 1748, 1705, 1652, 1596, 1532, 1482, 1235, 1156, 1115, 1036, 1021,851, 762, 732 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 9.36 (c, 1H), 8.36 (д, *J* = 8.1 Гц, 1H), 7.49 (д, *J* = 1.8 Гц, 1H), 7.33 (дд, *J* = 8.3, 1.9 Γц, 1H), 7.18 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 6.76 (c, 1H), 4.47 – 4.41 (м, 1H), 3.82 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.45 (c, 3H), 2.49 – 2.40 (м, 1H), 2.17 – 2.04 (м, 2H), 1.98 – 1.90 (м, 1H), 1.87 (c, 3H), 1.48 (c, 9H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.15, 152.60, 151.38, 150.40, 140.90, 140.53, 137.85, 134.78, 132.79, 129.67, 125.21, 123.74, 122.24, 108.13, 60.58, 60.44, 55.83, 47.85, 38.61, 28.17, 27.81, 27.40, 22.62.

MALDI (DCTB, положит. режим): 456,0 (100%), 457,1 (61%), 400,9 (53%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₅H₃₂N₂O₆: C, 65.77; H, 7.07. Найдено: C, 65.58; H, 6.93.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ -91 (c 2.06, CHCl₃).

Удаление защитной группы *N*-защищенного аллоколхамина (2.75 г, 6.03 ммоль) было реализовано при взаимодействии с концентрированной соляной кислотой (9 мл) в дихлорометане (27 мл) при комнатной температуре в течение 2 часов. После окончания реакции смесь нейтрализовани насыщенным водным раствором NaHCO₃ до pH = 8, проэкстрагировали дихлорометаном (3 х 100 мл), объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄, далее растворитель удалили при пониженном давлении. Аллоколхамин **96** был получен в виде желтого порошка (2.01 г, 5.67 ммоль, 94%). **Т.п.** 154 - 156 °C;

ИК: 3370, 3285, 2930, 2860, 1661, 1634, 1560, 1482, 1477, 1321, 1143, 1107, 998, 748 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (500 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.25$ (д, J = 8.5 Гц, 1H), 6.97 (д, J = 8.1 Гц, 1H), 6.70 (с, 1H), 6.54 (д, J = 2.2 Гц, 1H), 6.48 (дд, J = 8.1, 2.3 Гц, 1H), 5.03 (уш.с., 2H), 4.47 – 4.41 (м, 1H), 3.80 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 3.45 (с, 3H), 2.46 – 2.38 (м, 1H), 2.14 – 2.06 (м, 2H), 1.94 – 1.88 (м, 1H), 1.86 (с, 3H).

¹³С ЯМР (126 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.05, 151.34, 150.26, 147.49, 140.76, 140.52, 134.61, 129.80, 125.37, 121.28, 111.70, 108.65, 107.89, 60.41, 60.15, 55.78, 48.12, 38.48, 30.21, 22.66. МАLDI (положит. режим): 355,8 (100%), 297,8 (31%), 326,7 (8%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₀H₂₄N₂O₄: C, 67.40; H, 6.79, найдено: C, 67.28; H, 6.95.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ -84 (c 1.07, CHCl₃).

Синтез (a*R*,5*S*)-*N*-(3-иодо-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*-дибензо[a,c]циклогептен-5-ил)ацетамида 186



Амин 96 (1.00 г, 2.81 ммоль) растворили в концентрированной HCl (5 мл) и охладили раствор до 0 °C. Раствор NaNO₂ (210 мг, 3.04 ммоль, 1,1 экв.) в H₂O (2 мл) добавили к холодной смеси и перемешивали при 0 °C в течение 30 минут, затем охлажденный раствор KI (4.64 г, 27.95 ммоль, 10 экв.) в H₂O (15 мл) добавили по каплям. Реакционную смесь перемешивали в течение суток при комнатной температуре. После окончания реакции избыток иода нейтрализовали добавлением твердого Na₂S₂O₃. Раствор проэкстрагировали дихлорометаном (3 х 50 мл). Объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄ и далее сконцентрировали при пониженном давлении. Продукт **186** выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир-AcOEt-EtOH 8:1:1) в виде светло-желтых кристаллов (0.83 г, 1.78 ммоль, 64%).

Т.пл. 137 - 139 °С;

ИК: 3307, 2930, 1654, 1531, 1453, 1406, 1323, 1106, 1096, 998, 832, 739 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 8.42 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.67 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.65 (с, 1H), 7.11 (д, *J* = 8.6 Гц, 1H), 6.80 (с, 1H), 4.45 – 4.54 (м, 1H), 3.83 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.49 (с, 3H), 2.54 - 2.52 (м, 1H), 2.11 – 2.21 (м, 1H), 1.98 – 2.08 (м, 1H), 1.88 (с, 3H), 1.80 – 1.88 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.48, 152.78, 150.16, 142.80, 140.55, 134.82, 134.73, 133.68, 131.75, 131.69, 123.30, 108.20, 93.31, 60.72, 60.55, 55.85, 47.82, 38.50, 29.88, 22.67.

MALDI (положит. режим): 489,8 (M+Na⁺, 100%), 505,8 (M+K⁺, 84%), 152,8 (32%), 365,0 (28%), 408,9 (23%), 466,9 (20%).

Элементный анализ. Рассчитано для C₂₀H₂₂INO₄: C, 51.41; H, 4.75. Найдено: C, 51.19; H, 4.91.

 $[\alpha]_D^{20}$ -98 (c 1,54, CHCl₃).

Синтез (aR,5S)-N-(3-(2-*трет*.-бутоксикарбонил)гидразинил)-9,10,11триметокси-6,7-дигидро-5*H*-дибензо[а,с]циклогептен-5-ил)ацетамида (187а) и (a*R*,5*S*)-*N*-(3-(1-*трет*.-бутоксикарбонил)гидразинил)-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*дибензо[а,с]цикло-гептен-5-ил)ацетамида (187b)



В колбу Шленка, заполненную аргоном, поместили арилиодид **186** (0.50 г, 1.07 ммоль), CuI (10 мг, 0.05 ммоль, 0.05 экв.), 1,10-фенантролин (36 мг, 0.20 ммоль, 0.2 экв.), Cs₂CO₃ (700 мг, 2.14 ммоль, 2 экв.) и сухой DMF (15 мл). *трет.*-Бутоксикарбонил гидразид (183 мг, 1.39 ммоль, 1,3 экв.) растворили в DMF (2 мл) и по каплям добавили в колбу Шленка. Реакцию проводили при 80 °C в течение 12 часов, растворитель удалили при пониженном давлении, к остатку добавили дистиллированную воду (30 мл) и

проэкстрагировали смесь дихлорметаном (3 х 50 мл). Объединенный органический слой пробыли насыщенным раствором NaCl, сушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали при пониженном давлении. Соединения **187a** и **187b** были выделены методом колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир-AcOEt-EtOH 8:1:1) в виде светложелтых порошков (247 мг, 0.52 ммоль, 49 % и 105 мг, 0.22 ммоль, 21%) для **187a** и **187b** соответственно.

Соединение 187а

Т.пл. = 110 - 113 °С;

ИК: 3405, 2930, 1742, 1647, 1600, 1482, 1476, 1454, 1403, 1324, 1234, 1150, 1101, 1009, 736 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 9.36 (c, 1H), 8.36 (д, *J* = 8.0 Гц, 1H), 7.48 (c, 1H), 7.34 (c, 1H), 7.31 (д, *J* = 8.1 Гц, 1H), 7.18 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 6.76 (c, 1H), 4.38 – 4.48 (м, 1H), 3.82 (c, 3H), 3.76 (c, 3H), 3.45 (c, 3H), 2.03 – 2.20 (м, 3H), 1.89 – 1.96 (м, 1H), 1.87 (c, 3H), 1.49 (c, 9H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.36, 152.83, 152.08, 150.34, 140.85, 140.53, 138.41, 134.78, 129.56, 127.62, 124.40, 115.97, 113.13, 107.99, 78.85, 60.53, 60.45, 48.45, 55.82, 38.13, 28.17, 27.40, 22.67.

MALDI (положит. режим): 423,0 (100%), 495,0 (М+Na⁺, 44%), 439,0 (33%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₅H₃₃N₃O₆: C, 63.68; H, 7.05, найдено: C, 63.41; H, 7.38.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ -82 (c 0.50, CHCl₃).

Соединение 187b

Т.пл. 112 - 114 °С;

ИК: 3467, 2932, 1701, 1685, 1654, 1482, 1368, 1349, 1327, 1105, 1020, 820, 725 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.43$ (c, J = 8.3 Гц, 1H), 7.95 (c, 1H), 7.37 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 7.21 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 6.77 (c, 1H), 5.08 (c, 2H), 4.46 – 4.61 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.52 (c, 3H), 2.50 – 2.57 (м, 1H), 2.02 – 2.19 (м, 2H), 1.88 – 1.96 (м, 1H), 1.87 (c, 3H), 1.46 (c, 9H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.25, 162.30, 154.56, 152.29, 150.37, 142.66, 140.55, 139.90, 134.84, 128.89, 124.24, 120.71, 118.05, 108.03, 80.29, 60.57, 60.51, 55.82, 48.21, 38.53, 35.77, 30.76, 27.95.

MALDI (положит. режим): 494,0 (M+Na⁺, 100%), 510,0 (M+K⁺, 79%), 394,0 (71%), 377,0 (46%), 410,0 (32%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₅H₃₃N₃O₆: C, 63.68; H, 7.05, найдено: C, 63.44; H, 7.29.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ -59 (c 0.60, CHCl₃).

Общая методика синтеза пирролоаллоколхициноидов 188-193.

Гидразин **187b** (50 мг, 0.11 ммоль, 1 экв.) и *p*-TsOH·H₂O (51 мг, 0.26 ммоль, 2.5 экв.) растворили в небольшом количестве этанола. Кетон (0.33 ммоль, 3 экв.) был добавлен к смеси и реакцию проводили при 100 °C в течение 8 ч. После окончания реакции растворитель удалили, продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир – AcOEt – EtOH 9:1:1). Соответствующие

пирролоаллоколхициноиды были выделены преимущественно в виде светло-бежевых порошков.

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(а*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*f*]1*H*-2'',3''-диметилиндол 188а



Выделен в виде белого порошка, выход 22% (10 мг, 0.02 ммоль).

Т.пл. 132 - 134 °С;

ИК: 3397, 2921, 1650, 1453, 1438, 1405, 1397, 1348, 1238, 740 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.61 (c, 1H), 8.42 (д, *J* = 8.7 Гц, 1H), 7.26 (c, 1H), 7.19 (c, 1H), 6.74 (c, 1H), 4.62 (дд, *J* = 16.6, 9.6 Гц, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.41 (c, 3H), 2.42 – 2.48 (м, 1H), 2.30 (c, 3H), 2.13 (c, 3H), 1.97 – 2.12 (м, 2H), 1.89 (c, 3H), 1.78 – 1.87 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.03, 151.58, 150.46, 140.59, 134.77, 134.55, 132.92, 131.05, 127.36, 126.35, 124.07, 118.26, 107.78, 104.89, 104.66, 60.56, 60.35, 55.80, 48.29, 38.81, 30.34, 22.75, 11.23, 8.44.

MALDI (положит. режим): 407,0 (100%), 350,0 (36%), 154,8 (18%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₄H₂₈N₂O₄: C, 70.57; H, 6.91, найдено: C, 70.34; H, 7.15.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ -28 (c 1.31, CHCl₃).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(а*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*e*]1*H*-2'',3''-диметилиндол 188b



Соединение выделено в виде белого порошка, выход 51% (22 мг, 0.05 ммоль). **Т.п.** 125 - 127 °С;

ИК: 3428, 2921, 1651, 1485, 1399, 1321, 1232, 1143, 1105, 1102, 734 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.73 (c, 1H), 7.15 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 6.99 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 6.83 (c, 1H), 5.90 – 5.96 (м, 1H), 5.86 (д, *J* = 7.8 Γц, 1H), 3.85 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.38 (c, 3H), 2.42 – 2.49 (м, 2H), 2.41 (c, 3H), 2.31 (c, 3H), 2.14 – 2.21 (м, 2H), 1.46 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 166.95, 151.64, 150.16, 140.95, 135.29, 134.78, 131.83, 131.79, 127.67, 125.78, 124.65, 123.43, 108.65, 108.60, 105.26, 60.64, 59.60, 55.83, 45.81, 34.19, 30.24, 22.71, 11.84, 11.19.

MALDI (отриц. режим): 456,0 (100%), 457,1 (61%), 400,9 (53%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₄H₂₈N₂O₄: C, 70.57; H, 6.91, найдено: C, 70.39; H, 7.20.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ +38 (c 0.40, CHCl₃).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*H*-(a*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7дигидроциклогепта[2,3-*f*]1*H*-2''-этил-3''-метилиндол 189а



Соединение было выделено в виде светло-бежевых кристаллов, выход 15% (7 мг, 0.02 ммоль).

Т.пл. 127 - 128 °С;

ИК: 3214, 3174, 29901, 1627, 1581, 1524 1426, 1246, 1175, 1138, 1093, 748 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.62 (c, 1H), 8.43 (д, *J* = 8.6 Гц, 1H), 7.27 (c, 1H), 7.21 (c, 1H), 6.74 (c, 1H), 4.57 – 4.66 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.41 (c, 3H), 2.69 (кв, *J* = 7.5 Гц, 2H), 2.42 – 2.48 (м, 1H), 2.14 (c, 3H), 2.01 – 2.13 (м, 2H), 1.89 (c, 3H), 1.79 – 1.86 (м, 1H), 1.22 (т, *J* = 7.5 Гц, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.03, 151.59, 150.47, 140.60, 136.98, 134.78, 134.57, 133.04, 127.28, 126.37, 124.08, 118.42, 107.81, 104.79, 103.98, 60.57, 60.38, 55.81, 48.35, 39.52, 38.74, 30.34, 22.74, 18.87, 14.31, 8.36.

МАLDI (положит. режим): 422,2 (100%), 379,2 (47%), 364,2 (37%), 334,2 (27%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₅H₃₀N₂O₄: C, 71.07; H, 7.16, найдено: C, 70.81; H, 7.45.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ -36 (c 0.97, CHCl₃)

1',2',3'-Триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(a*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2, 3-*e*]1*H*-2''-этил-3''-метилиндол 189b



Соединение было выделено в виде белых кристаллов, выход 48% (21 мг, 0.05 ммоль).

Т.пл. 110 - 112 °С;

ИК: 3404, 3056, 2978, 2934, 1684, 1635, 1508, 1456, 1244, 1093, 739 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.72 (c, 1H), 7.17 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 7.00 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 6.83 (c, 1H), 5.94 (т, *J* = 7.6 Гц, 1H), 5.86 (d, *J* = 7.8 Гц, 1H), 3.85 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.38 (c, 3H), 2.70 (кв, *J* = 7.5 Гц, 2H), 2.42 (c, 3H), 1.87 – 1.99 (м, 2H), 1.68 – 1.82 (м, 2H), 1.45 (c, 3H), 1.04 (т, *J* = 7.5 Гц, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 166.95, 151.64, 150.16, 140.95, 135.29, 134.70, 133.50, 131.89, 127.67, 125.78, 124.65, 123.43, 108.65, 108.60, 105.26, 60.64, 59.60, 55.83, 45.81, 33.87, 29.26, 21.66, 17.80, 13.23, 7.29.

MALDI (положит. режим): 422,2 (100%), 406,2 (73%), 379,2 (51%), 364,2 (45%), 334,2 (34%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₅H₃₀N₂O₄: C, 71.07; H, 7.16, найдено: C, 70.87; H, 7.34.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ +45 (c 1.02, CHCl₃).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(a*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*f*]1*H*-3''-изопропил-2''-метилиндол 190а



Соединение было выделено в виде бежевого порошка, выход 25% (12 мг, 0.03 ммоль).

Т.пл. 109 - 110 °С;

ИК: 3263, 3209, 2934, 1652, 1596, 1456, 1404, 1283, 1270, 1101, 1088, 733 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.58 (c, 1H), 8.41 (д, *J* = 8.6 Гц, 1H), 7.48 (c, 1H), 7.19 (c, 1H), 6.74 (c, 1H), 4.57 – 4.62 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.48 (c, 3H), 3.09 – 3.15 (м, 1H), 2.48 – 2.44 (м, 1H), 2.32 (c, 3H), 2.10 – 2.15 (м, 2H), 1.88 (c, 3H), 1.81 – 1.86 (м, 1H), 1.35 (т, *J* = 7.0 Гц, 3H), 1.30 (т, *J* = 7.0 Гц, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.48, 152.50, 150.35, 140.58, 140.19, 134.87, 133.97, 132.73, 129.46, 127.03, 126.03, 125.18, 124.39, 123.04, 108.10, 60.69, 60.61, 55.90, 49.60, 38.60, 34.02, 30.35, 30.11, 28.52, 22.72.

МАLDI (положит. режим): 436,2 (100%), 422,2 (87%), 393,2 (42%), 378,2 (33%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₆H₃₂N₂O₄: C, 71.53; H, 7.39, найдено: C, 71.29; H, 7.73.

[α]_D²⁰ -27 (c 1.15, CHCl₃)

1',2',3'-Триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(a*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*e*]1*H*-3''-изопропил-2''-метилиндол 190b



Соединение было выделено в виде бежевых кристаллов, выход 39% (18 мг, 0.04 ммоль).

Т.пл. 107 - 109 °С;

ИК: 3303, 3271, 2978, 2936, 1657, 1616, 1525, 1397, 1231, 1142, 744 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 10.57$ (c, 1H), 7.24 (д, J = 7.4 Гц, 1H), 7.17 (д, J = 7.6 Гц, 1H), 6.79 (c, 1H), 5.97 (д, J = 4.1 Гц, 1H), 5.64 – 5.71 (м, 1H), 3.84 (c, 3H), 3.48 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.07 – 3.17 (м, 1H), 2.30 (c, 3H), 2.05 – 2.25 (м, 2H), 1.96 – 2.05 (м, 1H), 1.88 (c, 3H), 1.77 – 1.87 (м, 1H), 0.94 (т, J = 6.6 Гц, 6H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 172.17, 168.16, 157.57, 155.10, 149.49, 136.73, 133.94, 131.31, 129.86, 129.22, 128.88, 122.67, 118.22, 112.45, 108.36, 54.95, 52.35, 50.52, 46.85, 42.26, 38.60, 34.02, 34.01, 23.02, 21.19.

MALDI (положит. режим): 436,2 (100%), 393,2 (37%), 378,2 (32%), 348,2 (25%), 420,2 (16%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₆H₃₂N₂O₄: C, 71.53; H, 7.39, найдено: C, 71.34; H, 7.76.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ +56 (c 0.97, CHCl₃).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*H*-(а*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7дигидроциклогепта[2,3-*f*]1*H*-2''-метил-3''-пропилиндол 191а



Соединение было выделено в виде белых кристаллов, выход 19% (9 мг, 0.02 ммоль).

Т.пл. 115 - 118 °С;

ИК: 3274, 3263, 2928, 2864, 1653, 1629, 1406, 1211, 1107, 759 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.61 (c, 1H), 8.42 (д, *J* = 8.6 Гц, 1H), 7.31 (c, 1H), 7.19 (c, 1H), 6.74 (c, 1H), 4.57 – 4.64 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.43 (c, 3H), 2.43 – 2.48 (м, 1H), 2.30 (c, 3H), 2.03 – 2.13 (м, 2H), 1.88 (c, 3H), 1.81 – 1.86 (м, 1 H, H-6), 1.26 – 1.32 (м, 4H), 0.84 (т, *J* = 3.6 Гц, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 172.20, 151.62, 150.44, 140.62, 134.88, 134.80, 134.77, 133.03, 126.31, 126.19, 123.99, 118.58, 111.94, 107.85, 104.91, 60.58, 60.44, 57.84, 55.84, 34.01, 31.26, 22.91, 22.76, 17.04, 16.14, 13.84.

MALDI (положит. режим): 436,2 (100%), 420,2 (79%), 393,2 (42%), 406,2 (18%), 379,2 (10%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₆H₃₂N₂O₄: C, 71.53; H, 7.39, найдено: C, 71.27; H, 7.80.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ -42 (c 0.86, CHCl₃).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(а*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*e*]1*H*-2''-метил-3''-пропилиндол 191b



Соединение было выделено в виде белых кристаллов, выход 38% (18 мг, 0.04 ммоль).

Т.пл. 102 - 104 °С;

ИК: 3295, 3270, 2935, 1652, 1641, 1549, 1428, 1273, 1141, 1042, 740 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 10.78$ (c, 1H), 7.17 (д, J = 8.3 Гц, 1H), 6.98 (д, J = 8.3 Гц, 1H), 6.82 (c, 1H), 5.82 (д, J = 6.8 Гц, 1H), 5.75 (т, J = 7.1 Гц, 1H), 3.85 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.40 (c, 3H), 2.55 – 2.64 (м, 1H), 2.41 – 2.46 (м, 1H), 2.30 (c, 3H), 2.16 – 2.27 (м, 2H), 1.46 (c, 3H), 1.32-1.37 (м, 4H), 0.87 (т, J = 6.5 Гц, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 172.17, 166.99, 151.68, 150.12, 140.96, 136.30, 135.23, 135.03, 131.26, 127.74, 124.73, 123.57, 112.15, 109.01, 108.53, 60.66, 59.71, 57.85, 55.87, 45.93, 34.02, 28.52, 22.94, 22.76, 16.63, 14.01.

MALDI (положит. режим): 436,2 (100%), 378,2 (51%), 393,2 (47%), 348,2 (34%), 406,2 (8%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₆H₃₂N₂O₄: C, 71.53; H, 7.39, найдено: C, 71.38; H, 7.44.

 $[\alpha]_{D}^{20} + 34$ (c 0.67, CHCl₃).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(а*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*f*]1*H*-3''-этил-2''-пропилиндол 192а



Соединение было выделено в виде белых кристаллов, выход 19% (9 мг, 0.02 ммоль).

Т.пл. 102 - 104 °С;

ИК: 3273, 3264, 2934, 1652, 1549, 1426, 1404, 1236, 1087, 732 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.56 (c, 1H), 8.44 (d, *J* = 7.7 Гц, 1H), 7.32 (c, 1H), 7.18 (c, 1H), 6.73 (c, 1H), 4.53 – 4.61 (м, 1H), 3.81 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.44 (c, 3H), 2.57 – 2.68 (м, 4H), 1.94 – 2.21 (м, 4H), 1.87 (c, 3H), 1.60 – 1.68 (м, 2H), 1.11 – 1.16 (м, 3H), 0.89 – 0.94 (м, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 172.20, 168.10, 151.62, 150.44, 140.62, 134.88, 134.80, 133.03, 126.31, 126.19, 123.99, 118.58, 111.94, 107.85, 104.91, 60.58, 60.44, 55.84, 49.59, 46.84, 42.26, 34.01, 28.51, 22.91, 13.84, 22.76, 16.14.

MALDI (положит. режим): 450,2 (100%), 434,2 (88%), 422,2 (63%), 393,2 (41%), 407,2 (35%), 362,2 (19%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₇H₃₄N₂O₄: C, 71.97; H, 7.61, найдено: C, 71.73; H, 7.94.

[α]_D²⁰ -35 (c 1.02, CHCl₃).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(а*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*e*]1*H*-3''-этил-2''-пропилиндол 192b



Соединение было выделено в виде светло-бежевых кристаллов, выход 38% (18 мг, 0.04 ммоль).

Т.пл. 97 - 99 °С;

ИК: 3390, 3366, 3342, 2957, 1653, 1597, 1456, 1238, 1098, 1004, 744 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.60 (c, 1H), 7.65 (д, *J* = 4.3 Гц, 1H), 7.16 (д, *J* = 4.1 Гц, 1H), 6.71 (c, 1H), 6.58 (д, *J* = 10.5 Гц, 1H), 6.09 (дт, *J* = 10.6, 5.3 Гц, 1H), 3.79 (c, 3H), 3.69 (c, 3H), 3.27 (c, 3H), 2.61 – 2.66 (м, 4H), 1.61 – 1.69 (м, 4H), 1.18 (c, 3H), 1.11 – 1.13 (м, 2H), 0.88 – 0.93 (м, 6H).
¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 172.17, 166.99, 151.68, 150.12, 140.96, 136.30, 135.23, 135.03, 131.26, 127.74, 124.73, 123.57, 109.01, 112.15, 108.53, 60.66, 59.71, 55.87, 52.35, 46.85, 34.02, 30.35, 28.52, 22.94, 22.76, 16.63, 14.01.

MALDI (положит. режим): 450,2 (100%), 434,2 (97%), 418,2 (57%), 407,2 (42%), 392,2 (26%).

Элементный анализ: рассчитано дляС₂₇H₃₄N₂O₄: C, 71.97; H, 7.61, найдено: C, 71.86; H, 7.77.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ +50 (c 1.16, CHCl₃).

1',2',3'-Триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(a*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*f*]1*H*-2''-метил-3''-нонилиндол 193а



Соединение было выделено в виде светло-бежевого масла, выход 17% (9 мг, 0.02 ммоль).

ИК: 3389, 3333, 3258, 2934, 1651, 1598, 1490, 1405, 1314, 1193, 1141, 1001, 751 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.60 (c, 1H), 8.41 (д, *J* = 8.7 Гц, 1H), 7.30 (c, 1H), 7.18 (c, 1H), 6.74 (c, 1H), 4.56 – 4.63 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.42 (c, 3H), 2.30 (c, 3H), 2.21 – 1.98 (м, 3H), 1.88 (c, 3H), 1.78 – 1.86 (м, 1H), 1.49 – 1.57 (м, 4H), 1.19 – 1.34 (м, 12H), 0.83 (т, *J* = 5.9 Гц, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.45, 151.73, 150.55, 140.69, 134.94, 134.71, 132.93, 131.15, 126.88, 126.37, 124.14, 118.58, 110.52, 107.95, 104.88, 60.71, 60.49, 55.97, 52.34, 49.59, 34.01, 31.42, 31.26, 11.44, 30.64, 30.51, 30.34, 28.60, 28.51, 22.86, 22.27, 14.13.

MALDI (положит. режим): 520,1 (100%), 462,3 (93%), 504,3 (55%), 406,1 (51%), 477,3 (35%), 421,1 (27%).

Элементный анализ: рассчитано для C₃₂H₄₄N₂O₄: C, 73.81; H, 8.52, найдено: C, 73.66; H, 8.82.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ -49 (c 1.25, CHCl₃).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(а*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*e*]1*H*-2''-метил-3''-нонилиндол 193b



Соединение было выделено в виде светло-бежевого масла, выход 35% (19 мг, 0.04 ммоль).

ИК: 3322, 3288, 2937, 2690, 1684, 1602, 1456, 1275, 1138, 1093, 751 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 10.76 (c, 1H), 7.15 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 6.95 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 6.80 (c, 1H), 5.81 (д, *J* = 7.4 Γц, 1H), 5.71 (д, *J* = 7.4 Γц, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.75 (c, 3H),

3.38 (c, 3H), 2.51 – 2.61 (м, 2H), 2.37 – 2.46 (м, 2H), 2.28 (c, 3H), 1.51 – 1.59 (м, 4H), 1.44 (c, 3H), 1.13 – 1.42 (м, 12H), 0.83 (т, *J* = 4.4 Гц, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 161.71, 157.90, 150.99, 139.96, 134.20, 133.98, 132.19, 130.41, 126.14, 125.63, 123.40, 117.74, 109.78, 107.22, 103.14, 60.27, 59.76, 55.23, 51.60, 48.85, 30.68, 30.52, 29.90, 29.61, 27.86, 27.77, 22.12, 21.53, 13.39, 10.70.

MALDI (положит. режим): 520,3 (100%), 462,3 (98%), 505,3 (57%), 406,1 (43%), 477,3 (36%).

Элементный анализ. Рассчитано для C₃₂H₄₄N₂O₄: C, 73.81; H, 8.52. Найдено: C, 73.49; H, 8.79.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ +29 (c 0.48, CHCl₃).

Метилированные пирролоаллоколхициноиды 194а и 194b



Соединения **188a** или **188b** (30 мг, 0.07 ммоль, 1 экв.) и гидрид натрия (60% в минеральном масле) (12 мг, 0.29 ммоль, 3.5 экв.) растворили в сухом ТГФ (10 мл) при 0 °С, далее метилиодид (31 мг, 0.22 ммоль, 3 экв.) был добавлен к смеси. Реакцию проводили при 0 °С в течение 2 ч, затем температуру подняли до 65 °С и перемешивал в течение 12 часов. Растворитель удалили при пониженном давлении. Продукт был выделен методом колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир – EtOAc – EtOH 6:1:1).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*H*-(a*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7дигидроциклогепта[2,3-*f*]1*H*-2'',3''-диметил-N-метилиндол (194а)

Соединение было выделено в виде белого порошка (20 мг, 0.05 ммоль), выход 67%. **Т.п.** = 122 - 124 °C;

ИК: 3295, 2925, 1480, 1462, 1456, 1452, 1318, 1137, 1103, 1098, 1085 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.40$ (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.30 (c, 1H), 7.27 (c, 1H), 6.75 (c, 1H), 4.73 – 4.59 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.65 (c, 3H), 3.50 (c, 3H), 2.41 – 2.48 (м, 1H), 2.33 (c, 3H), 2.17 (c, 3H), 2.00 – 2.08 (м, 1H), 1.92 (c, 3H), 1.75 – 1.87 (м, 2H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.33, 151.69, 150.49, 140.62, 135.56, 134.79, 133.13, 132.76, 126.40, 126.20, 124.37, 118.53, 107.88, 104.95, 103.04, 69.82, 60.63, 60.38, 55.84, 48.38, 30.34, 29.43, 22.88, 9.92, 8.80.

MALDI (положит. режим): 422,2 (100%), 408,2 (79%), 379,2 (55%), 364,2 (39%), 406,2 (24%), 360,2 (18%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₅H₃₀N₂O₄: C, 71.07; H, 7.16, найдено: C, 71.19; H, 7.32.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ -41 (c 0.51, CHCl₃).

1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*Н*-(a*R*,1*S*)1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта[2,3-*e*]1*H*-2'',3''-диметил-N-метилиндол 194b

Соединение выделено в виде белых кристаллов (28 мг, 0.07 ммоль), выход 94%.

Т.пл. 147 - 149 °С;

ИК: 3307, 2918, 1669, 1455, 1445, 1398, 1321, 1116, 1090, 788, 736 см⁻¹.

¹**H ЯМР** (400 МГц, CD₃OD): δ = 7.24 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.18 (д, *J* = 8.4 Гц, 1H), 6.82 (с, 1H), 6.13 (т, *J* = 7.2 Гц, 1H), 6.07 (д, *J* = 7.7 Гц, 1H), 3.91 (с, 3H), 3.88 (с, 3H), 3.65 (с, 3H), 3.50 (с, 3H), 2.52 – 2.58 (м, 1H), 2.51 (с, 3H), 2.38 – 2.48 (м, 2H), 2.36 (с, 3H), 2.21 – 2.31 (м, 1H), 1.57 (с, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, CD₃OD): δ = 170.70, 153.69, 151.84, 142.71, 137.99, 134.85, 132.53, 129.36, 126.74, 137.45, 126.44, 124.99, 109.59, 108.19, 106.92, 61.66, 60.77, 56.57, 48.51, 41.69, 31.61, 29.82, 22.84, 12.72, 9.98.

MALDI (положит. режим): 422,2 (100%), 379,2 (52%), 363,2 (36%), 408,2 (29%), 406,2 (13%).

Элементный анализ: рассчитано для C₂₅H₃₀N₂O₄: C, 71.07; H, 7.16, найдено: C, 71.23; H, 7.02.

 $[\alpha]_{D}^{20}$ +74 (c 0.43, CHCl₃).

4. Синтез аллоколхициноидов III

Синтез колхицеина 93 и иодо-колхинола 74 был описан ранее.

Общая методика синтеза фураноаллоколхициноидов 197

Иодоколхинол 74 (100.0 мг, 0.21 ммоль), Pd(OAc)₂, (2.3 мг, 0.01 ммоль), CuI (3.9 мг, 0.02 ммоль), PPh₃ (8.1 мг, 0.03 ммоль) и AcOK (60.6 мг, 0.62 ммоль) поместили в колбу Шленка, заполнили колбу аргоном. В случае соединений XX и XX вместо ацетата калия использовали фосфат калия (131.1 мг, 0.62 ммоль). Свежеперегнанный ацетонитрил (4 мл) и соответствующий алкин (0.25 ммоль) добавили к смеси в инертной атомосфере. Реакцию проводили при последовательном нагревании с 60 °C в течение 1–1.5 ч. до 80 °C до завершения реакции (ТСХ контроль). Далее растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле.

N-((7S)-1,2,3-триметокси-10-фенил-6,7-дигидро-5H-бензо[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197а



Соединение выделено в виде желто-коричневого порошка с выходом 86%. Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (5:1:1)

Т.пл. = 140 - 141 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.50 (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.93 (c, 1H), 7.91 (c, 1H), 7.57 (c, 2H), 7.52 (т, J = 7.7 Гц, 2H), 7.44 (c, 1H), 7.41 (т, J = 7.3 Γц, 1H), 6.81 (c, 1H), 4.66 – 4.59 (м, 1H), 3.85 (c, 3H), 3.80 (c, 3H), 3.46 (c, 3H), 2.18 (тд, J = 12.1, 5.8 Гц, 2H), 2.13 – 2.00 (м, 2H), 1.93 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 168.45, 155.10, 153.72, 152.34, 150.39, 140.61, 138.24, 134.77, 129.89, 129.27, 129.05, 128.71, 127.00, 124.63, 124.54, 121.96, 108.05, 105.75, 102.03, 60.59, 60.53, 55.83, 48.50, 38.35, 30.68, 30.05, 22.71.

Масс-спектр (DSQ, 70 eV): m/z (%) = 367, 383, 398, 457

N-((7S)-1,2,3-триметокси-10-(α-пиридил)-6,7-дигидро-5H-бензо[6,7]циклогепта-[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197b



Соединение выделено в виде коричневого порошка с выходом 83%. Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (4:1:1)

Т.пл. = 138 - 140 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.69 (д, J = 4.7 Гц, 1H), 8.51 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 7.96 (д, J = 3.6 Гц, 2H), 7.65 (с, 1H), 7.60 (д, J = 4.9 Гц, 2H), 7.41 (дд, J = 8.9, 4.5 Гц, 1H), 6.81 (с, 1H), 4.66 – 4.60 (м, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.81 (с, 3H), 3.46 (с, 3H), 2.26 – 1.95 (м, 4H), 1.93 (с, 3H). ¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 168.47, 154.76, 154.10, 152.38, 150.40, 150.00, 148.32, 140.61, 139.20, 137.35, 134.76, 129.53, 126.56, 124.43, 123.43, 122.64, 119.40, 108.06, 105.97, 104.87, 60.60, 60.56, 55.83, 48.57, 38.23, 30.01, 22.70.

Масс-спектр (DSQ, 70 eV): m/z (%) = 368, 384, 399, 458

N-((78)-1,2,3-триметокси-10-гидроксиметил-6,7-дигидро-5H-бензо-[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197с



Соединение выделено в виде желтого кристаллического порошка с выходом 84%. Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (3:1:1)

Т.пл. = 110 – 111 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.47 (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.51 (c, 1H), 7.46 (c, 1H), 6.79 (c, 1H), 6.75 (c, 1H), 5.44 (c, 1H), 4.64 – 4.58 (м, 1H), 4.56 (c, 2H), 3.84 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.42 (c, 3H), 2.16 (дд, J = 12.2, 6.3 Гц, 1H), 2.05 (дд, J = 12.6, 6.8 Гц, 1H), 1.90 (c, 3H).

¹³**С ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 168.39, 158.42, 153.73, 152.23, 150.37, 140.59, 137.42, 134.75, 128.69, 126.18, 124.73, 121.81, 108.01, 105.52, 103.21, 60.59, 60.45, 56.22, 54.91, 48.40, 38.37, 30.05, 22.67.

Масс-спектр (DSQ, 70 eV): m/z (%) = 321, 337, 352, 411

N-((7S)-1,2,3-триметокси-10-(2-гидроксиэтил)-6,7-дигидро-5H-бензо-[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197d



Соединение выделено в виде желтого кристаллического порошка с выходом 74%. Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (4:1:1) Т.пл. = 125 – 127 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.43 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 7.45 (c, 1H), 7.42 (c, 1H), 6.78 (c, 1H), 6.62 (c, 1H), 4.81 (т, J = 5.4 Гц, 1H), 4.63 – 4.56 (м, 1H), 3.84 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.78 – 3.73 (м, 2H), 3.41 (c, 3H), 2.91 (т, J = 6.6 Гц, 2H), 2.27 – 2.10 (м, 2H), 2.04 (дт, J = 13.2, 7.4 Гц, 2H), 1.90 (c, 3H).

¹³**С ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 168.37, 156.91, 153.46, 152.18, 150.36, 140.59, 136.65, 134.75, 128.49, 126.69, 124.85, 121.21, 107.99, 105.25, 102.91, 60.60, 60.48, 59.03, 55.80, 48.38, 38.41, 31.93, 30.06, 22.67.

Масс-спектр (DSQ, 70 eV): m/z (%) = 335, 351, 366, 425

N-((78)-1,2,3-триметокси-10-(ацетоксиметил)-6,7-дигидро-5H-бензо-[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197f



Соединение выделено в виде коричневого порошка с выходом 41%.

Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (6:1:1)

Т.пл. = 82 – 83 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.47 (д, *J* = 8.3 Гц, 1H), 7.56 (c, 1H), 7.49 (c, 1H), 6.99 (c, 1H), 6.79 (c, 1H), 5.22 (c, 2H), 4.58 (дд, *J* = 11.8, 7.5 Гц, 1H), 3.84 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.42 (c, 3H), 2.23 – 2.11 (м, 2H), 2.08 (c, 3H), 2.03 (дд, *J* = 12.7, 5.6 Γц, 2H), 1.91 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 169.95, 168.45, 153.95, 152.33, 152.12, 150.37, 140.60, 138.54, 134.74, 129.11, 125.70, 124.51, 122.29, 108.05, 107.03, 105.75, 60.59, 60.49, 57.95, 55.83, 48.50, 38.22, 22.66, 20.56.

Масс-спектр (DSQ, 70 eV): m/z (%) = 351, 363, 394, 453

Синтез метилового эфира ундецин-10-овой кислоты

Приготовили 0,6 мл 40% раствора NaOH. Охладили до 0°С. К охлажденному раствору щелочи прилили 1,7 мл метил-трет.-бутилового эфира. К полученной смеси порционно добавляли 283 мг N-нитрозометилмочевины, в результате чего эфирный слой приобретал насыщенный желтый оттенок. После прибавления всей N-нитрозометилмочевины, эфирный слой отделили от водного. К органическому слою добавили 200 мг ундецин-10-овой кислоты и оставили смесь на 1,5 часа. После протекания реакции (ТСХ контроль) удалили растворитель под вакуумом.

¹**Н ЯМР** (400 МГц, CDCl₃) δ 3.66 (c, 3H), 2.30 (т, *J* = 7.5 Гц, 2H), 2.17 (тд, *J* = 7.1, 2.6 Гц, 2H), 1.93 (т, *J* = 2.6 Гц, 1H), 1.64 – 1.59 (м, 2H), 1.54 – 1.48 (м, 2H), 1.38 (дд, *J* = 8.6, 5.6 Гц, 2H), 1.31 (c, 6H).

¹³C **ЯМР** (101 МГц, CDCl₃) δ 174.43, 84.86, 68.23, 51.59, 34.23, 29.24, 29.22, 29.04, 28.80, 28.58, 25.06, 18.53.

N-((78)-1,2,3-триметокси-10-(8-(метоксикарбонил)октил))-6,7-дигидро-5Hбензо-[6,7]цикло-гепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197g



Соединение выделено в виде коричневого масла с выходом 49%.

Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (5:1:1)

¹**Н ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.42 (д, *J* = 8.5 Гц, 1Н), 7.44 (с, 1Н), 7.42 (с, 1Н), 6.78 (с, 1H), 6.57 (с, 1H), 4.63 – 4.54 (м, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.79 (с, 3H), 3.57 (с, 3H), 3.42 (с, 3H), 2.75 (т, *J* = 7.4 Гц, 2H), 2.15 (тд, *J* = 12.0, 5.8 Гц, 2H), 2.07 – 1.99 (м, 1H), 1.89 (д, *J* = 6.2 Гц, 3H), 1.86 (дд, *J* = 12.7, 5.7 Гц, 1H), 1.68 (дд, *J* = 14.3, 7.1 Гц, 2H), 1.54 – 1.47 (м, 2H), 1.41 – 1.18 (м, 10H).

¹³**С ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 173.35, 168.36, 159.13, 153.46, 152.18, 150.36, 140.58, 136.61, 134.76, 131.52, 128.80, 128.68, 128.49, 126.64, 124.84, 121.19, 107.99, 105.23, 101.97, 60.57, 60.46, 55.81, 51.14, 48.35, 33.25, 28.56, 28.50, 28.42, 27.69, 27.21, 24.41, 22.68. **Масс-спектр** (DSQ, 70 eV): m/z (%) = 492, 551

N-((7S)-1,2,3-триметокси-10-(N,N-диэтиламинометил)-6,7-дигидро-5H-бензо-[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197h



Соединение выделено в виде коричневого порошка с выходом 72%. Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (2:1:1)

Т.пл. = 148 – 150 °С

¹**Н ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.47 (д, *J* = 8.6 Гц, 1Н), 7.47 (д, *J* = 6.8 Гц, 2Н), 6.79 (с, 1H), 6.75 (с, 1H), 4.59 (дд, *J* = 6.9, 3.9 Гц, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.79 (с, 3H), 3.75 (с, 2H), 3.43 (с, 3H), 2.56 – 2.51 (м, 4H), 2.21 – 2.10 (м, 2H), 2.04 (дд, *J* = 12.5, 7.1 Гц, 2H), 1.90 (с, 3H), 1.03 (т, *J* = 7.1 Гц, 6H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 168.41, 156.02, 153.73, 152.22, 150.35, 140.57, 137.19, 134.76, 128.63, 126.17, 124.75, 121.55, 120.59, 108.02, 105.52, 104.90, 84.81, 62.78, 60.57, 60.51, 55.83, 48.90, 48.38, 46.47, 30.05, 22.70, 12.07.

Масс-спектр (DSQ, 70 eV): m/z (%) = 335, 394, 466

N-((7S)-1,2,3-триметокси-10-(1-гидроксиэтил)-6,7-дигидро-5H-бензо-[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197i



Соединение выделено в виде коричневого порошка с выходом 93%. Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (4:1:1)

Т.пл. = 80 – 82 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.46 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 7.50 (c, 1H), 7.45 (c, 1H), 6.79 (c, 1H), 6.70 (c, 1H), 5.51 (c, 1H), 4.84 (кв, J = 6.5 Гц, 1H), 4.63 – 4.55 (м, 1H), 3.84 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.41 (c, 3H), 2.16 (дт, J = 15.2, 4.7 Гц, 2H), 2.10 – 1.96 (м, 2H), 1.90 (c, 3H), 1.47 (д, J = 6.5 Гц, 3H).

¹³**С ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 168.43, 162.01, 153.48, 152.24, 150.39, 140.61, 137.24, 134.77, 128.65, 126.17, 124.79, 121.79, 108.03, 105.55, 101.22, 62.33, 60.60, 60.46, 55.83, 48.43, 38.39, 30.06 22.68, 22.03.

Масс-спектр (DSQ, 70 eV): m/z (%) = 335, 351, 366, 425

Синтез *N*-((78)-1,2,3-триметокси-10-(пирролидинометил)-6,7-дигидро-5H-бензо-[6,7]цикло-гепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197j



В колбу поместили 50 мг (0,103 ммоль) иод-колхинола 74, 35,1 мг (0,005 ммоль) $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, 1,92 мг (0,01 ммоль) CuI, заполнили колбу аргоном. Прилили 4 мл пирролидина и охладили до 0 °C при перемешивании. К охлажденному раствору добавляли по каплям 80% раствор пропаргилбромида в толуоле (14,6 мг пропаргилбромида, 13,7 мкл раствора). Реакционную смесь выдерживали при 50 °C. После окончания реакции к смеси добавили несколько мл H₂O дист., проэкстрагировали этилацетатом, органические слои промыли насыщенным раствором NaCl, высушили над Na₂SO₄. Растворитель отогнали при пониженном давлении. Продукт выделили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюент петролейный эфир-этилацетат-этанол в соотношении 3:1:1, далее этилацетат-этанол в соотношении 1:1. Продукт выделили в виде темно-желтых кристаллов с выходом 55% (31 мг)

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.60 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.48 (c, 2H), 6.78 (c, 1H), 6.74 (c, 1H), 4.61 – 4.56 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.76 (д, *J* = 3.7 Γц, 2H), 3.42 (c, 3H), 2.56 (c, 4H), 2.18 – 2.09 (м, 2H), 2.04 (дд, *J* = 12.4, 6.6 Γц, 2H), 1.90 (c, 3H), 1.71 (c, 4H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 168.43, 156.10, 153.66, 152.23, 150.36, 140.58, 137.33, 134.77, 128.67, 126.19, 124.75, 121.63, 108.02, 105.55, 104.28, 60.58, 60.50, 55.82, 53.29, 51.73, 51.59, 48.43, 42.53, 30.06, 23.33, 23.21, 22.68.

N-((7S)-1,2,3-триметокси-10-(1-гидроксициклопентил)-6,7-дигидро-5H-бензо-[6,7]цикло-гепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 197k



Соединение выделено в виде темно-желтого масла с выходом 86%. Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (6:2:1) ¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.42 (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.48 (c, 1H), 7.44 (c, 1H), 6.79 (c, 1H), 6.70 (c, 1H), 5.25 (c, 1H), 4.62 – 4.55 (м, 1H), 3.84 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.41 (c, 3H), 2.16 (тд, J = 12.1, 5.9 Гц, 2H), 2.05 (дд, J = 12.4, 6.5 Гц, 2H), 1.99 (c, 1H), 1.90 (c, 3H), 1.74 (дд, J = 12.2, 8.0 Гц, 3H), 1.68 – 1.55 (м, 1H), 1.47 (дд, J = 13.3, 7.9 Гц, 1H), 1.20 – 0.99 (м, 2H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 168.40, 163.40, 153.53, 152.21, 150.37, 140.61, 136.98, 134.76, 128.56, 126.32, 124.83, 121.61, 108.02, 105.49, 100.87, 78.09, 60.60, 60.45, 55.82, 48.42, 34.19, 30.05, 26.34, 24.78, 23.48, 22.68.

Элементный анализ: рассчитано для C₂₇H₃₁NO₆ C, 69.66; H, 6.71%, найдено C, 69.85; H, 6.64.

Синтез (*N*-(3-гидрокси-2-(2-триметилсилилэтинил)-9,10,11-триметокси-6,7дигидро -5*H*-дибензо[а,с]циклогептен-5-ил)-ацетамид) 1971



В колбу поместили 50 мг (0,103 ммоль) йод-колхинола 74, 2,5 мг (0,003 ммоль) бис(дифенилфосфино)ферроценпалладий дихлорида, 1,2 мг (0,006 ммоль) иодида меди. Колбу заполнили аргоном. Через септом прилили перегнанный ацетонитрил, диизопропилэтиламин (133 мг, 179 мкл), этинилтриметилсилан (13,1 мг, 18,8 мкл). Смесь перемешивали при 40 °C. После окончания реакции продукт выделили с помощью колоночной хроматографии, элюент: петролейный эфир-этилацетат-этанол в соотношении 3:1:1.Выход очищенного продукта составил 62%.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 9.95 (c, 1H), 8.37 (д, J = 8.1 Гц, 1H), 7.17 (c, 1H), 6.86 (c, 1H), 6.76 (c, 1H), 4.42 (дт, J = 14.9, 7.4 Γц, 1H), 3.82 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.42 (c, 3H), 2.16 – 1.98 (м, 4H), 1.87 (c, 3H), 0.21 (c, 9H).

5. Синтез алоколхициноидов IV

Синтез колхицеина 93 и иодо-колхинола 74 был описан выше.

Общая методика синтеза аллиловых эфиров иодо-колхинола 202a-d

В колбу Шленка поместили иодо-колхинол 74 (1 экв.) и сухой карбонат калия (3 экв.), заполнили колбу аргоном. К смеси прилили ДМФА и по каплям добавили соответствующий аллилбромид (2 экв.). Реакцию проводили в течение суток при 60 °С. После окончания реакции растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле. Полученные вещества представляли собой светло-желтые кристаллические порошки.

Аллиловый эфир иодоколхинола 202а



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (7 – 1 – 1). Соединение **198а** было выделено в виде светло-бежевых кристаллов с выходом 63%.

Т.пл. = 82 – 83 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ=8.40 (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.68 (c, 1H), 6.98 (c, 1H), 6.78 (c, 1H), 6.08 (ддд, J = 17.5, 10.5, 5.1 Гц, 1H), 5.56 (д, J = 17.2 Гц, 1H), 5.33 (д, J = 10.5 Гц, 1H), 4.66 (уш.с., 2H), 4.49 (дт, J = 12.0, 7.9 Гц, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.50 (c, 3H), 2.55 – 2.50 (м, 1H), 2.23 – 2.12 (м, 1H), 2.12 – 2.00 (м, 1H), 1.89 (c, 3H), 1.87 – 1.76 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ=168.48, 155.69, 152.46, 150.15, 142.51, 140.51, 139.43, 134.82, 133.20, 128.32, 122.85, 117.55, 108.20, 107.79, 83.24, 69.13, 60.60, 60.55, 55.82, 48.16, 38.39, 30.00, 22.64.

MALDI (DCTB, положит. режим): 523.1 (100%), 332.2 (29%), 242.3 (23%).

Элементный анализ: для C₂₃H₂₆INO₅ рассчитано: C, 52.78; H, 5.01; найдено: C, 52.55; H, 5.14.

Бутен-2-иловый эфир иодоколхинола 202b



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (7 – 1 – 1). Соединение **198b** было выделено в виде светло-бежевых кристаллов с выходом 71%. **Т.п.** = 124 - 126 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.40$ (д, J = 8.6 Гц, 1H), 7.66 (c, 1H), 6.95 (c, 1H), 6.78 (c, 1H), 5.95 (дт, J = 13.0, 6.5 Гц, 1H), 5.77 – 5.68 (м, 1H), 4.58 (дд, J = 3.0, 1.5 Гц, 2H), 4.52 – 4.45 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.50 (c, 3H), 2.56 – 2.51 (м, 1H), 2.21 – 2.11 (м, 1H), 2.10 – 2.00 (м, 1H), 1.90 – 1.88 (м, 3H), 1.88 – 1.81 (м, 1H), 1.77 – 1.72 (м, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.42, 155.82, 152.44, 150.13, 142.43, 140.50, 139.42, 134.81, 129.89, 128.15, 125.95, 125.38, 122.88, 108.20, 107.79, 83.33, 69.03, 60.61, 60.54, 55.82, 48.14, 38.46, 22.63, 17.63.

Элементный анализ: для C₂₄H₂₈INO₅ рассчитано: C, 53.64; H, 5.25; найдено: C, 53.57; H, 5.32.

3-Метилбутен-2-иловый эфир иодоколхинола 202с



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (8 – 1 – 1). Соединение **198с** было выделено в виде светло-бежевых кристаллов с выходом 64%. **Т.пл.** = 77 – 79 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.39$ (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.65 (c, 1H), 6.96 (c, 1H), 6.78 (c, 1H), 5.47 (т, J = 6.7 Гц, 1H), 4.62 (д, J = 6.5 Гц, 2H), 4.48 (дт, J = 12.0, 7.9 Гц, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.50 (c, 3H), 2.54 – 2.51 (м, 1H), 2.16 (дт, J = 12.1, 8.6 Гц, 1H), 2.10 – 2.01 (м, 1H), 1.88 – 1.80 (м, 1H), 1.88 (c, 3H), 1.77 (c, 3H), 1.76 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.47, 156.01, 152.44, 150.14, 142.46, 140.52, 139.42, 137.64, 134.83, 128.18, 122.91, 119.54, 108.21, 107.92, 83.57, 65.56, 60.61, 60.56, 55.83, 48.21, 38.36, 30.01, 25.50, 22.65, 18.16.

Элементный анализ: для C₂₅H₃₀INO₅ рассчитано: C, 54.45; H, 5.48; найдено: C, 54.56; H, 5.39.

Метил (*E*)-4-(((5*S*)-5-ацетамидо-2-иодо-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5Hдибензо[а,с][7]аннулен-3-ил)окси)бутен-2-оат 202d



Для синтеза данного соединения использовался ацетон в качестве растворителя. Реакцию проводили при $0 \rightarrow 20$ °C. Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (5 – 1 – 1). Соединение **198d** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 73%.

Т.пл. = 93 – 95 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.41$ (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.71 (c, 1H), 7.05 (c, 1H), 6.79 (c, 1H), 6.77 (дт, J = 6.0, 1.6 Гц, 1H), 5.13 (тд, J = 7.2, 6.1 Гц, 1H), 4.52 – 4.45 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.64 (c, 3H), 3.51 (c, 3H), 3.34 (д, J = 1.6 Гц, 1H), 3.32 (уш.с., 1H), 2.54 – 2.50 (м, 1H), 2.21 – 2.13 (м, 1H), 2.00 – 1.99 (м, 1H), 1.88 (c, 3H), 1.84 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 171.18, 168.53, 154.29, 152.69, 150.14, 142.92, 142.06, 140.51, 139.70, 134.84, 130.53, 122.48, 110.12, 108.24, 104.67, 83.55, 60.67, 60.56, 55.83, 51.67, 48.10, 38.28, 29.89, 29.40, 22.66.

Элементный анализ: для C₂₅H₂₈INO₇ рассчитано: C, 51.65; H, 4.85; найдено: C, 51.52; H, 4.69.

Общая методика синтеза дигидрофураноаллоколхициноидов 203

Аллиловый эфир иодо-колхинола (1 экв.), $Pd(dppf)Cl_2$ (0,05 экв.) и ацетат калия (3 экв.) поместили в колбу Шленка, заполнили ее аргоном и прилили ДМСО при инертной атмосфере. Реакцию проводили в течение 20 часов при температуре 80 °C. После окончания реакции к смеси добавили дистиллированную воду и полученную смесь экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над Na₂SO₄, растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле.

N-((7*S*)-1,2,3-триметокси-11-метилиден-6,7,10,11-тетрагидро-5H-бензо[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 203



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (8 – 1 – 1). Соединение **203а** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 88%.

Т.пл. = 198 – 200 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.37$ (д, J = 8.4 Гц, 1H), 7.41 (c, 1H), 6.86 (c, 1H), 6.77 (c, 1H), 5.46 (c, 1H), 5.14 (c, 2H), 5.02 (c, 1H), 4.51 – 4.43 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.48 (c, 3H), 2.19 – 1.99 (м, 3H), 1.87 (c, 3H), 1.85 – 1.78 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.38, 162.52, 152.19, 150.31, 143.89, 143.25, 140.56, 134.74, 126.57, 124.31, 123.61, 122.08, 108.03, 105.23, 99.63, 74.91, 60.55, 55.82, 48.50, 38.16, 29.94, 22.62.

Элементный анализ: для C₂₃H₂₅NO₅ рассчитано: C, 69.86; H, 6.37; найдено: C, 69.98; H, 6.48.

N-((7*S*)-1,2,3-триметокси-11-этилиден-6,7,10,11-тетрагидро-5H-бензо[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 203b



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (7 – 1 – 1). Соединение **203b** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 66%.

Т.пл. = 163 – 165 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.38$ (д, J = 8.6 Гц, 1H), 7.64 (c, 1H), 6.94 (c, 1H), 6.73 (c, 1H), 5.71 (кв, J = 6.5, 1H), 4.61 – 4.52 (м, 2H), 4.48 – 4.45 (м, 1H), 3.81 (c, 3H), 3.76 (c, 3H), 3.48 (c, 3H), 2.14 – 2.00 (м, 4H), 1.87 (c, 3H), 1.72 (д, J = 6.2 Гц, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.75, 159.16, 152.46, 150.75, 141.74, 140.99, 138.72, 135.20, 127.34, 126.56, 126.20, 125.06, 116.81, 108.51, 104.73, 76.19, 61.01, 60.95, 56.26, 48.69, 46.20, 38.94, 30.54, 23.08.

Элементный анализ: для C₂₄H₂₇NO₅ рассчитано: С, 70.40; Н, 6.65; найдено: С, 70.53; Н, 6.72

N-((*7S*)-1,2,3-триметокси-11-(1-метилэтилиден)-6,7,10,11-тетрагидро-5Hбензо[6,7]-циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамид 203с



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (7 - 1 - 1). Соединение **203с** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 66%. **Т.пл.** = 166 – 167 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.39$ (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.65 (c, 1H), 6.96 (c, 1H), 6.78 (c, 1H), 4.62 (д, J = 6.5 Гц, 2H), 4.52 – 4.44 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.50 (c, 3H), 2.21 – 2.01 (м, 3H), 1.88 (c, 3H), 1.86 – 1.83 (м, 1H), 1.76 (д, J = 7.8 Гц, 6H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.47, 156.01, 152.45, 150.15, 142.46, 140.52, 139.43, 137.65, 134.83, 128.18, 122.91, 119.54, 108.21, 107.93, 83.58, 65.57, 60.62, 60.56, 55.83, 48.21, 38.37, 30.01, 25.50, 22.65, 18.17.

Элементный анализ: для C₂₅H₂₉NO₅ рассчитано: С, 70.90; Н, 6.90; найдено: С, 71.03; Н, 6.95.

Метил 2-((7S)-7-ацетамидо-1,2,3-триметокси-6,7-дигидро-5H-бензо[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-11-ил)ацетат 203d



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (4 – 1 – 1). Соединение **203d** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 68%.

Т.пл. = 151 – 152 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, CD₃OD): δ = 7.72 (c, 1H), 7.62 (c, 1H), 7.46 (c, 1H), 6.77 (c, 1H), 4.77 (дд, J = 11.9, 6.5 Γц, 1H), 3.91 (c, 3H), 3.91 (c, 3H), 3.78 (д, J = 0.5 Hz, 2H), 3.73 (c, 3H), 3.49 (c, 3H), 2.57 – 2.52 (м, 1H), 2.35 – 2.22 (м, 2H), 2.05 (c, 3H), 1.99 – 1.92 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, CD₃OD): δ = 173.08, 172.48, 156.32, 154.11, 152.20, 144.49, 142.43, 138.67, 136.62, 130.48, 127.42, 126.51, 122.33, 114.81, 109.01, 106.67, 61.61, 61.44, 56.59, 52.60, 50.75, 39.83, 31.42, 30.04, 22.64.

Элементный анализ: для C₂₅H₂₇NO₇ рассчитано: C, 66.21; H, 6.00; найдено: C, 66.37; H, 6.18.

Синтез *N*-((7S)-1,2,3-триметокси-11-метил-6,7-дигидро-5H-бензо-[6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамида 203е



В колбу поместили колхициноид **203a** (100 мг, 1 экв. 0.253 ммоль) и прилили 5 мл трифторуксусной кислоты. Смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. После окончания реакции к смеси добавили насыщенный раствор NaHCO₃ до pH=8, проэкстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄, растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле. Колхициноид **203e** выделили в виде белого кристаллического порошка с выходом 98% (98 мг).

Т.пл. = 202-204 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.45$ (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.74 (д, J = 1.3 Гц, 1H), 7.48 (д, J = 5.1 Гц, 2H), 6.79 (c, 1H), 4.65 – 4.59 (м, 1H), 3.84 (c, 3H), 3.80 (c, 3H), 3.45 (c, 3H), 2.21 (д, J = 1.1 Γц, 3H), 2.19 – 2.11 (м, 1H), 2.06 – 1.98 (м, 2H), 1.90 (c 3H), 1.89 – 1.82 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.40, 154.00, 152.28, 150.38, 141.94, 140.60, 137.67, 134.75, 128.54, 126.78, 124.74, 120.36, 115.19, 108.00, 105.78, 60.59, 60.57, 55.83, 48.37, 39.52, 38.44, 30.69, 22.71.

Элементный анализ: для C₂₃H₂₅NO₅ рассчитано: С, 69.86; Н, 6.37; найдено: С, 69.98; Н, 6.51.

Синтез *N*-((7S)-1,2,3-триметокси-6,7-дигидро-5H,10H-спиро[бензо[6,7]циклогепта[1,2-*f*]-бензофуран-11,2'-оксиран]-7-ил)ацетамида 204



В колбу Шленка поместили колхициноид 203а (1 экв., 300 мг, 0.76 ммоль) и метахлорпербензойную кислоту (70%) (1.6 экв., 301 мг, 1,2 ммоль). Колбу заполнили аргоном, добавили свежемерегнанный хлороформ. Реакцию приводили при постепенном нагреве реакционной смеси от -50 °C дл комнатной температуры. Реакцию проводили в течение 20 часов. После окончания реакции растворитель удалили, продукт выделили методом колоночной хроматографии. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол 6:1:1. Соединение выделено в виде желтого порошка (смесь двух диастереомеров). Выход продукта составил 54%.

Т.пл. = 143 – 145 °С (смесь диастереомеров)

¹**Н ЯМР** (диастереомер 1) (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 8.41 (д, *J* = 5.1 Гц, 1Н), 7.32 (с, 1Н), 7.14 (с, 1Н), 6.79 (с, 1Н), 4.50 (с, 2Н), 4.09 – 3.95 (м, 1Н), 3.84 (с, 3Н), 3.79 (с, 3Н), 3.53 (с, 2Н), 3.48 (с, 3Н), 2.21 – 2.12 (м, 2Н), 2.09 – 2.01 (м, 2Н), 1.88 (с, 3Н).

¹**Н ЯМР** (диастереомер 2) (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 8.42 (д, *J* = 4.5 Гц, 1H), 7.37 (с, 1H), 7.13 (с, 1H), 6.79 (с, 1H), 4.50 (с, 2H), 4.09 – 3.95 (м, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.53 (с, 2H), 3.48 (с, 3H), 2.21 – 2.12 (м, 2H), 2.09 – 2.01 (м, 2H), 1.88 (с, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 178.15, 168.54, 152.50, 152.10, 150.35, 141.61, 140.60, 134.81, 126.97, 125.39, 123.91, 108.14, 105.22, 60.68, 60.60, 55.87, 48.42, 38.47, 37.72, 30.97, 29.95, 22.64, 22.08.

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 178.10, 168.56, 152.50, 152.10, 150.25, 141.54, 140.55, 134.79, 126.81, 125.39, 123.79, 108.06, 105.17, 60.65, 60.54, 55.83, 48.39, 38.39, 37.75, 30.97, 30.03, 22.63, 22.08.

Синтез *N*-((7S)-11-(гидроксиметил)-1,2,3-триметокси-6,7,10,11-тетрагидро-5Hбензо- [6,7]циклогепта[1,2-f]бензофуран-7-ил)ацетамида 205



Субстрат XX (3 экв., 50 мг, 0.126 ммоль) поместили в колбу Шленка, заполнили ее аргоном, прилили свежеперегнанный ТГФ. Колбу охладили до 0 °С. К охлажденному

раствору прикапывали раствор ВН₃*ТГФ (1 экв., 84 мкл, 0.042 экв.). Далее смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем опять охладили до 0 °С и добавили к смеси раствор гидроксида натрия (1,1 экв. 40 мкл) и 30% перекиси водорода. После окончания реакии растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол 6:1:1. Выход продукта составил 54%.

Т.пл. = 155 – 157 °С

¹**Н ЯМР** (диастереомер 1) (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 8.42 (д, *J* = 3.2 Гц, 1Н), 7.32 (с, 1Н), 7.14 (с, 1Н), 6.81 (с, 1Н), 4.56 – 4.49 (м, 1Н), 4.09 – 3.97 (м, 1Н), 3.88 – 3.84 (м, 2Н), 3.83 (с, 3Н), 3.78 (с, 3Н), 3.52 (с, 3Н), 3.49 (д, *J* = 5.4 Гц, 2Н), 2.56 – 2.52 (м, 1Н), 2.22 – 2.17 (м, 1Н), 2.09 – 2.01 (м, 2Н), 1.88 (с, 3Н).

¹**Н ЯМР** (диастереомер 2) (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 8.44 (д, *J* = 3.2 Гц, 1Н), 7.31 (с, 1Н), 7.13 (с, 1Н), 6.79 (с, 1Н), 4.56 – 4.49 (м, 1Н), 4.11 – 3.98 (м, 1Н), 3.87 – 3.81 (м, 2Н), 3.83 (с, 3Н), 3.80 (с, 3Н), 3.52 (с, 3Н), 3.49 (д, *J* = 5.4 Гц, 2Н), 2.56 – 2.52 (м, 1Н), 2.22 – 2.17 (м, 1Н), 2.09 – 2.01 (м, 2Н), 1.88 (с, 3Н).

¹³**С ЯМР** (диастереомер 1) (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.33, 159.22, 151.95, 150.35, 141.00, 140.59, 134.78, 126.06, 125.98, 125.67, 124.68, 107.89, 104.01, 74.54, 63.98, 63.58, 60.48, 55.80, 48.25, 44.18, 30.13, 29.21, 22.64.

¹³**С ЯМР** (диастереомер 2) (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.32, 159.28, 152.01, 150.34, 140.96, 140.51, 134.75, 126.04, 126.00, 125.78, 124.89, 108.04, 103.94, 74.29, 63.98, 63.58, 60.57, 55.84, 48.41, 44.23, 30.00, 29.21, 22.65.

Общая методика синтеза акриловых эфиров иодо-колхинола 198

В колбу Шленка поместили иодо-колхинол 74 (1 экв.), α,β-ненасышенную карбоновую кислоту (1 экв.), 4-DMAP (0,1 экв.) и дициклогексилкарбодиимид (1,2 экв.). Колбу заполнили инертным газом и прилили свежеперегнанный дихлорометан. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 16 часов. После окончания реакции растворитель удалили при пониженном давлении, а продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле.

Эфир иодоколхинола и акриловой кислоты 198а



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (5 – 1 – 1). Соединение **198d** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 87%. **Т.п.** = 139 – 141 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.38$ (д, J = 8.5 Гц, 1H), 7.77 (c, 1H), 7.17 (c, 1H), 6.82 (c, 1H), 6.64 (дд, J = 17.2, 1.0 Гц, 1H), 6.48 (дд, J = 17.2, 10.4 Гц, 1H), 6.25 (дд, J = 10.4, 1.0 Гц, 1H), 4.55 – 4.45 (м, 1H), 3.85 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.56 (c, 3H), 2.58 – 2.52 (м, 1H), 2.21 – 2.13 (м, 1H), 2.11 – 2.03 (м, 1H), 1.93 – 1.87 (м, 1H), 1.86 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.50, 163.31, 152.99, 150.16, 149.71, 142.65, 140.48, 139.53, 134.90, 134.49, 133.64, 127.44, 122.15, 117.97, 108.22, 88.09, 60.78, 60.55, 55.86, 47.91, 38.30, 33.35, 22.64.

Элементный анализ: для C₂₃H₂₄INO₆ рассчитано: C, 51.41; H, 4.50; найдено: C, 51.53; H, 4.64.

Эфир иодоколхинола и кротоновой кислоты 198b



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (8 – 1 – 1). Соединение **198b** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 68%.

Т.пл. = 130 – 131 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.38$ (д, J = 8.1 Гц, 1H), 7.76 (c, 1H), 7.23 (дд, J = 15.4, 6.9 Гц, 1H), 7.13 (c, 1H), 6.82 (c, 1H), 6.21 (д, J = 15.5 Гц, 1H), 4.57 – 4.42 (м, 1H), 3.85 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.56 (c, 3H), 2.60 – 2.53 (м, 1H), 2.19 (дд, J = 11.6, 6.2 Гц, 1H), 2.09 (дд, J = 12.3, 7.2 Гц, 1H), 1.99 (д, J = 6.7 Гц, 3H), 1.92 – 1.86 (м, 1H), 1.85 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.47, 163.34, 152.96, 150.16, 149.88, 148.80, 142.55, 140.48, 139.45, 134.89, 133.45, 122.19, 121.27, 118.05, 108.22, 88.30, 60.77, 60.54, 55.85, 47.88, 38.30, 29.85, 22.63, 18.06.

Элементный анализ: для C₂₄H₂₆INO₆ рассчитано: C, 52.28; H, 4.75; найдено: C, 52.40; H, 4.53.

Эфир иодоколхинола и 3-метилбутен-2-овой кислоты 198с



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (8 – 1 – 1). Соединение **198с** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 77%.

Т.пл. = 118 – 120 °С.

¹**Н ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 8.37 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.75 (с, 1H), 7.11 (с, 1H), 6.81 (с, 1H), 6.05 (с, 1H), 4.50 (дд, *J* = 19.3, 8.0 Гц, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.79 (с, 3H), 3.55 (с, 3H), 2.55 (дд, *J* = 12.6, 5.5 Гц, 1H), 2.20 (с, 3H), 2.19 – 2.12 (м, 1H), 2.12 – 2.04 (м, 1H), 2.02 (с, 3H), 1.89 (д, *J* = 12.1 Гц, 1H), 1.85 (с, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.46, 163.31, 161.63, 152.93, 150.16, 149.92, 142.46, 140.48, 139.39, 134.89, 133.30, 122.25, 118.16, 114.35, 108.22, 88.61, 60.76, 60.54, 55.85, 47.86, 38.32, 33.34, 27.14, 22.63, 20.32.

Элементный анализ: для C₂₅H₂₈INO₆ рассчитано: С, 53.11; Н, 4.99; найдено: С, 53.24; Н, 4.86.



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (9 – 1 – 1). Соединение **198d** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 72%.

Т.пл. = 115 – 117 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.38$ (д, J = 8.2 Гц, 1H), 7.78 (c, 1H), 7.45 (дд, J = 15.9, 6.7 Гц, 1H), 7.23 (c, 1H), 7.08 (дд, J = 15.9, 2.1 Гц, 1H), 6.82 (c, 1H), 4.48 (дт, J = 12.0, 7.7 Гц, 1H), 3.85 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.56 (c, 3H), 2.56 (дд, J = 12.4, 5.4 Гц, 1H), 2.18 (дд, J = 12.3, 6.4 Гц, 1H), 2.09 (дд, J = 12.8, 6.7 Гц, 1H), 1.91 (дд, J = 11.8, 6.9 Гц, 1H), 1.86 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.53, 161.53, 156.59, 153.04, 150.16, 149.41, 142.86, 140.48, 139.61, 134.91, 134.01, 132.69, 128.88, 122.07, 117.80, 108.22, 87.82, 60.78, 60.55, 55.86, 48.05, 33.35, 25.32, 22.64.

Элементный анализ: для C₂₄H₂₃F₃INO₆ рассчитано: C, 47.62; H, 3.83; найдено: C, 47.74; H, 3.92.

Эфир иодоколхинола и транс-3-хлоракриловой кислоты 198е



Элюент для КХ: петролейный эфир – этилацетат – этанол (10 – 1 – 1). Соединение **198е** было выделено в виде светло-желтых кристаллов с выходом 84%.

Т.пл. = 121 – 122 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.39$ (д, J = 8.4 Гц, 1H), 8.02 (д, J = 13.4 Гц, 1H), 7.77 (с, 1H), 7.17 (с, 1H), 6.82 (с, 1H), 6.79 (д, J = 13.4 Гц, 1H), 4.48 (дt, J = 12.1, 7.8 Гц, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.79 (с, 3H), 3.56 (с, 3H), 2.55 (дд, J = 12.8, 5.6 Гц, 1H), 2.24 – 2.14 (m, 1H), 2.11 – 2.03 (m, 1H), 1.89 (дд, J = 11.5, 6.6 Гц, 1H), 1.86 (с, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.50, 161.28, 156.59, 153.01, 150.15, 149.50, 142.72, 141.14, 140.48, 139.54, 134.90, 133.79, 123.93, 122.11, 117.97, 108.23, 88.11, 60.77, 60.55, 55.86, 47.49, 33.35, 25.32.

Элементный анализ: для C₂₃H₂₃ClINO₆ рассчитано: C, 48.31; H, 4.05; найдено: C, 48.39; H, 4.16.

Синтез метил (E)-3-((5S)-5-ацетамидо-3-гидрокси-9,10,11-триметокси-6,7дигидро-5Н-дибензо[a,c][7]аннулен-2-ил)акрилата 200



В колбу Шленка поместили иодо-колхинол (1 экв., 100 мг, 0,206 ммоль), ацетат палладия (0,05 экв., 2,3 мг, 0,01 ммоль). Колбу заполнили аргоном, в инертной атмосфере прилили ацетонитрил (10 мл), триэтиламин (3 экв., 66 мкл, 0,618 ммоль) и метилакрилат (1,5 экв., 90 мкл, 0,309 ммоль). Реакцию проводили в течение 20 часов при температуре 80 °С. После окончания реакции растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (4 – 1 – 1). Соединение **200** было выделено в виде белых кристаллов с выходом 66%.

Т.пл. = 186 – 188 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 10.32$ (c, 1H), 8.40 (д, J = 7.9 Гц, 1H), 7.87 (д, J = 16.1 Гц, 1H), 7.47 (c, 1H), 6.90 (c, 1H), 6.76 (c, 1H), 6.55 (д, J = 16.1 Γц, 1H), 4.41 (дт, J = 14.3, 7.2 Гц, 1H), 3.82 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.70 (c, 3H), 3.52 (c, 3H), 2.21 – 2.01 (м, 3H), 1.94 – 1.91 (м, 1H), 1.88 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.36, 167.20, 155.99, 152.17, 150.35, 144.89, 140.59, 140.41, 134.68, 129.86, 125.09, 123.88, 118.59, 116.22, 111.14, 108.00, 60.57, 60.51, 55.84, 51.28, 48.53, 37.77, 29.99, 22.63.

Элементный анализ: для C₂₄H₂₇NO₇ рассчитано: C, 65.29; H, 6.16; найдено: C, 65.43; H, 6.28.

Синтез N-((78)-1,2,3-триметокси-12-метил-10-оксо-5,6,7,10тетрагидробензо[6,7]-циклогепта[1,2-g]хромен-7-ил)ацетамида 201



В колбу Шленка поместили иодоколхинол 74 (1 экв., 0,206 ммоль, 100 мг), ацетат палладия (0,1 экв., 0,02 ммоль, 4,6 мг), заполнили колбу аргоном. Добавили 7 мл дистиллированной воды, триэтиламин (3 экв., 0,618 ммоль, 67 мкл) и метилкротонат (1,5 экв., 0,309 ммоль, 33 мкл). Реакцию проводили в течение суток при температуре 80 °C. Растворитель удали при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюент – 100% этилацетат. Продукт 201 выделили в виде бежевых кристаллов с выходом 23%.

Т.пл. = 177 – 179 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.48$ (д, J = 8.3 Гц, 1H), 7.65 (c, 1H), 7.29 (c, 1H), 6.81 (c, 1H), 6.38 (д, J = 1.1 Гц, 1H), 4.55 (дт, J = 11.8, 7.6 Гц, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.58 (c, 3H), 2.54 (дд, J = 13.0, 6.0 Гц, 1H), 2.20 (дд, J = 12.5, 6.6 Гц, 1H), 2.09 – 2.01 (м, 2H), 1.89 (c, 3H), 1.85 (c, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 168.62, 159.81, 153.10, 152.87, 152.03, 150.30, 145.56, 140.61, 134.74, 130.20, 126.05, 122.92, 117.76, 113.95, 111.20, 108.21, 60.85, 60.53, 55.90, 48.40, 37.97, 29.83, 22.61, 18.12.

Элементный анализ: для C₂₄H₂₅NO₆ рассчитано: C, 68.07; H, 5.95; найдено: C, 68.19; H, 6.04.

6. Синтез липидных пролекарственных форм

Синтез N-деацетилаллоколхицина 209



Синтез проводили согласно литературной методике [292].

Колхицин 1 (3.000 г, 1 экв., 7.5 ммоль) вступал в реакцию с 4-DMAP (1.830 г, 2 экв., 15 ммоль), триэтиламином (0,756 г, 1 экв., 7.48 ммоль, 1.043 мл) и Вос₂О (5.700 г, 3.46 экв., 26 ммоль) в ацетонитриле при 100 °С в течение 2.5 часов. После этого дополнительная порция Вос₂О (3.200 г, 1.96 экв., 14.67 ммоль) была добавлена, и реакцию проводили еще 1 час при температуре 100 °С. После окончания реакции все летучие компоненты были удалены при пониженном давлении, а продукт был выделен методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент этилацетат – ацетон (4 – 1). Продукт выделен в виде красно-коричневой пены с выходом 78% (2.925 г).

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 7.27 (c, 1H), 7.11 (д, *J* = 10.7 Гц, 1H), 7.02 (д, *J* = 10.9 Гц, 1H), 6.77 (c, 1H), 4.90 (дд, *J* = 12.4, 6.0 Гц, 1H), 3.87 (c, 3H), 3.83 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.54 (c, 3H), 2.69 (м, 1H), 2.34 – 2.25 (м, 1H), 2.22 (c, 3H), 1.96 – 1.85 (м, 2H), 1.49 (c, 9H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 178.31, 170.79, 163.95, 153.55, 153.43, 150.91, 148.69, 141.26, 135.20, 134.96, 134.28, 132.16, 126.03, 112.59, 108.15, 84.80, 61.27, 61.09, 60.20, 56.48, 56.27, 32.24, 29.68, 27.72.

МАLDI (отриц. режим): 494.4 (100%), 484.3 (52%), 474.6 (20%), 497.4 (19%).

Элементный анализ: для C₂₇H₃₃NO₈ рассчитано: C, 64.92; H, 6.66; найдено: C, 64.71; H, 6.82.

N-Вос-колхицин (2.000 г, 1 экв., 4 ммоль) растворили в сухом метаноле, добавили к раствору твердый метилат натрия (896 мг, 4 экв., 16 ммоль) и смесь перемешивали в течение 1 часа при 40 °C в атмосфере аргона. После завершения реакции метанол удалили при пониженном давлении, к оставшейся смеси добавили насыщенный раствор NH₄Cl (26 мл). Водный слой был проэкстрагирован AcOEt (3 х 50 мл), объединенный органический слой промыли насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над Na₂SO₄. Растворитель удалили при пониженном давлении. *N*-Вос-деацетилаллоколхицин был получен в виде бежевых кристаллов с выходом 99% (1.813 г) и использовался далее без предварительной очистки.

Т.пл. = 151 – 152 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 7.69 (д, *J* = 7.8 Гц, 1H), 7.21 (с, 1H), 7.10 (д, *J* = 10.6 Гц, 1H), 7.02 (д, *J* = 10.9 Гц, 1H), 6.76 (с, 1H), 4.08 (дт, *J* = 13.7, 7.0 Гц, 1H), 3.87 (с, 3H), 3.83 (с, 3H), 3.79 (с, 3H), 3.54 (с, 3H), 2.55 (дд, *J* = 13.3, 6.0 Гц, 1H), 2.17 (тд, *J* = 13.1, 7.0 Гц, 1H), 2.06 – 1.93 (м, 1H), 1.87 – 1.77 (м, 1H), 1.32 (с, 9H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 178.00, 163.50, 154.50, 152.94, 151.03, 150.36, 140.69, 135.10, 134.39, 134.26, 130.51, 125.31, 112.12, 107.65, 60.83, 60.64, 56.01, 55.84, 54.90, 52.87, 40.78, 35.80, 28.14.

MALDI (положит. режим): 458.2 (М+Н⁺, 72%), 401.2 (39%), 356.1 (11%).

Элементный анализ: для C₂₅H₃₁NO₇ рассчитано: C, 65.63; H, 6.83; найдено: C, 65.82; H, 6.69.

N-Вос-деацетилаллкоколхицин (1.800 г, 1 экв., 3.93 ммоль) поместили в круглодонную колбу, к нем прилили 30 мл дихлорометана и 9 мл трифторуксусной кислоты. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 1,5 часов. Избыток кислоты был нейтрализован добавлением насыщенного раствора NaHCO₃ до pH=8. Водный слой проэкстрагировали дихлорметаном, объединенный органический слой промыли насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над Na₂SO₄. Растворитель удалили при пониженном давлении. *N*-деацетилаллоколхицин **209** был получен в виде светло-бежевого порошка с выходом 95% (1.407 г) и был использован без дальнейшей очистки.

Т.пл. = 132 – 133 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 7.64 (c, 1H), 7.05 (д, *J* = 10.6 Гц, 1H), 6.99 (д, *J* = 10.7 Гц, 1H), 6.74 (c, 1H), 3.86 (c, 3H), 3.83 (c, 3H), 3.76 (c, 3H), 3.55 (c, 3H), 3.46 (дд, *J* = 10.5, 5.8 Γц, 1H), 2.37 – 1.91 (м, 4H).

¹³С ЯМР (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 178.20, 163.26, 153.82, 152.73, 150.15, 140.47, 135.68, 134.88, 133.76, 131.83, 125.40, 111.84, 107.34, 60.66, 60.53, 55.90, 55.84, 53.11, 39.64, 29.87. МАLDI (положит. режим): 357.2 (100%), 341.2 (49%), 326.1 (18%).

Элементный анализ: для C₂₀H₂₃NO₅ рассчитано: C, 67.21; H, 6.49; найдено: C, 67.40 2; H, 6.21.

Синтез аллоколхифолина 207



N-деацетилаллоколхицин **6** (1.400 г, 1 экв., 3.91 ммоль), гликолевую кислоту (297 мг, 1 экв., 3.91 ммоль) и *N*-гидроксисукцинимид (341 мг, 0.76 экв., 2.97 ммоль) поестили в колбу Шленка, заполнили ее аргоном. Смесь растворили в сухом DCM, далее добавили триэтиламин (1.184 г, 3 экв., 11.73 ммоль, 1.634 мл) и *ди*-изопропилкарбодиимид (DIC) (680 мг, 1.5 экв., 5.86 ммоль, 835 мкл). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 20 часов. Растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделяли меодом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: дихлорометан – метанол (18 - 1). Аллоколхифолин **207** был получен в виде светло-желтого поршка с выходом 64% (1.038 г).

Т.пл. = 123 – 125 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.47$ (д, J = 7.7 Гц, 1H), 7.17 (с, 1H), 7.11 (д, J = 10.6 Гц, 1H), 7.02 (д, J = 10.9 Гц, 1H), 6.77 (с, 1H), 5.51 (т, J = 5.8 Гц, 1H), 4.41 (дт, J = 11.6, 7.2 Гц, 1H), 3.87 (с, 3H), 3.83 (с, 3H), 3.83 – 3.80 (м, 2H), 3.79 (с, 3H), 3.52 (с, 3H), 2.59 (дд, J = 13.2, 6.0 Гц, 1H), 2.25 – 2.16 (м, 1H), 2.14 – 2.03 (м, 1H), 1.97 (дд, J = 12.7, 6.3 Гц, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 177.99, 172.78, 171.39, 163.52, 152.93, 150.50, 150.45, 140.71, 135.18, 134.28, 130.76, 125.48, 112.09, 107.72, 61.39, 60.79, 60.70, 56.03, 55.86, 50.85, 29.27, 25.23.

MALDI (отриц. режим): 400.2 (100%), 415.2 (88%).

Элементный анализ: для C₂₂H₂₅NO₇ рассчитано: C, 63.61; H, 6.07; найдено: C, 63.45 2; H, 6.24.

Синтез (a*R*,5*S*)-*N*-(3-карбоксиметилІ-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*-дибензо[а,с]-циклогептен-5-ил)(пент-4-ин-1-оил)ацетамида 217



Пентин-4-овую кислоту (25 мг, 1.5 экв., 0.252 ммоль) вводили в реакцию с реагентом Ямагучи (ТСВС) (82 мг, 2 экв., 0.336 ммоль, 53 мкл) и этиэтиламином (85 мг, 5 экв., 0.84 ммоль, 117 мкл) в сухом DCM в течение 5 часов при 0 – 5 °С. Далее смесь аллоколхифолина **207** (70 мг, 1 экв., 0.168 ммоль) и 4-DMAP (61 мг, 3 экв., 0.504 ммоль) в DCM по каплям добавляли к исходному раствору и полученную смесь перемешивали в течение 20 часов при комнатной температуре. После окончания реакции растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (5 – 1 – 1). Соединение **217** было выделено в виде светло-бежевых кристаллов с выходом 51% (42 мг).

Т.пл. = 52 – 53 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.74$ (д, J = 7.4 Гц, 1H), 7.11 (д, J = 11.3 Гц, 1H), 7.10 (с, 1H), 7.03 (д, J = 11.1 Гц, 1H), 6.77 (с, 1H), 4.53 (д, J = 1.5 Гц, 2H), 4.39 – 4.31 (м, 1H), 3.87 (с, 3H), 3.83 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.52 (с, 3H), 2.80 (т, J = 2.6 Гц, 1H), 2.58 (т, J = 7.2 Гц, 3H), 2.42 – 2.39 (м, 1H), 2.27 – 2.17 (м, 2H), 2.07 – 1.96 (м, 1H), 1.95 – 1.85 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 177.94, 170.87, 166.04, 163.53, 152.97, 150.42, 150.11, 140.74, 134.97, 134.45, 134.12, 130.45, 130.04, 125.32, 112.10, 82.98, 71.67, 62.79, 62.25, 60.82, 60.69, 56.06, 55.85, 51.13, 35.67, 32.41, 29.15.

MALDI (DCTB, положит. режим): 518.2 (M+Na⁺, 49%), 495.4 (98%), 332.2 (100%). Элементный анализ: для C₂₇H₂₉NO₈ рассчитано: C, 65.44; H, 5.90; найдено: C, 65.77; H, 6.02.

Синтез (а*R*,5*S*)-*N*-(3-аллилокси-4-иодо-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*дибензо-[а,с]циклогептен-5-ил)ацетамида 198а был описан выше.

Синтез (a*R*,5*S*)-*N*-(3-аллилокси-4-иодо-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*дибензо-[a,c]циклогептен-5-ил)амина 210



В колбу Шленка #1 поместили соединение **198а** (496 мг, 1 экв., 0.95 ммоль), 4-DMAP (115 мг, 1 экв., 0.95 ммоль), заполнили колбу аргоном и прилили ацетонитрил. В колбу Шленка #2 поместили Вос₂O (826 мг, 4.6 экв., 3.79 ммоль) и прилили ацетонитрил в инертной атмосфере. Половину содержимого колбы #2 и триэтиламин (191 мг, 2 экв., 1.89 ммоль, 264 мкл) добавили в колбу #1 и образовавшуюся смесь перемешивали в течение 3 часов при 75 °С. далее оставшуюся половину содержимого колбы #2 добавили к смеси и реакцию проводили еще 20 часов при комнатной температуре. После окончания реакции растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (12 – 1 – 1). (a*R*,5*S*)-N-(3-аллилокси-4-иодо-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*-дибензо[а,с]циклогептен-5-ил)(*трет*.-бутоксикарбамоил)ацетамид был получен в виде красноватой пены с выходом 86% (509 мг).

Т.пл. = 69 – 71 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 7.71 (c, 1H), 6.93 (c, 1H), 6.79 (c, 1H), 6.10 – 6.02 (м, 1H), 5.49 (д, *J* = 17.2 Γц, 1H), 5.31 (д, *J* = 10.6 Γц, 1H), 5.13 (дд, *J* = 9.1, 2.5 Γц, 1H), 4.62 (дд, 1H), 5.49 (д, *J* = 10.2 Γц, 1H), 5.31 (д, *J* = 10.6 Γц, 1H), 5.13 (дд, *J* = 9.1, 2.5 Γц, 1H), 4.62 (дд, 1H), 5.49 (dd, 1H), 5

J = 34.5, 10.7 Гц, 2H), 3.83 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.44 (с, 3H), 2.68 – 2.57 (м, 2H), 2.28 (с, 3H), 2.18 – 2.04 (м, 2H), 1.50 (с, 9H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 155.54, 153.30, 152.58, 150.36, 140.66, 140.19, 139.47, 134.67, 133.22, 128.54, 122.84, 117.37, 109.17, 108.18, 83.87, 83.73, 69.14, 69.11, 63.36, 60.61, 60.60, 55.80, 36.22, 34.64, 30.10, 27.46.

MALDI (DCTB, положит. режим): 623.2 (100%), 332.3 (27%), 486.6 (19%).

Элементный анализ: для C₂₅H₃₄INO₇ рассчитано: C, 53.94; H, 5.50; найдено: C, 53.81; H, 5.62.

(a*R*,5*S*)-*N*-(3-аллилокси-4-иодо-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*-дибензо[a,c]циклогептен-5-ил)(*трет.*-бутоксикарбамоил)ацетамид (485 мг, 1 экв., 0.78 ммоль) вводили в реакцию с метилатом натрия (13 мг, 0.3 экв., 0.23 ммоль) в метаноле при 40 °C в течение 1 часа. После завершения реакции растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (15-1-1). Продукт выделили в виде светлобежевого масла с выходом 94% (425 мг).

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 7.66 (c, 1H), 7.52 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H), 6.99 (c, 1H), 6.77 (c, 1H), 6.10 (ддд, *J* = 15.5, 10.2, 4.9 Гц, 1H), 5.55 (д, *J* = 15.1 Гц, 1H), 5.32 (д, *J* = 10.5 Гц, 1H), 4.64 (тт, *J* = 13.3, 6.5 Гц, 2H), 4.17 (дт, *J* = 15.8, 8.0 Гц, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.77 (c, 3H), 3.54 (c, 3H), 2.46 (д, *J* = 5.7 Гц, 1H), 2.16 (дд, *J* = 12.3, 6.3 Гц, 1H), 2.00 (дт, *J* = 19.8, 9.8 Гц, 1H), 1.92 – 1.82 (м, 1H), 1.35 (c, 9H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 155.66, 154.74, 152.49, 150.08, 142.85, 140.49, 139.44, 134.84, 133.05, 128.25, 122.75, 117.60, 108.12, 107.77, 83.21, 77.91, 69.11, 60.66, 60.50, 55.80, 50.13, 38.31, 29.99, 28.19.

Элементный анализ: для C₂₆H₃₂INO₆ рассчитано: C, 53.71; H, 5.55; найдено: C, 53.66; H, 5.70.

МАLDI (DCTB, положит. режим): 581.4 (100%), 242.3 (58%), 332.2 (29%), 396.2 (17%).

(a*R*,5*S*)-*N*-(3-аллилокси-4-иодо-9,10,11-триметокси-6,7-дигидро-5*H*-дибензо-

[а,с]циклогептен-5-ил)*трет.*-бутоксикабамат (425 мг, 1 экв., 0.73 ммоль), полученный на предыдущем этапе, растворили в смеси дихлорометана (30 мл) и концентрированной соляной кислоты (8 мл). Раствор перемешивали 18 часов при температуре 30 °C. После окончания реакции избытьк кислоты нейтрализовали добавлением насыщенного раствора NaHCO₃, полученную смесь проэкстрагировали дихлорометаном (3 х 50 мл), объединенный органический слой промыли насыщенным наствором хлорида натрия, сушили над Na₂SO₄. Растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (6:1:1). Продукт **210** был выделен в виде бежевого масла с выходом 62% (218 мг).

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 7.70 (c, 1H), 7.32 (c, 1H), 6.80 (c, 1H), 6.13 (ддд, *J* = 15.5, 10.0, 4.7 Гц, 1H), 5.58 (д, *J* = 15.1 Гц, 1H), 5.32 (д, *J* = 10.6 Гц, 1H), 4.70 (c, 2H), 3.83 (c, 3H), 3.76 (c, 3H), 3.69 (дд, *J* = 11.2, 6.7 Гц, 1H), 3.54 (c, 3H), 2.56 – 2.50 (м, 1H), 2.45 – 2.33 (м, 1H), 2.10 – 1.99 (м, 1H), 1.90 – 1.82 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 155.66, 152.57, 150.11, 140.85, 140.52, 139.58, 134.73, 133.10, 128.24, 122.48, 117.52, 108.41, 108.17, 83.75, 69.31, 60.66, 60.51, 55.86, 50.47, 29.84, 28.21.

Элементный анализ: для C₂₁H₂₄INO₄ рассчитано: C, 52.40; H, 5.03; найдено: C, 52.23; H, 5.17.

MALDI (DCTB, положит. режим): 481.0 (100%), 332.2 (45%), 465.0 (36%).





Субстрат **210** (200 мг, 1 экв., 0,41 ммоль), гликолевую кислоту (32 мг, 1 экв., 0,41 ммоль) и *N*-гидроксисукцинимид (36 мг, 0.76 экв., 0.31 ммоль) растворили в сухом DCM в интертной атмосфере. Еt₃N (124 мг, 3 экв., 1.23 ммоль, 171 мкл) и DIC (58 мг, 1.5 экв., 0.62 ммоль, 99 мкл) были последовательно добавлены к раствору и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов. После ококнчания реакции растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (8 – 1 – 1). Продукт ацилирования был выделен в виде бежевых кристаллов с выходом 79% (175 мг).

Т.пл. = 124 – 126 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.34$ (д, J = 8.8 Гц, 1H), 7.67 (c, 1H), 6.98 (c, 1H), 6.79 (c, 1H), 6.08 (ддд, J = 15.6, 10.4, 5.1 Гц, 1H), 5.56 (дд, J = 17.3, 1.4 Гц, 1H), 5.52 (c, 1H), 5.32 (д, J = 10.6 Гц, 1H), 4.67 (д, J = 11.7 Гц, 2H), 4.60 – 4.53 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.78 (c, 3H), 3.50 (c, 3H), 2.55 – 2.51 (м, 1H), 2.14 – 2.02 (м, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 171.32, 155.61, 152.48, 150.18, 142.28, 140.52, 139.32, 134.89, 133.17, 128.31, 122.86, 117.67, 108.23, 108.16, 83.28, 69.12, 61.56, 60.60, 60.58, 55.83, 47.77, 37.97, 30.03.

MALDI (DCTB, положит. режим): 412.1 (100%), 562.0 (M+Na⁺, 77%), 539.0 (69%), 465.0 (38%).

Элементный анализ: для C₂₃H₂₆INO₆ рассчитано: С, 51.22; Н, 4.86; найдено: С, 51.33; Н, 4.99.

Субстрат, полученный на предыдущем этапе, (170 мг, 1 экв., 0.32 ммоль) вводили в реакцию с Pd(dppd)Cl₂ (11 мг, 0.05 экв., 0.016 ммоль) и AcOK (93 мг, 3 экв., 0,945 ммоль) в ДМСО. Реакцию проводили в течение 20 часов при 75 °С. После завершения реакции к смеси добавили дистиллированную воду (50 мл) и полученный раствор был проэкстрагирован AcOEt (3 х 70 мл). Объединенный органический слой промыли насыщенным наствором хлорида натрия, сушили над Na₂SO₄. Растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (9 – 1 - 1). Соединение **208** было выделено в виде белого кристаллического порошка с выходом 87% (114 мг). **Т.п.** = 157 – 159 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.26$ (д, J = 8.8 Гц, 1H), 7.41 (c, 1H), 6.88 (c, 1H), 6.78 (c, 1H), 5.49 (д, J = 6.0 Гц, 1H), 5.46 (т, J = 3.1 Гц, 1H), 5.14 (д, J = 2.7 Гц, 2H), 5.02 (д, J = 2.5 Гц, 1H), 4.61 – 4.52 (м, 1H), 3.84 (д, J = 1.8 Гц, 2H), 3.83 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.48 (c, 3H), 2.19 – 1.99 (м, 4H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ =171.23, 162.48, 152.21, 150.35, 143.65, 143.27, 140.57, 134.81, 126.56, 124.31, 123.62, 122.00, 108.05, 105.61, 99.64, 74.92, 61.52, 60.59, 60.56, 55.83, 48.12, 37.75, 29.98.

MALDI (положит. режим): 411.0 (100%), 379.0 (11%), 353.0 (7%).

Элементный анализ: для C₂₃H₂₅NO₆ рассчитано: C, 67.14; H, 6.12; найдено: C, 67.27; H, 6.02.





Пентин-4-овая кислота (36 мг, 1.5 экв., 0.364 ммоль) взаимодействовала с реагентом Ямагучи (ТСВС) (118 мг, 2 экв., 0.486 ммоль, 76 мкл) и триэтиламином (123 мг, 5 экв., 1.215 ммоль, 169 мкл) в сухом DCM в течение 5 часов при температуре 0 – 5 °С. Далее смесь субстрата XX (100 мг, 1 экв., 0.243 ммоль) и 4-DMAP (89 мг, 3 экв., 0.729 ммоль) в дихлорометане была добавле к исходному раствору. Полученный раствор перемешивали в течение 20 часов при комнатной температуре. После окончания реакции растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: петролейный эфир – этилацетат – этанол (10 – 1 – 1). Соедиение **218** выло выделено в виде светло-бежевых кристаллов с выходом 49% (58 мг).

Т.пл. = 66 – 67 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 8.52$ (д, J = 8.2 Гц, 1H), 7.42 (c, 1H), 6.85 (c, 1H), 6.78 (c, 1H), 5.47 (уш.с, 1H), 5.15 (c, 2H), 5.03 (уш.с, 1H), 4.56 (д, J = 3.2 Гц, 2H), 4.52 – 4.46 (м, 1H), 3.83 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.48 (c, 3H), 2.81 (c, 1H), 2.60 (т, J = 7.2 Гц, 2H), 2.42 – 2.39 (м, 2H), 2.22 – 1.97 (м, 3H), 1.97 – 1.88 (м, 1H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 172.88, 170.96, 165.93, 162.53, 152.24, 150.34, 143.24, 143.22, 140.60, 134.65, 126.51, 124.21, 123.75, 122.12, 108.06, 105.36, 99.74, 83.53, 82.99, 74.92, 71.67, 71.31, 60.58, 55.82, 48.58, 37.92, 33.03, 32.47.

MALDI (DCTB, положит. режим): 491.1 (100%), 394.2 (37%), 354.2 (26%)

Элементный анализ: для C₂₈H₂₉NO₇ рассчитано: C, 68.42; H, 5.95; найдено: C, 68.23; H, 6.07.

Синтез целевых конъюгатов 221 и 222

Синтез 2-(11-азидоундеканоил)-1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина 220

11-азидоундекановую кислоту (125 мг, 6 экв., 0.546 ммоль), *лизо*-фосфатидилхолин (45 мг, 1 экв., 0.091 ммоль) и 4-DMAP (67 мг, 6 экв., 0.546 ммоль) растворили в сухом CHCl₃. DIC (92 мг, 8 экв., 0.728 ммоль, 113 мкл) был добавлен к раствору и реакцию проводили в течение 36 часов при комнатной температуре. Растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент: CHCl₃ – EtOH (6 – 4) \rightarrow CHCl₃ – EtOH – H₂O (10 – 10 – 1). Продукт был получен в виде бесцветного масла с выходом 78% (50 мг).

¹**Н ЯМР** (400 МГц, CD₃OD): δ = 5.20 (дд, *J* = 6.2, 2.9 Гц, 1Н), 4.39 (дд, *J* = 12.0, 3.1 Гц, 1Н), 4.23 (уш.с, 2Н), 4.13 (дд, *J* = 12.0, 6.9 Гц, 1Н), 3.98 (т, *J* = 6.2 Гц, 2Н), 3.61 – 3.56 (м, 2Н), 3.24 (т, *J* = 6.9 Гц, 2Н), 3.19 (с, 9Н), 2.29 (кв, *J* = 7.7 Гц, 4Н), 1.61 – 1.53 (м, 6Н), 1.32 – 1.20 (м, 36Н), 0.85 (т, *J* = 6.7 Гц, 3Н).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, CD₃OD): δ = 174.46, 174.05, 70.89, 70.81, 66.88, 66.82, 64.23, 64.18, 63.08, 59.65, 59.60, 54.47, 51.90, 34.64, 34.52, 32.37, 30.13, 30.11, 30.09, 29.95, 29.90, 29.82, 29.80, 29.75, 29.72, 29.58, 29.52, 29.27, 27.16, 25.34, 25.33, 23.10, 14.29. ³¹**P ЯМР** (162 МГц, CD₃OD): δ = -0.80.

Общая методика реакции клик-конъюгирования

Алкин-содержащий колхициноид (1.2 экв.) и азид-содержащий фосфатидилхолин **220** (1 экв.) растворили в ДМФА при инертной атмосфере. К данной смеси был добавлен раствор CuSO₄*5H₂O (0.2 экв.), аскорбата натрия (0.2 экв.) и трис(бензилтриазолил)амина

(ТВТА) (0.4 экв.) в воде. Образовавшующуся смесь перемешивали в течение 2 часов при 55 °С. После окончания реакции растворители удалили при пониженном давлении, целевые конъюгаты выделяли методом колоночной хроматографии. Элюент: CHCl₃ – EtOH (6 – 4) \rightarrow CHCl₃ – EtOH – H₂O (10 – 10 – 1).

Соединение 221



Выделено в виде белого порошка с выходом 56%. **Т.пл.** = 47 – 48 °C.

¹**H ЯМР** (400 МГц, CD₃OD): $\delta = 7.58$ (c, 1H), 7.54 (д, J = 1.4 Гц, 1H), 7.37 (д, J = 10.8 Гц, 1H), 7.32 (c, 1H), 7.01 (д, J = 10.9 Гц, 1H), 6.61 (c, 1H), 5.20 (дд, J = 6.5, 2.9 Гц, 1H), 4.63 (д, J = 6.6 Гц, 1H), 4.41 – 4.37 (м, 1H), 4.28 (д, J = 7.1 Гц, 2H), 4.23 (c, 2H), 4.13 (дд, J = 12.0, 6.8 Гц, 1H), 3.98 (c, 3H), 3.95 (д, J = 9.4 Гц, 2H), 3.90 (c, 3H), 3.89 (c, 3H), 3.59 (c, 3H), 3.58 (д, J = 3.2 Гц, 2H), 3.20 (c, 9H), 3.04 (д, J = 4.6 Гц, 2H), 2.81 (т, J = 6.9 Гц, 2H), 2.59 (дд, J = 13.7, 6.3 Гц, 1H), 2.39 (дд, J = 13.2, 6.5 Гц, 1H), 2.29 (дт, J = 13.8, 7.3 Гц, 6H), 2.21 (дд, J = 12.5, 6.3 Гц, 1H), 2.13 – 2.06 (м, 1H), 1.87 – 1.82 (м, 2H), 1.59 – 1.55 (м, 4H), 1.27 – 1.23 (м, 36H), 0.85 (уш.с, 3H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, CD₃OD): δ = 174.51, 174.07, 172.65, 168.48, 165.67, 154.28, 153.07, 151.53, 141.95, 137.86, 136.87, 135.16, 133.12, 126.01, 117.97, 117.92, 114.28, 108.12, 78.32, 72.39, 70.88, 70.79, 66.88, 66.78, 64.55, 63.12, 63.03, 61.75, 61.68, 59.97, 59.90, 56.77, 56.44, 54.48, 52.86, 51.07, 49.50, 49.29, 49.07, 36.52, 34.66, 34.55, 33.64, 32.45, 30.65, 30.31, 30.20, 30.16, 30.01, 29.87, 29.82, 29.75, 29.64, 29.56, 29.46, 26.92, 25.39, 23.17, 20.93, 14.31.

³¹**P ЯМР** (162 МГц, CD₃OD): δ = -0.64.

HRMS: найдено: 1200.6859

Соединение 222



Выделено в виде белого порошка с выходом 62%.

Т.пл. = 41 °С.

¹**H ЯМР** (400 МГц, CD₃OD): $\delta = 7.57$ (д, J = 5.5 Гц, 1H), 7.55 (с, 1H), 7.46 (с, 1H), 6.73 (с, 1H), 6.62 (с, 1H), 5.37 (уш.с, 1H), 5.22 – 5.19 (м, 1H), 5.09 (с, 2H), 4.97 (с, 1H), 4.76 – 4.71 (м, 1H), 4.55 (дд, J = 4.5, 1.4 Гц, 1H), 4.39 (т, J = 9.1 Гц, 1H), 4.23 (т, J = 6.9 Гц, 4H), 4.14 (дд, J = 11.9, 6.8 Гц, 2H), 3.97 (с, 2H), 3.90 (с, 3H), 3.88 (с, 3H), 3.58 (уш.с, 2H), 3.52 (с, 3H), 3.19 (с, 9H), 3.09 – 3.05 (м, 2H), 2.85 – 2.81 (м, 2H), 2.54 – 2.42 (м, 2H), 2.31 – 2.27 (м, 6H), 1.84 – 1.79 (м, 2H), 1.59 – 1.55 (м, 4H), 1.32 - 1.16 (м, 36H), 0.85 (т, J = 4.6 Гц, 3H). ¹³**С ЯМР** (101 МГц. CD₂OD): $\delta = 174.46$ 174.00 172.77 168.31 155.43 153.06 141.97

¹³**C ЯМР** (101 МГц, CD₃OD): δ = 174.46, 174.00, 172.77, 168.31, 155.43, 153.06, 141.97, 141.57, 136.90, 135.85, 129.18, 121.39, 115.92, 108.28, 106.30, 94.51, 84.37, 78.27, 70.70, 70.63, 66.69, 64.81, 63.36, 62.85, 61.62, 61.32, 60.20, 56.40, 56.25, 54.44, 51.16, 50.21, 50.16,

49.71, 49.50, 49.29, 49.07, 48.86, 38.78, 34.62, 34.52, 33.50, 32.42, 31.08, 30.42, 30.17, 30.13, 29.98, 29.84, 29.79, 29.68, 29.61, 29.50, 29.34, 26.79, 25.36, 25.32, 25.01, 23.14, 20.85, 14.30. ³¹**P ЯМР** (162 МГц, CD₃OD): δ = -4.57. **HRMS:** найдено: 1196.6882

Синтез карбоксилатных соединений-метаболитов 223 и 224



Соединение 217 (1 экв., 40 мг, 0,078 ммоль) и 11-азидоундекановую кислоту 219 (1,5 экв., 26,6 мг, 0,117 ммоль) растворяли в 3 мл N,N-диметилформамида. CuSO₄ * 5H₂O (0,2 экв., 4 мг, 0,015 ммоль), аскорбат натрия (0,2 экв., 3 мг, 0,015 ммоль) и ТВТА (0,4 экв., 16 мг, 0,03 ммоль) суспендировали в 3 мл дистиллированной воды. Водную суспензию медленно добавляли к раствору в ДМФА, колбу заполняли аргоном и смесь перемешивали в течение 2 часов при 55 ° С. После завершения реакции смесь разбавляли 20 мл насыщенного раствора NH₄Cl и экстрагировали AcOEt (3 × 40 мл). Объединенный органический слой промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над Na₂SO₄, растворитель выпаривали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента смесь петролейный эфир - этилацетат - этанол (3-1-1). Карбоксильное производное 223 выделяли в виде бежевого твердого вещества с выходом 68%.

Т.пл. = 94 – 95 °С

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): $\delta = 11.43$ (c, 1H), 8.76 (д, J = 7.5 Гц, 1H), 7.86 (c, 1H), 7.12 (д, J = 11.2 Гц, 1H), 7.11 (c, 1H), 7.02 (д, J = 11.1 Гц, 1H), 6.77 (c, 1H), 4.52 (c, 2H), 4.40 – 4.33 (m, 1H), 4.24 (т, J = 7.1 Гц, 2H), 3.87 (c, 3H), 3.83 (c, 3H), 3.79 (c, 3H), 3.52 (c, 3H), 2.88 (т, J = 7.3 Гц, 2H), 2.72 (т, J = 7.3 Гц, 2H), 2.60 (дд, J = 13.2, 5.9 Гц, 1H), 2.24 (дт, J = 13.0, 6.6 Гц, 1H), 2.17 (т, J = 7.4 Гц, 2H), 2.04 – 1.90 (м, 2H), 1.76 – 1.70 (м, 2H), 1.49 – 1.43 (м, 2H), 1.25 – 1.17 (м, 12H).

¹³C **ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 177.93, 174.49, 171.66, 166.24, 163.53, 152.97, 150.42, 150.09, 145.20, 140.75, 134.97, 134.12, 130.49, 128.71, 125.34, 121.97, 112.07, 107.75, 62.19, 60.81, 60.68, 56.05, 55.85, 51.16, 49.16, 35.63, 33.65, 32.83, 30.95, 29.64, 29.16, 28.78, 28.68, 28.52, 28.32, 25.79, 24.48, 20.44.

MALDI (DCTB, положит. режим): 723.3 (M+Na⁺, 100%), 745.3 (M+K⁺, 66%), 547.2 (12%) Элементный анализ: для C₃₈H₅₀N₄O₉ рассчитано: C, 64.57; H, 7.13; найдено: C, 64.41; H, 7.26.



Соединение 224 было синтезировано аналогично соединению 223. Элюент для колоночной хроматографии петролейный эфир - этилацетат - этанол (4-1-1). Продукт выделен в виде светло-бежевых кристаллов с выходом 56%.

```
Т.пл. = 108 - 109 °С
```

¹**H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d₆): δ = 11.95 (c, 1H), 8.65 (д, *J* = 8.6 Гц, 1H), 7.86 (c, 1H), 7.73 (c, 1H), 7.49 (c, 1H), 6.81 (c, 1H), 4.68 – 4.62 (м, 1H), 4.59 (д, *J* = 4.6 Гц, 2H), 4.20 (уш.с, 2H), 3.84 (c, 3H), 3.80 (c, 3H), 3.52 (c, 3H), 3.45 (c, 2H), 2.91 (т, *J* = 7.1 Гц, 2H), 2.74 (т, *J* = 6.5 Гц, 2H), 2.59 – 2.53 (м, 1H), 2.22 – 2.14 (м, 5H), 2.09 – 2.01 (м, 2H), 1.73 – 1.66 (м, 2H), 1.49 – 1.43 (м, 2H), 1.24 – 1.16 (м, 12H).

¹³**C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d₆): δ = 174.50, 171.88, 166.19, 153.98, 152.33, 150.41, 145.23, 140.64, 137.06, 134.67, 128.46, 126.87, 124.66, 122.00, 115.19, 108.02, 105.97, 69.80, 62.47, 60.62, 60.59, 55.84, 49.16, 48.95, 48.53, 38.06, 33.66, 32.92, 29.94, 29.60, 29.58, 28.79, 28.75, 28.68, 28.54, 28.30, 26.85, 25.77, 24.49, 20.51.

MALDI (DCTB, положит. режим): 725.1 (M+Na⁺, 100%), 741.1 (M+K⁺, 73%), 486.2 (42%). Элементный анализ: для C₃₉H₅₀N₄O₈ рассчитано: C, 66.65; H, 7.17; найдено: C, 66.47; H, 7.32.

7. Квантовые расчеты

Оптимизированная геометрия конъюгатов колзициноидов с фосфатидилхолином была рассчитана методом Хартри-Фока с использованием базиса def2-SVP. Рассчеты были проведены с применением программного обеспечения ORCA[344].

Ван-дер-Ваальсовы радиусы, приведенные в [345] были использованы для расчета объема молекул, расположения и ориентации в бислое, расчете проекций колхициноидного скелета.

8. Профиль поверхностного натяжения монослоев

Профиль поверхностного натяжения липидного монослоя был получен посредсивом расчетов методом молекулярной динамики [346].

9. Приготовление липидных монослойных пленок

В данных экспериментах использовались растворы 0.5 мг/мл РОРС в смеси хлороформа с метанолом в соотношении (5:1, v/v) (Merck KGaA и Macron Fine Chemicals, соответственно) и растворы РОРС смешанные с растворами колхициноидов в хлороформе 0.3 мг/мл. Для получения липидных пленок использовали шприцы Hamilton для нанесения на поверхность 10 мМ раствора KCl (Sigma-Aldrich) полученного из трижды дистиллированной воды. После испарения растворителей измерения производили в течение первых 20 минут при температуре 20 °C. Экспериментальные диаграммы «давление – площадь» были получены одновременно с измерением потенциала Вольта. Эксперименты прододили с использованием оборудования Microtrough XS и программного обеспечения FilmWareX-4.0. Скорость сжатия слоя составила 10 мм²/мин.

10. Липосомы

10.1 Приготовление липосом

Липосомы были приготовлены согласно литературной методике [347]. Липидные пленки были получены совместным выпариванием аликвот соответствующих растворов (хлороформ-метанол 2:1) и последующей лиофильной сушкой в течение 45 мин при 5 Па. Были получены липидные композиции составом: ePC–221, 95 : 5; ePC–222, 95 : 5; ePC, 100 % (мольн.). Далее липидные пленки гидратировали фосфатным буферным раствором

(PBS, pH 7.4) для МТТ экспериметнов и буферным раствором TrisHCl/NaCl для TCX (pH = 8.2, с добавлением 5 мМ Ca²⁺), гидратация сопровождалась 7 циклами замораживания – оттаивания (жидкий азот/+40°C). Пролученный раствор экструдировали 20 раз через поликарбонатный мембранный фильтрs (Nucleopore, CШA) с размером пор 100 нм на мини-экструдере Avanti. Концентрации липидов **221** и **222** отслеживали методом УФ-спектрофотометрии после разрушения липосом в этаноле (λ_4 max = 350 nm, $\varepsilon \sim 10200$ M⁻¹ cm⁻¹, λ_5 max = 250 нм, $\varepsilon \sim 16500$ M⁻¹ cm⁻¹).

Для получения липосом с кальцеином липидные пленки были гидратированы в PBS с 80 мМ кальцеина и дальнейшие операции проводились как описано выше. После проведения экструзии неинкапсулированный кальцеинудалили методом эксклюзионной хроматографии на колонке с сорбентом Sephadex G-50 (1.3 × 18 см): 200-мкл аликвоты дисперсий липосом наносили на сорбент, объем пустот (4,5 мл) отбрасывали, а затем собирали фракции по 150–200 мкл. Три или четыре липосомных фракций были объединены. концентрации **221**, **222** и кальцеина оценивали путем измерения УФ-спектров разложившихся липосомальных дисперсий в этаноле (макс. поглощения кольцеина составляет 504 нм, ~ 74000 M⁻¹*см⁻¹). Дисперсии липосом хранили при + 4 °C и использовали для экспериментов в течение 5 дней.

10.2 Определение дзета-потенциала

Для измерений образцы липосом готовили, как описано ранее [347]. Значения дзета-потенциала были получены с использованием анализатора ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corp., Холтсвилл, Нью-Йорк; предоставлено CoreFacility Института генной биологии Российской академии наук). Образцы липосом (1,5 мл, 1 мг/мл общих липидов) уравновешивали в течение 1 мин в кюветах, после чего проводили 10 серий по 25 циклов на образец при 25 °C. Значения дзета-потенциала были рассчитаны с использованием приближения Смолуховского.

10.3 Динамическое светорассеивание

Размер липосом после приготовления контролировали в разбавленных суспензиях (общее количество липидов 1 мг/мл PBS) с помощью динамического рассеяния света с использованием анализатора ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corp., Холтсвилл, Нью-Йорк; предоставлено CoreFacility Института биологии генов Российской академии наук). Для одного образца было выполнено не менее 10 измерений

10.4. Гидролиз фосфолипазой А₂

Липосомы (ePC; ePC – 221; ePC – 222) с концентрацией липидов 5 мМ обрабатывали PLA₂ из *Viperae ursinii* и секрета поджелудочной железы свиньи. Концентрация фермента в каждом образце составляла 1 мкМ. Суспензию липосом инкубировали с PLA₂ в течение 15, 30, 60 минут или 24 часов. Затем активность PLA₂ ингибировалась 8-кратным избытком ЭДТА по сравнению с концентрацией Ca²⁺. Образцы разбавляли этанолом, выпаривали на роторном испарителе, сушили в течение 4 ч при 3 Па. Липидные компоненты экстрагировали смесью CHCl₃ и CH₃OH, 1:1, с помощью ультразвуковой обработки.

Нерастворимый материал осаждали и далее не использовали. Супернатант анализировали методом TCX на алюминиевых листах, покрытых силикагелем (Kieselgel 60, Merck, Darmstadt, Germany). Элюент: CHCl₃ - CH₃OH - NH₄OH (28%), 65: 25: 4. Обнаружение липидов проводили с помощью реагента молибденового синего по Васьковскому [335].

11. Биологические исследования in vitro

Противоопухолевая активность новых производных была исследована при ингибировании пролиферации опухолевых клеток колориметрическим методом с использованием красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид). При добавлении красителя в культуры живые клетки окрашиваются за счет восстановления молекулы МТТ до нерастворимой формы формазана. Эксперимент проводится в 96-луночном плоскодонном планшете (Costar, USA). Для анализа активности производных использовали клетки аденокарциномы поджелудочной железы человека BxPC, PANC-1, Colo-357 и MiaPaca-2, карциномы легких А549, эндотелиальная клеточные линии EA.hy 926, клетки почечного эпителия эмбриона HEK-293, клетки кишечного эпителия Colon-26. Набор нескольких линий клеток различных видов рака позволяет исключить случайные эффекты, когда какая-то из линий оказывается более резистентной к препаратам. Эксперименты проводили трижды в разные дни для повышения достоверности. Диапазон разведений составил от 100 мкМ до 1 нМ. Клетки инкубировали с препаратами 72 ч для определения кумулятивного цитотоксичного и цитостатичного эффектов. Анализ проводили с помощью планшетного ридера после растворения кристаллов формазана диметилсульфоксидом при длине волны 540 нм. Активность приведена в виде индексов подавления пролиферации (ИПП), которые подсчитывали по формуле ИПП=1-ОП₀/ОП_к, где ОП₀ и ОП_к означают оптическую плотность в опыте и контроле. Примеры ИПП для различных клеточных линий приведены в таблице 4 в виде IC₅₀ (концентрация соединения, при которой достигается ингибирование пролиферации клеток на 50 %). Приведенные значения рассчитаны как среднее из трех повторов одного эксперимента.

Для исследования ингибирования полимеризации тубулина использовали Tubulin polymerization kit (Cytoskeleton, Denver, CO, USA). Эксперимент проводили на 96луночном планшете. В лунки помещали 5 мкл растворов исследуемых соединений с различной концентрацией и термостатировали 1 мин при 37°С. Затем прибавляли 100 мкг тубулина в GPEM (80 ммоль/л 1,4-пиперазиндиэтансульфоновой кислоты pH 6,9; 0,5 ммоль/л EGTA (комплексон VI); 2 ммоль/л хлорида магния; 1 ммоль/л гуанозин-5'трифосфата, 20% глицерола; 6-8 мкмоль/л DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол)). Степень полимеризации тубулина оценивали по усилению флуоресценции (возбуждение 360 нм, испускание 450 нм) с помощью Microplate reader (Tecan Group, Maennedorf, Switzerland). Флуоресценцию измеряли с минутным интервалом в течение часа. В качестве контроля раствор колхицина 10 мкМ в ДМСО (полное использовали ингибирование полимеризации) и ДМСО без исследуемого соединения (отсутствие ингибирования).

выводы

1. Разработан метод синтеза нерацемических пирролоаллоколхициноидов, проявляющих цитотоксическую активность в суб-наномолярном диапазоне. Данные молекулы в перспективе будут оказывать меньший токсический эффект на клетки по сравнению с колхицином при краткосрочном воздействии

2. Разработан метод синтеза нерацемических пирролоаллоколхициноидов, базирующийся на реакции синтеза индолов по Фишеру, позволяющий получать соединения с вариативным сочленением колец С и D

3. Разработан метод синтеза нерацемических пирролоаллоколхициноидов, базирующийся на реакции синтеза индолов по Фишеру, позволяющий получать соединения с вариативным сочленением колец С и D

4. Разработан метод синтеза нерацемических пирролоаллоколхициноидов, базирующийся на реакции синтеза индолов по Фишеру, позволяющий получать соединения с вариативным сочленением колец С и D

5. Получены липидные пролекарства на основе активных колхициноидов и лизофосфатидилхолина, а также терапевтические наноразмерные липосомы на их основе. Показано, что такие частицы стабильны при включении в их состав 10% терапевтического липида, устойчивы при инкубации в биологических средах, эффективно расщепляются фосфолипазой А2 и демонстрируют снижение токсичности по сравнению с интактными колхициноидами на 3 порядка.

БЛАГОДАРНОСТИ

Сотрудники ИБХ РАН: к.б.н. Свирщевская .В. д.х.н. Водовозова Е.Л., к.х.н. Болдырев И.А., асп. Третьякова Д.С.

Зарубежные партнеры: Проф. Шмальц Ганс-Гюнтер (Кельнский университет, Германия)

Dr. Себастьян Комб (университет Aix-Marseille, Марсель, Франция) Dr. Бенуа Жигант (институт интегративной биологии клеток, Париж, Франция)

Сотрудники ННГУ-НИИХ К.х.н. Фаерман В.И., д.х.н. Гришин И.Д., к.х.н. Малышева Ю.Б, к.х.н. Войтович Ю.В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Mendis S. Отчет о распространении, профилактике и лечении неинфекционных заболеваний в мире в 2014 г. ВОЗ 2014.
- Shapiro, C.L. Side Effects of Adjuvant Treatment of Breast Cancer / C. L. Shapiro, A. Recht // N. Engl. J. Med. – 2001. – № 344. – C. 1997–2008.
- 3. Zahreddine, H. Borden K.L.B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer / H. Zahreddine, K.L.B. Borden // *Front. Pharmacol.* **2013**. № 4. C. 28.
- 4. Drug resistance in cancer: an overview / Housman G. et al. // *Cancers (Basel)*. **2014.** № 6. C. 1769–1792.
- 5. Lage, H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem / H. Lage // *Cell. Mol. Life Sci.* − **2008**. − № 65. − C. 3145–3167.
- 6. The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review / B. Mansoori et al. // *Adv. Pharm. Bull.* − **2017**. − № 7. − C. 339–348.
- 7. Cancer drug resistance: an evolving paradigm / C. Holohan et al. // *Nat. Rev. Cancer.* **2013**. № 13. C. 714–726.
- 8. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review / R. Yuan et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2017. №. 1401. C. 19–27.
- Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization / P. Giannakakou et al. // J. Biol. Chem. 1997. № 272. C. 17118–17125.
- 10. Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells / Kavallaris M. et al. // *Cancer Res.* **2001**. №. 61. Р. 5803–5809.
- Gilman A. The initial clinical trial of nitrogen mustard / A. Gilman // Am. J. Surg. 1963.
 № 105. C. 574–578.
- 12. Saijo, N. Strategy for the development of novel anticancer drugs / N. Saijo, T. Tamura, K. Nishio // *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**. №. 52. C. 97–101.
- 13. Kumar, S. Drug targets for cancer treatment: an overview / S. Kumar // Med. Chem. (Los. Angeles). 2015. № 5. C. 115–123.
- 14. Raymond, E. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy / E. Raymond, S. Faivre, J.P. Armand // *Drugs.* **2000.** №. 60. C. 15–23.
- 15. Noonberg, S.B. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily / S.B. Noonberg, C.C. Benz // *Drugs.* **2000**. №. 59. C. 753–767.
- 16. Todderud, G. Epidermal growth factor: the receptor and its function / G. Todderud, G. Carpenter // *Biofactors*. **1989**. № 2. C. 11–15.
- 17. Eatock, M.M. Tumour vasculature as a target for anticancer therapy / M.M. Eatock, A. Schätzlein, S.B.Kaye // *Cancer Treat. Rev.* **2000**. № 26 C. 191–204.
- 18. Interaction between DNA polymerase λ and anticancer nucleoside analogs / M. Garcia-Diaz et al. // J. Biol. Chem. – **2010**. – № 285 – C. 16874–16879.
- 19. Mees, C. Transcription factors: their potential as targets for an individualized therapeutic approach to cancer / C. Mees, J. Nemunaitis, N. Senzer // *Cancer Gene Ther. (Nature Publishing Group).* **2008**. № 16. C. 103.
- 20. Szyf, M. DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy / M. Szyf // *Biochemistry.(Mosc).* **2005**. № 70. C. 533–549.
- Tekade, R.K. The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics / R.K. Tekade, X. Sun // Drug Discov. Today. - 2017. - № 22. - C. 1637–1653.
- Mechanism of inhibition of human glucose transporter GLUT1 is conserved between cytochalasin B and phenylalanine amides / K. Kapoor et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016. № 113. C. 4711–4716.
- Iwanaga, T. Cellular distributions of monocarboxylate transporters: a review / T. Iwanaga, A. Kishimoto // *Biomed. Res.* 2015. № 36. C. 279–301.

- 24. Bourdon, J.-C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective / J.-C. Bourdon, S.Surget, M.P. Khoury // Onco. Targets. Ther. 2013. № 7. C. 57–68.
- 25. Stathis, A. BET proteins as targets for anticancer treatment / A. Stathis, F. Bertoni // *Cancer Discov.* **2018**. № 8. C. 24–36.
- Clioquinol suppresses cyclin D1 gene expression through transcriptional and posttranscriptional mechanisms / J. Zheng et al. // Anticancer Res. – 2011. – № 31. – C. 2739– 2747.
- Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues / F. Thiebaut et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987. № 84. C. 7735–7738.
- 28. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy / L. Galluzzi et al. // *Sci. Transl. Med.* **2018**. № 10. C. eaat7807.
- 29. Neves, H. Recent advances in the field of anti-cancer immunotherapy / H. Neves, H.F. Kwok // *BBA Clin.* **2015**. № 3. C. 280–288.
- Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // Toxicol. Pathol. –
 2007. № 35. C. 495–516.
- Pfeffer, C. M. Apoptosis: a target for anticancer therapy / C. M. Pfeffer, A.T.K. Singh // Int. J. Mol. Sci. - 2018. - № 19. - C. 448-457.
- 32. Wu, G.S. TRAIL as a target in anti-cancer therapy / G.S. Wu // *Cancer Lett.* **2009**. № 285. C. 1–5.
- Faivre, S. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors / S. Faivre, S. Djelloul, E. Raymond // Semin. Oncol. 2006. № 33. C. 407–420.
- 34. Tubulin as a target for anticancer drugs : agents which interact with the mitotic spindle / Jordan A. et al. // *Med. Res. Rev.* **1998**. № 18. C. 259–296.
- 35. Tubulins the target for anticancer therapy / N.G. Vindya et al. // *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**. № 15. C. 73–82.
- 36. An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance / A.L. Parker et al. // *Int. J. Mol. Sci.* **2017**. № 18. C. E1434
- 37. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? / Jackson J.R. et al. // *Nat. Rev.Cancer.* **2007**. № 7. C. 107–117.
- Subramanian, R. Building complexity: insights into self-organized assembly of microtubule-based architectures / R. Subramanian, T. M. Kapoor // Dev. Cell. 2012. N
 N
 23. C. 874–885.
- 39. Glotzer, M. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs / M. Glotzer // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**. № 10. C. 9–20.
- 40. The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers / Horio T. et al. // *J. Cell Sci.* **1991**. № 99. C. 693–700.
- 41. Rochlin, M. W. Polymerizing microtubules activate site-directed F-actin assembly in nerve growth cones / M. W. Rochlin, M. E. Dailey, P. C. Bridgman // Mol. Biol. Cell. 1999. № 10. C. 2309–2327.
- 42. Steinmetz, M. O. Microtubule-targeting agents : strategies to hijack the cytoskeleton / M. O. Steinmetz, A. E. Prota // *Trends Cell Biol.* 2018. № 28. C. 776–792.
- 43. Jordan, M. A. Microtubules as a target for anticancer drugs / M. A. Jordan, L. Wilson // *Nat. Rev. Cancer.* **2004**. № 4. C. 253–265.
- Dumontet, C. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics / C. Dumontet, M. A. Jordan // Nat. Rev. Drug Discov. 2010. № 9. C. 790–803.
- 45. The binding of vinca domain agents to tubulin: Structural and biochemical studies / A. Cormier et al. // *Methods in Cell Biology*. **2010**. № 95. C. 373–390.

- 46. Stereocontrolled total synthesis of (+)-vincristine / T. Kuboyama et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* − **2004**. − № 101. − C. 11966–11970.
- 47. Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: Thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity / R. M. Buey et al. // *Chem. Biol.* 2005. № 12. C. 1269–1279.
- Schiff, P. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol / P. B. Schiff, J. Fant, S. B. Horwitz // *Nature*. 1979. № 277. C. 665.
- 49. Structure of tubulin at 6.5 A and location of the taxol-binding site / E. Nogales et al. // *Nature*. **1995**. № 375. C. 424–427.
- 50. Choy, H. Taxanes in combined modality therapy for solid tumors / H. Choy // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2001**. № 37. C. 237–247.
- 51. Total synthesis of taxol / K. C. Nicolaou et al. // *Nature*. **1994**. № 367. C. 630–634.
- 52. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain / R. B. G. Ravelli et al. // *Nature*. **2004**. № 428. C. 198–202.
- 53. High-resolution model of the microtubule / E. Nogales et al. // *Cell.* **1999**. № 96. C. 79–88.
- 54. Pelletier, P. S. Examen chimique des plusieurs végétaux de la famille des colchicées, et du principe actif qu'ils renferment. [Cévadille (veratrum sabadilla); hellébore blanc (veratrum album); colchique commun (colchicum autumnale)]" / P. S. Pelletier, J. B. Caventou // Annales de Chimie et de Physique. 1820. C. 69–81.
- 55. Long-term colchicine treatment in children with familial Mediterranean fever / D. Zemer et al. // *Arthritis Rheum.* **1991**. № 34. C. 973–977.
- Cocco, G. Colchicine in clinical medicine. A guide for internists / G. Cocco, D. C. C. Chu, S. Pandolfi // Eur. J. Intern. Med. – 2010. – № 21. – C. 503–508.
- 57. Sari, I. Familial Mediterranean fever: An updated review / I. Sari, M. Birlik, T. Kasifoglu // *Eur. J. Rheumatol.* **2014**. № 1. C. 21–33.
- 58. Pharmacological and clinical basis of treatment of familial mediterranean fever (fmf) with colchicine or analogues: an update / C. Cerquaglia et al. // Curr. Drug Target -Inflam. Allergy. 2005. № 4. C. 117–124.
- 59. Saleh, Z. Update on the therapy of Behçet disease / Z. Saleh, T. Arayssi // *Ther. Adv. Chronic Dis.* **2014**. № 5. C. 112–134.
- 60. Colchicine treatment for tracheobronchial amyloidosis / A. Morales et al. // *Respiration*. **2016**. № 91. C. 251–255.
- 61. Bibas, R. Colchicine for dermatologic diseases / R. Bibas, N. K. Gaspar, M. Ramos-e-Silva // J. Drugs Dermatol. – 2005. – № 4. – C. 196–204.
- 62. Synthese des colchicins / J. Schreiber et al. // *Angew. Chemie.* **1959**. № 71. C. 637–640.
- 63. The total synthesis of colchicine / E. E. Van Tamelen et al. // *J. Am. Chem. Soc.* **1959**. № 81. C. 6341–6342.
- 64. Woodward, R.B. A total synthesis of colchicine / R. B.Woodward // Harvey Lect. 1965.
 № 59. C. 31-47.
- Evans, D. A. Convergent total synthesis of (+)-colchicine and (+)-desacetamidoisocolchicine / D. A. Evans, S. P. Tanis, D. J. Hart // J. Am. Chem. Soc. 1981. № 103. C. 5813–5821.
- 66. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs / B. S. Wong et al. // Adv. Drug Deliv. Rev. **2013**. № 65. C. 1964–2015.
- 67. Martel, J. A new synthesis of desacetamidocolchiceine / J. Martel, E. Toromanoff, C. Huynh // J. Org. Chem. **1965**. № 30. C. 1752–1759.
- 68. Graening, T. Total syntheses of colchicine in comparison: a journey through 50 years of synthetic organic chemistry / T. Graening, H.-G. Schmalz // *Angew. Chemie Int. Ed.* –

2004. – № 43. – C. 3230–3256.

- 69. Combinations of paclitaxel and vinblastine and their effects on tubulin polymerization and cellular cytotoxicity: characterization of a synergistic schedule / P. Giannakakou et al. // Int. J. Cancer. – 1998. – № 75. – C. 57–63.
- 70. Tozer, G. M. Disrupting tumour blood vessels / G. M. Tozer, C. Kanthou, B. C. Baguley // *Nat. Rev. Cancer.* **2005**. № 5. C. 423–435.
- 71. Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability / G. M. Tozer et al. // *Cancer Res.* **2001**. № 61. C. 6413–6422.
- 72. Широкова, Л. В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки / Л. В. Широкова // *Цитология.* **2007**. № 49. С. 385–395.
- Hacker G. The morphology of apoptosis / G. Hacker // Cell Tissue Res. 2000. № 301.
 C. 5–17.
- 74. Anti-mitotic chemotherapeutics promote apoptosis through TL1A-activated death receptor 3 in cancer cells / C. Qi et al. // *Cell Res.* **2018**. № 28. C. 544–555.
- 75. Fulda, S. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy / S. Fulda, K.-M. Debatin // Oncogene. 2006. № 25. C. 4798–4811.
- 76. Caspase-8 activation independent of CD95/CD95-L interaction during paclitaxel-induced apoptosis in human colon cancer cells (HT29-D4) / A. Goncalves et al. // *Biochem. Pharmacol.* 2000. № 60. C. 1579–1584.
- Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition / S. D. Patterson et al. // *Cell Death Differ.* 2000. № 7. C. 137–144.
- 78. Braguer, D. Microtubules in apoptosis induction: are they necessary? / D. Braguer, M. Carre, M.-A. Esteve // Curr. Cancer Drug Targets. 2007. № 7. C. 713–729.
- 79. Riedl, S. J. The apoptosome: signalling platform of cell death / S. J. Riedl, G. S. Salvesen // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2007. – № 8. – C. 405.
- 80. Walensky, L. D. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death / L. D. Walensky // *Cell Death Differ*. **2006**. № 13. C. 1339–1350.
- 81. Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity / I. Lebedeva et al. // *Cancer Res.* **2000**. № 60. C. 6052–6060.
- 82. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria / M.
 G. Vander Heiden et al. // Cell. 1997. № 91. C. 627–637.
- Bu, L. Characterization of vinblastine-induced Bcl-xL and Bcl-2 phosphorylation: evidence for a novel protein kinase and a coordinated phosphorylation/dephosphorylation cycle associated with apoptosis induction / L. Du, C. S. Lyle, T. C. Chambers // *Oncogene.* 2005. № 24. C. 107–117.
- Basu, A. Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis / A. Basu, S. Haldar // *FEBS Lett.* 2003. № 538. C. 41–47.
- 85. Modulation of mitogen-activated protein kinases and phosphorylation of Bcl-2 by vinblastine represent persistent forms of normal fluctuations at G2-M1 / M. Fan et al. // *Cancer Res.* **2000**. № 60. C. 6403–6407.
- 86. Dissociation of Bax from a Bcl-2/Bax heterodimer triggered by phosphorylation of serine 70 of Bcl-2 / M. Shitashige et al. // *J. Biochem.* **2001**. № 130. C. 741–748.
- 87. Westphal, D. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis / D. Westphal, R. M. Kluck, G. Dewson // Cell Death Differ. 2014. № 21. C. 196–205.
- 88. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases / E. H. Cheng et al. // Science. – 1997. – № 278. – C. 1966–1968.

- 89. Paclitaxel targets mitochondria upstream of caspase activation in intact human neuroblastoma cells / N. Andre et al. // *FEBS Lett.* **2002**. № 532. C. 256–260.
- 90. The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis / C. L. Perkins et al. // *Cancer Res.* 2000. № 60. C. 1645–1653.
- 91. Ling, Y.-H. Disruption of cell adhesion and caspase-mediated proteolysis of β- and γcatenins and APC protein in paclitaxel-induced apoptosis / Y.-H. Ling, Y. Zhong, R. Perez-Soler // Mol. Pharmacol. – 2001. – № 59. – C. 593–603.
- 92. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent / R. Ofir et al. // *Cell Death Differ*. **2002**. № 9. C. 636.
- 93. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter / S. V Ambudkar et al. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – **1999**. – № 39. – C. 361–398.
- 94. Choi, C.-H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal / C.-H. Choi // *Cancer Cell Int.* **2005**. № 5. C. 30.
- 95. Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease / N. Triller et al. // Lung Cancer. 2006. № 54. C. 235–240.
- 96. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer / K. Nooter et al. // Br. J. Cancer. 1997. № 76. C. 486–493.
- 97. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation / A. Haimeur et al. // Curr. Drug Metab. 2004. № 5. C. 21–53.
- 98. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues / P. A. Fetsch et al. // *Cancer Lett.* 2006. № 235. C. 84–92.
- 99. Phase III study of valspodar (PSC 833) combined with paclitaxel and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer / C. Lhomme et al. // J. Clin. Oncol. 2008. № 26. C. 2674–2682.
- 100. Jordan, M. A. How do microtubule-targeted drugs work? An overview / M. A. Jordan, K. Kamath // *Curr. Cancer Drug Targets.* **2007**. № 7. C. 730–742.
- 101. Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule de-stabilizers by stabilizing tubulin polymers / C. H. A. Cheung et al. // *Mol. Cancer.* **2009**. № 8. C. 43.
- 102. Neuronal-associated microtubule proteins class III beta-tubulin and MAP2c in neuroblastoma: role in resistance to microtubule-targeted drugs / S. Don et al. // Mol. Cancer Ther. - 2004. - № 3. - C. 1137–1146.
- 103. Seve, P. Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? / P. Seve, C. Dumontet // *Lancet. Oncol.* **2008**. № 9. C. 168–175.
- 104. Bhattacharya, R. Molecular basis for class V beta-tubulin effects on microtubule assembly and paclitaxel resistance / R. Bhattacharya, F. Cabral // J. Biol. Chem. – 2009. – № 284 – C. 13023–13032.
- 105. Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics / C. M. Galmarini et al. // Br. J. Cancer. 2003. № 88. C. 1793–1799.
- 106. Canta, A. Tubulin: A target for antineoplastic drugs into the cancer cells but also in the peripheral nervous system / A. Canta, A. Chiorazzi, G. Cavaletti // *Curr. Med. Chem.* 2009. № 16. C. 1315–1324.
- 107. Lee, J. J. Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents / J. J. Lee, S. M. Swain // J. Clin. Oncol. 2006. № 24. C. 1633–1642.

- 108. Cavaletti, G. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity / G. Cavaletti, P. Marmiroli // *Expert Opin. Drug Saf.* **2004**. № 3. C. 535–546.
- 109. Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer / A. A. Argyriou et al. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2008**. № 66. C. 218–228.
- 110. Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration / G. Cavaletti et al. // *Neurotoxicology*. **2000**. № 21. C. 389–393.
- Bergenheim, A. T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of estramustine phosphate / A. T. Bergenheim, R. Henriksson // *Clin. Pharmacokinet.* – 1998. – № 34. – C. 163–172.
- 112. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site / Y. Lu et al. // *Pharm. Res.* **2012**. № 29. C. 2943–2971.
- Class III beta-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents / C. Stengel et al. // Br. J. Cancer. 2010. № 102. C. 316-324.
- 114. Weisenberg, R. C. The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules / R. C. Weisenberg, G. G. Borisy, E. W. Taylor // *Biochemistry*. 1968. No 7. C. 4466–4479.
- 115. Downing, K. H. Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions / K. H. Downing, E. Nogales // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. № 8. С. 785–791.
- 116. The 4 A X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex / B. Gigant et al. // Cell. - 2000. - № 102. - C. 809–816.
- 117. The tubulin colchicine domain: a molecular modeling perspective / A. Massarotti et al. // *ChemMedChem.* **2012**. № 7. C. 33–42.
- 118. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin / A. Dorleans et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**. № 106. C. 13775–13779.
- Skoufias, D. A. Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes / D. A. Skoufias, L. Wilson // *Biochemistry*. – 1992. – № 31. – C. 738–746.
- 120. Banerjee, A. Kinetics of colchicine binding to purified beta-tubulin isotypes from bovine brain / A. Banerjee, R. F. Luduena // J. Biol. Chem. **1992**. № 267. C. 13335–13339.
- 121. Free energy calculations on the binding of colchicine and its derivatives with the α/β-tubulin Isoforms / J. Y. Mane et al. // J. Chem. Inf. Model. 2008. № 48. C. 1824–1832.
- 122. Interactions of a bicyclic analog of colchicine with β -tubulin isoforms $\alpha\beta$ II, $\alpha\beta$ III and $\alpha\beta$ IV / A. Banerjee et al. // *Eur. J. Biochem.* **2004**. No 246. C. 420–424.
- 123. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structurebased approach / T. L. Nguyen et al. // J. Med. Chem. – 2005. – № 48. – C. 6107–6116.
- Carlomagno, T. Tubulin-Binding Agents: Synthetic, Structural and Mechanistic Insights / T. Carlomagno - Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- 125. The discovery of colchicine-SAHA hybrids as a new class of antitumor agents / X. Zhang et al. // *Bioorg. Med. Chem.* **2013**. № 21. C. 3240–3244.
- 126. Design, synthesis and biological evaluation of colchicine derivatives as novel tubulin and histone deacetylase dual inhibitors / X. Zhang et al. // Eur. J. Med. Chem. 2015. № 95. C. 127–135.
- 127. Potent antitumor activities and structure basis of the chiral β-lactam bridged analogue of combretastatin A-4 binding to tubulin / P. Zhou et al. // J. Med. Chem. 2016. № 59. C. 10329–10334.
- 128. β-Lactam estrogen receptor antagonists and a dual-targeting estrogen receptor/tubulin ligand / N. M. O'Boyle et al. // *J. Med. Chem.* **2014**. № 57. P. 9370–9382.
- 129. Design, synthesis and anticancer properties of 5-arylbenzoxepins as conformationally restricted isocombretastatin A-4 analogs / E. Rasolofonjatovo et al. // Eur. J. Med. Chem. 2013. № 62. C. 28–39.
- 130. Quantum chemistry calculation-aided structural optimization of combretastatin A-4-like tubulin polymerization inhibitors: improved stability and biological activity / J. Jiang et al. // J. Med. Chem. 2015. № 58. C. 2538–2546.
- 131. Antitumor and antivascular effects of AVE8062 in ovarian carcinoma / T. J. Kim et al. // Cancer Res. – 2007. – № 67. – C. 9337–9345.
- 132. A Phase Ib trial of CA4P (combretastatin A-4 phosphate), carboplatin, and paclitaxel in patients with advanced cancer / G. J. Rustin et al. // Br. J. Cancer. 2010. № 102. C. 1355–1360.
- 133. Bohlin, L. Podophyllotoxin derivatives: drug discovery and development / L. Bohlin, B. Rosen // Drug Discov. Today. 1996. № 1. C. 343–351.
- 134. Sensitizing estrogen receptor-negative breast cancer cells to tamoxifen with OSU-03012, a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling inhibitor / S.-C. Weng et al. // Mol. Cancer Ther. 2008. № 7. C. 800– 808.
- 135. ENMD-1198, a new analogue of 2-methoxyestradiol, displays both antiangiogenic and vascular-disrupting properties / E. Pasquier et al. // Mol. Cancer Ther. 2010. № 9. C. 1408 –1418.
- 136. Attia, S. M. Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of genotoxic potential of amsacrine and nocodazole in mouse bone marrow cells / S. M. Attia, // J. Appl. Toxicol. 2013. № 33. C. 426–433.
- 137. D-24851, a novel synthetic microtubule inhibitor, exerts curative antitumoral activity in vivo, shows efficacy toward multidrug-resistant tumor cells, and lacks neurotoxicity / G. Bacher et al. // *Cancer Res.* 2001. № 61. C. 392–399.
- 138. Dewar, M. J. S. Structure of colchicine / M. J. S. Dewar // *Nature*. **1945**. № 155. C. 141–142.
- King, M. V. An X-ray diffraction determination of the chemical structure of colchicine / M. V. King, J. L. de Vries, R. Pepinsky // Acta Crystallogr. – 1952. – № 5. – C. 437–440.
- 140. Lessinger, L. The crystal structure of colchicine. A new application of magic integers to multiple-solution direct methods / L. Lessinger, T. N. Margulis // Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem. 1978. № 34. C. 578–584.
- 141. Hastie, S. B. Analysis of the near-ultraviolet absorption band of colchicine and the effect of tubulin binding / S. B. Hastie, R. P. Rava // J. Am. Chem. Soc. – 1989. – № 111. – C. 6993–7001.
- 142. The nitrogen of the acetamido group of colchicine modulates P-glycoprotein-mediated multidrug resistance / D. F. Tang-Wai et al. // *Biochemistry*. – 1993. – № 32. – C. 6470– 6476.
- 143. Cornigerine, a potent antimitotic colchicum alkaloid of unusual structure / E. Hamel et al. // *Biochem. Pharmacol.* – **1988**. – № 37. – C. 2445–2449.
- 144. Antitumor agents. Part 236: Synthesis of water-soluble colchicine derivatives / K. Nakagawa-Goto et al. // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**. № 15. C. 235–238.
- 145. Sivakumar G. Colchicine semisynthetics: chemotherapeutics for cancer? / G. Sivakumar // *Curr. Med. Chem.* **2013**. № 20. C. 892–898.
- 146. Thiocolchicoside exhibits anticancer effects through downregulation of NF- B pathway and its regulated gene products linked to inflammation and cancer / S. Reuter et al. // *Cancer Prev. Res.* **2010**. № 3. C. 1462–1472.
- 147. Affinity of thiocolchicoside and thiocolchicoside analogues for the postsynaptic GABA receptor site / K. Biziere et al. // *Eur. J. Pharmacol.* **1981**. № 75. C. 167–168.
- 148. Bombardelli, E. Fontana G. Preparation of colchicoside analogues as muscle relaxing, anti-inflammatory and anti-gout agents / E. Bombardelli, G.Fontana // Patent WO 2004111068 A1. Italy, 2004.
- 149. Novel 3- O- glycosyl-3-demethylthiocolchicines as ligands for glycine and γ-aminobutyric

acia receptors / M. L. Genni et al. // J. Mea. Chem. – 2007. – № 50. – C. 2245–2246	0. – C. 2245–2248.
---	--------------------

- 150. The efficacy of new colchicine derivatives and viability of the T-Lymphoblastoid cells in three-dimensional culture using 19F MRI and HPLC-UV ex vivo / D. Bartusik et al. // *Bioorg. Chem.* 2009. № 37. C. 193–201.
- 151. Derivatives of thiocolchicine and its applications to CEM cells treatment using 19F magnetic resonance ex vivo / D. Bartusik et al. // *Bioorg. Chem.* 2010. № 38. C. 1–6.
- 152. Huzil, J. T. Computer assisted design of second-generation colchicine derivatives / J. T. Huzil, J. Mane, J. A. Tuszynski // Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci. 2010. № 2. C. 169–174.
- 153. Computational design and biological testing of highly cytotoxic colchicine ring A modifications / J. Torin Huzil et al. // Chem. Biol. Drug Des. 2010. № 75. C. 541–550.
- 154. New C(4)-functionalized colchicine derivatives by a versatile multicomponent electrophilic aromatic substitution / N. Bensel et al. // *Helv. Chim. Acta.* 2004. № 87. C. 2266–2272.
- 155. Pyles, E. A. Effect of the B ring and the C-7 substituent on the kinetics of colchicinoid-tubulin associations / E. A. Pyles, S. B. Hastie // *Biochemistry*. 1993. № 32. C. 2329–2336.
- 156. Kumar, A. Potential anticancer role of colchicine-based derivatives / A. Kumar, P. R. Sharma, D. M. Mondhe // *Anticancer*. *Drugs*. **2017**. № 28. C. 250–262.
- 157. Antitumor agents. 139. Synthesis and biological evaluation of thiocolchicine analogs 5,6-dihydro-6(S)-acyloxy)- and 5,6-dihydro-6(S)-[(aroyloxy)methyl]-1,2,3-trimethoxy-9-(methylthio)-8H-cyclohepta[a]naphthalen-8-ones as novel cytotoxic and antimitotic agent / L. Sun et al. // J. Med. Chem. 1993. № 36. C. 544–551.
- 158. Velluz, L. The thiocolchicine / L. Velluz, G. Muller // *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1955**. № 155. C. 755–757.
- 159. Kotani R. Demjanov rearrangement of 1-methylcyclohexanemethylamine / R. Kotani // J. Org. Chem. – 1965. – № 30. – C. 350–354.
- 160. Interactions of tubulin with potent natural and synthetic analogs of the antimitotic agent combretastatin: a structure-activity study / C. M. Lin et al. // Mol. Pharmacol. 1988. N

 34. C. 200 208.
- 161. Tubulin binding of conformationally restricted bis-aryl compounds / S. K. Huber et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**. № 1. C. 243–246.
- Semisyntheses, X-ray crystal structures and tubulin-binding properties of 7oxodeacetamidocolchicine and 7-oxodeacetamidoisocolchicine / M. Banwell et al. // Aust. J. Chem. – 1992. – № 45. – C. 1577.
- 163. Biological effects of modified colchicines. Improved preparation of 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine, and (+)-colchicine and reassignment of the position of the double bond in dehydro-7-deacetamidocolchicines / M. Roesner et al. // J. Med. Chem. 1981. N
 ^o 24. C. 257–261.
- 164. Pharmaceutical composition for the therapy of diseases caused by highly proliferating cells / H.-G. Schmalz et al. / Patent WO/2016/139303 USA. Germany, **2016**. P. 1–64.
- 165. Beckmann, E. Zur Kenntniss der Isonitrosoverbindungen / E. Beckmann // Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft. **1886**. № 19. C. 988–993.
- 166. Novel B-ring modified allocolchicinoids of the NCME series: design, synthesis, antimicrotubule activity and cytotoxicity / S. Bergemann et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2003. № 11. C. 1269–1281.
- 167. The first colchicine analogue with an eight membered B-ring. Structure, optical resolution and inhibition of microtubule assembly / U. Berg et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* –

1997. – № 7. – С. 2771–2776.

- 168. Rapoport, H. The Synthesis of DL-colchinol methyl ether / H. Rapoport, A. R. Williams, M. E. Cisney // J. Am. Chem. Soc. 1951. № 73. C. 1414–1421.
- 169. Pentafluorophenyl acetate: a new, highly selective acetylating agent / L. Kisfaludy et al. // J. Org. Chem. – 1979. – № 44. – C. 654–656.
- 170. *N*-acetylcolchinol *O*-methyl ether and thiocolchicine, potent analogs of colchicine modified in the *C* ring. Evaluation of the mechanistic basis for their enhanced biological properties / G. J. Kang et al. // *J. Biol. Chem.* **1990**. № 265. C. 10255–10259.
- 171. aS,7S-absolute configuration of natural (−)-colchicine and allocongeners / A. Brossi et al. // *FEBS Lett.* – **1990**. – № 262. – C. 5–7.
- 172. Bredereck, H. New syntheses of 2,4-disubstituted S-triazines / H. Bredereck, F. Effenberger, A. E. Hofmann // *Angew. Chemie Int. Ed.* **1962**. № 1. C. 331–331.
- 173. New tetracyclic colchicinoids from the reaction of N-deacetylthiocolchicine and N-deacetylcolchicine with nitrous acid and tert-butyl nitrite / B. Danieli et al. // *Helv. Chim. Acta.* 2003. № 86. C. 2082–2089.
- 174. Synthesis of oxa-B-ring analogs of colchicine through Rh-catalyzed intramolecular [5+2] cycloaddition / A. O. Termath et al. // Eur. J. Org. Chem. 2012. № 2012. C. 4501–4507.
- 175. Corey, E. J. Highly enantioselective borane reduction of ketones catalyzed by chiral oxazaborolidines. Mechanism and synthetic implications / E. J. Corey, R. K. Bakshi, S. Shibata // J. Am. Chem. Soc. 1987. № 109. C. 5551–5553.
- 176. Baron, O. Herstellung und selektive Umsetzungen von gemischt bimetallischen aromatischen und heteroaromatischen Bor-Magnesium-Reagentien / O. Baron, P. Knochel // Angew. Chemie. – 2005. – № 117. – C. 3193–3195.
- 177. Baron, O. Preparation and selective reactions of mixed bimetallic aromatic and heteroaromatic boron-magnesium reagents / O. Baron, P. Knochel // Angew. Chemie Int. Ed. 2005. № 44. C. 3133-3135.
- 178. Synthesis of polymethoxy-substituted triazolobenzoxazepines / S. Y. Bukhvalova et al. // *Russ. J. Org. Chem.* **2016**. № 52. C. 1481–1489.
- 179. Cascade synthesis of polyoxygenated 6 H, 11 H -[2]benzopyrano-[4,3- c][1]benzopyran-11-ones / M. I. Naumov et al. // J. Org. Chem. – **2007**. – № 72. – C. 3293–3301.
- 180. Huisgen, R. 1,3-dipolar cycloadditions. Past and future / R. Huisgen // Angew. Chemie Int. Ed. – 1963. – № 2. – C. 565–598.
- 181. Krasniqi, B. Synthesis of 1,2,3-triazolo-fused allocolchicine analogs via intramolecular oxidative biaryl coupling / B. Krasniqi, W. Dehaen // Org. Lett. 2019. № 21. C. 5002–5005.
- 182. A general metal-free route towards the synthesis of 1,2,3-triazoles from readily available primary amines and ketones / J. Thomas et al. // Chem. Commun. 2016. № 52. C. 2885–2888.
- 183. Bio-inspired synthesis and biological evaluation of a colchicine-related compound library / K. C. Nicolaou et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**. № 22. C. 3776–3780.
- 184. Colchicine glycorandomization influences cytotoxicity and mechanism of action / A. Ahmed et al. // J. Am. Chem. Soc. 2006. № 128. C. 14224–14225.
- 185. Synthesis and characterization of a cobalamin–colchicine conjugate as a novel tumortargeted cytotoxin / J. D. Bagnato et al. // J. Org. Chem. – 2004. – № 69. – C. 8987–8996.
- 186. A convenient entry to new C-7-modified colchicinoids through azide alkyne [3+2] cycloaddition: application of ring-contractive rearrangements / N. Nicolaus et al.// *Heterocycles.* – 2010. – № 82. – C. 1585–1600.
- 187. Alper, P. B. Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines / P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong // *Tetrahedron Lett.* **1996**. № 37. C. 6029–6032.

- 188. Azides derived from colchicine and their use in library synthesis: a practical entry to new bioactive derivatives of an old natural drug / N. Nicolaus et al. // *ChemMedChem.* 2010. № 5. C. 661–665.
- 189. New colchicine-derived triazoles and their influence on cytotoxicity and microtubule morphology / P. Thomopoulou et al. // ACS Med. Chem. Lett. – 2016. – № 7. – C. 188– 191.
- 190. Colchicine metallocenyl bioconjugates showing high antiproliferative activities against cancer cell lines / K. Kowalczyk et al. // *Dalt. Trans.* **2017**. № 46. C. 17041–17052.
- 191. Preparation and in-vivo evaluation of 188 Re(CO) 3-colchicine complex for use as tumor-targeting agent / D. Satpati et al. // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2008. № 23. C. 741–748.
- 192. Synthesis and characterization of a theranostic vascular disrupting agent for in vivo MR imaging / T. L. Kalber et al. // *Bioconjug. Chem.* **2011**. № 22. C. 879–886.
- 193. Synthesis and characterization of novel natural product-Gd(III) MRI contrast agent conjugates / E. K. Efthimiadou et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – № 18. – C. 6058–6061.
- 194. 99mTc-labeling of colchicine using [99mTc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ and [99mTcN]²⁺ core for the preparation of potential tumor-targeting agents / A. Korde et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. № 14. C. 793–799.
- 195. 99mTc(CO)₃-AOPA colchicine conjugate as a potential tumor imaging agent / J. Wang et al. // J. Radioanal. Nucl. Chem. **2011**. № 288. C. 635–639.
- 196. Synthesis, 99mTc(CO)₃-labeling and preliminary biodistribution studies of a novel colchicine complex / J. Wang et al. // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2013. № 295. C. 227–231.
- 197. Arylureas derived from colchicine: enhancement of colchicine oncogene downregulation activity / V. Blasco et al. // *Eur. J. Med. Chem.* **2018**. № 150. C. 817–828.
- 198. Effects on tubulin polymerization and down-regulation of c-Myc, hTERT and VEGF genes by colchicine haloacetyl and haloaroyl derivatives / A. Marzo-Mas et al. // Eur. J. Med. Chem. 2018. № 150. C. 591–600.
- 199. Synthesis and biological evaluation of 4-chlorocolchicine derivatives as potent anticancer agents with broad effective dosage ranges / H. Nishiyama et al. // *MedChemComm.* 2012. № 3. C. 1500.
- 200. 4-Chlorocolchicine derivatives bearing a thiourea side chain at the C-7 position as potent anticancer agents / H. Nishiyama et al. // *MedChemComm.* **2014**. № 5. C. 452.
- 201. Colchicine-derived compound CT20126 promotes skin allograft survival by regulating the balance of Th1 and Th2 cytokine production / S.-J. Lee et al. // *Exp. Mol. Med.* 2007. N
 <u>N</u>
 <u>99.</u> C. 230–238.
- 202. The colchicine derivative CT20126 shows a novel microtubule-modulating activity with apoptosis / S.-K. Kim et al. // *Exp. Mol. Med.* **2013**. № 45. C. e19–e19.
- 203. Buckley, T. F. Mild and simple biomimetic conversion of amines to carbonyl compounds / T. F. Buckley, H. Rapoport // J. Am. Chem. Soc. **1982**. № 104. C. 4446–4450.
- 204. Antitumor agents. 172. Synthesis and biological evaluation of novel deacetamidothiocolchicin-7-ols and ester analogs as antitubulin agents / Q. Shi et al. // J. Med. Chem. – 1997. – № 40. – C. 961–966.
- 205. Antitumor Agents. Part 184. Syntheses and antitubulin activity of compounds derived from reaction of thiocolchicone with amines: Lactams, alcohols, and ester analogs of allothiocolchicinoids / Q. Shi et al. // *Helv. Chim. Acta.* **1998**. № 81. C. 1023–1037.
- 206. Hastie, S.B. Interactions of colchicine with tubulin / S. B. Hastie // *Pharmacol. Ther.* **1991.** № 51. C. 377–401.
- 207. Interaction of colchicine analogues with purified tubulin / G. G. Choudhury et al. // FEBS

Lett. – **1983**. – № 161. – C. 55–59.

- 208. Nicholls, G. A., Tarbell D.S. Colchicine and related compounds / G. A. Nicholls, D. S. Tarbell // J. Am. Chem. Soc. 1953. № 75. C. 1104–1107.
- 209. Šantavý, F. Préparation de l'acide colchicique à partir de la colchicine / F. Šantavý // Helv. Chim. Acta. - 1948. - № 31. - C. 821-826.
- 210. Fernholz, H. Über die Umlagerung des Colchicins mit Natriumalkoholat und die Struktur des Ringes C / H. Fernholz // Justus Liebigs Ann. Chem. **1950**. № 568. C. 63–72.
- Wolff, H. The Schmidt Reaction // Organic Reactions / H.Wolff Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. P. 307–336.
- 212. Sitnikov, N. S. Synthesis of allocolchicinoids. A 50 year journey / N. S. Sitnikov, A. Y. Fedorov // Russ. Chem. Rev. 2013. № 82. C. 393-411.
- 213. Thallium in organic synthesis. 59. Alkaloid synthesis via intramolecular nonphenolic oxidative coupling. Preparation of (.+-.)-ocoteine, (.+-.)-acetoxyocoxylonine, (.+-.)-3-methoxy-n-acetylnornantenine, (.+-.)-neolitsine, (.+-.)-kreysigine / E. C. Taylor et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 1980. № 102. C. 6513–6519.
- 214. Sawyer, J. S. Total synthesis of (±)-*N*-acetylcolchinol / J. S. Sawyer, T. L. Macdonald // *Tetrahedron Lett.* **1988**. № 29. C. 4839–4842.
- 215. Synthesis of (S)-(−)-*N*-acetylcolchinol using intramolecular biaryl oxidative coupling / G. Besong et al. // *Org. Biomol. Chem.* **2006**. № 4. C. 2193–2207.
- 216. Asymmetric synthesis of (S)-(−)-N-acetylcolchinol via Ullmann biaryl coupling / S. D. Broady et al. // *Tetrahedron Lett.* **2007**. № 48. C. 4627–4630.
- 217. A synthesis of (aR,7S)-(-)-*N*-acetylcolchinol and its conjugate with a cyclic RGD peptide / G. Besong et al. // *Tetrahedron*. **2008**. № 64. C. 4700–4710.
- 218. Asymmetric reduction of ketones under mild conditions using NaBH₄ and TarB-NO₂: an efficient and unusual chiral acyloxyborohydride reducing system / D. B. Cordes et al. // *Eur. J. Org. Chem.* 2005. № 2005. C. 5289–5295.
- 219. Asymmetric enamide hydrogenation in the synthesis of *N*-acetylcolchinol: a key intermediate for ZD6126 / I. C. Lennon et al. // *Tetrahedron Lett.* 2007. № 48. C. 4623–4626.
- Seganish, W. M. Application of aryl siloxane cross-coupling to the synthesis of allocolchicinoids / W. M. Seganish, P. DeShong // Org. Lett. 2006. № 8. C. 3951-3954.
- 221. Djurdjevic, S. Allocolchicines via intramolecular Nicholas reactions: the synthesis of NSC 51046 / S. Djurdjevic, J. R. Green // Org. Lett. 2007. № 9. C. 5505–5508.
- 222. Nicholas, K. M. On the stability of α-(alkynyl)dicobalt hexacarbonyl carbonium ions / K. M. Nicholas, R. Pettit // *J. Organomet. Chem.* 1972. № 44. C. C21–C24.
- 223. Teobald, B. J. The Nicholas reaction: the use of dicobalt hexacarbonyl-stabilised propargylic cations in synthesis / B. J. Teobald // *Tetrahedron.* 2002. № 58. C. 4133–4170.
- 224. Vorogushin, A. V. Central-to-axial chirality transfer in the benzannulation reaction of optically pure Fischer carbene complexes in the synthesis of allocolchicinoids / A. V. Vorogushin, W. D. Wulff, H.-J. Hansen // *Tetrahedron.* 2008. № 64. C. 949–968.
- 225. Asymmetric total syntheses of colchicine, β-lumicolchicine, and allocolchicinoid N-acetylcolchinol-O-methyl ether (NCME) / X. Liu et al. // Org. Lett. 2017. № 19. C. 4612–4615.
- 226. Diels–Alder reaction–aromatization approach toward functionalized ring C allocolchicinoids. Enantioselective total synthesis of (–)-7 S -allocolchicine / A. V. Vorogushin et al. // J. Org. Chem. 2003. № 68. C. 5826–5831.
- 227. Boyer, F.-D. Synthesis of new allocolchicinoids with seven- and eight-membered B-rings by enyne ring-closing metathesis / F.-D. Boyer, I. Hanna // Eur. J. Org. Chem. 2008. –

№ **2008**. – C. 4938–4948.

- 228. Leblanc, M. Allocolchicinoid synthesis via direct arylation / M. Leblanc, K. Fagnou // Org. Lett. - 2005. - № 7. - C. 2849–2852.
- 229. Corrie, T. J. A. Formal synthesis of (±)-allocolchicine via gold-catalysed direct arylation: implication of aryl iodine(III) oxidant in catalyst deactivation pathways / T. J. A. Corrie, G. C. Lloyd-Jones // *Top. Catal.* 2017. № 60. C. 570–579.
- 230. More, A. A. Alkyne [2 + 2 + 2]-cyclotrimerization approach for synthesis of 6,7-cyclopropylallocolchicinoids / A. A. More, C. V. Ramana // J. Org. Chem. 2016. № 81. C. 3400-3406.
- 231. Antitumor Agents 238. Anti-tubulin and in vitro cytotoxic effects of N-substituted allocolchicinoids / K.-H. Lee et al. // *Heterocycles.* **2005**. № 65. C. 541.
- 232. Tricyclic derivatives, their preparation, their use in the preparation of optically active or racemic colchicine, thiocolchicine and analogues or derivatives, and intermediates / F. Toromanoff et al. // Patent EP0729933A1 USA. **1995**.
- 233. Syntheses and biological evaluation of ring-C modified colchicine analogs / B. Yang et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – **2010**. – № 20. – C. 3831–3833.
- 234. Total synthesis of indole-derived allocolchicine analogues exhibiting strong apoptosisinducing activity / N. Sitnikov et al. // *Chem. Eur. J.* – **2012**. – № 18. – C. 12096–12102.
- 235. Synthesis of indole-derived allocolchicine congeners through Pd-catalyzed intramolecular C-H arylation reaction / N. S. Sitnikov et al. // Eur. J. Org. Chem. – 2014. – № 2014. – C. 6481–6492.
- 236. Synthesis of indole-derived allocolchicine congeners exhibiting pronounced anti-proliferative and apoptosis-inducing properties / N. S. Sitnikov et al. // *MedChemComm.* 2015. № 6. C. 2158–2162.
- 237. Synthesis of acyl halides under very mild conditions / A. Devos et al. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979. № 0. C. 1180–1181.
- 238. Synthesis and cytostatic properties of polyfunctionalized furanoallocolchicinoids / I. A. Gracheva et al. // *Eur. J. Med. Chem.* **2017**. C. 432–443.
- 239. Synthesis of new sulfur-containing derivatives of furanoallocolchicinoids / Y. A. Gracheva et al. // *Russ. J. Org. Chem.* **2016**. № 52. C. 1147–1152.
- 240. Synthesis and antiproliferative properties of bifunctional allocolchicine derivatives / I. A. Gracheva et al. // *Synthesis.* **2018**. № 50. C. 2753–2760.
- 241. Synthesis of bifunctional furano-allocolchicinoids / I. Gracheva et al. // Synthesis. 2017.
 № 49. C. 4335-4340.
- Zweig, M. H. Interaction of some colchicine analogs, vinblastine and podophyllotoxin with rat brain microtubule protein / M. H. Zweig, C. F. Chignell // *Biochem. Pharmacol.* 1973. № 22. C. 2141–2150.
- 243. The binding of isocolchicine to tubulin. Mechanisms of ligand association with tubulin / S. B. Hastie et al. // *J. Biol. Chem.* **1989**. № 264. C. 6682–6688.
- 244. Lessinger, L. The crystal structure of isocolchicine, an inactive isomer of the mitotic spindle inhibitor colchicine / L. Lessinger, T. N. Margulis // Acta Crystallogr. Sect. B. 1978. № 34. C. 1556–1561.
- 245. Rapoport, H. The preparation of colchicide 1 (demethoxycolchicine) / H. Rapoport, J. B. Lavigne // J. Am. Chem. Soc. **1955**. № 77. C. 667–670.
- 246. Biological effects of modified colchicines. 2. Evaluation of catecholic colchicines, colchifolines, colchicide, and novel N-acyl- and N-aroyldeacetylcolchicines / A. Brossi et al. // J. Med. Chem. 1983. № 26. C. 1365–1369.
- 247. Synthesis and biological evaluation of colchicine B-ring analogues tethered with halogenated benzyl moieties / L. Cosentino et al. // J. Med. Chem. 2012. № 55. C. 11062–11066.

- 248. Synthesis, antiproliferative activity and molecular docking of colchicine derivatives / A. Huczyński et al. // *Bioorg. Chem.* **2016**. № 64. C. 103–112.
- 249. Colchicine derivatives with potent anticancer activity and reduced P-glycoprotein induction liability / B. Singh et al. // Org. Biomol. Chem. 2015. № 13. C. 5674–5689.
- 250. A novel microtubule depolymerizing colchicine analogue triggers apoptosis and autophagy in HCT-116 colon cancer cells / A. Kumar et al. // Cell Biochem. Funct. –
 2016. № 34. C. 69–81.
- 251. Synthesis, antiproliferative and antibacterial evaluation of C-ring modified colchicine analogues / A. Huczyński et al. // *Eur. J. Med. Chem.* **2014**. № 90. C. 296-301.
- 252. A novel colchicine-based microtubule inhibitor exhibits potent antitumor activity by inducing mitochondrial mediated apoptosis in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells / A. Kumar et al. // *Tumor Biol.* 2016. № 37. C. 13121–13136.
- 253. Garazd, Y. L. Synthesis of colchicine C-10-amino-acid derivatives / Y. L. Garazd, M. M. Garazd, V. G. Kartsev // *Chem. Nat. Compd.* **2015**. № 51. C. 1138–1141.
- 254. Enikeeva, Z. M. Aziridine and hydroxy- and chloroethylamine derivatives of colchicine and their biological activity / Z. M. Enikeeva // *Chem. Nat. Compd.* **1998**. № 34. C. 699–705.
- 255. N-alkyl colchiceineamides: their inhibition of GTP or taxol-induced assembly of tubulin / I. Ringel et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1988. № 37. C. 2487–2489.
- 256. Fluorinated colchicinoids: antitubulin and cytotoxic properties / I. Ringel et al. // *J. Med. Chem.* **1991**. № 34. C. 3334–3338.
- 257. Pharmacologic study of colchicine-amide / D. H. Li et al. // *Chin. Med. J.* − **1980**. − № 93. − C. 188–190.
- 258. Synthesis and cytotoxic evaluation of novel C-10 nitrate derivatives of colchicine / L.-H. Shen et al. // *J.Chem.Soc.Pak.* **2016**. № 38. C. 755–761.
- 259. Colchicine-based hybrid anticancer drugs to combat tumor heterogeneity / S. R. Punganuru // *Med. Chem. (Los. Angeles).* **2016**. № 6. C. 165–173.
- 260. Inhibitors of tubulin polymerization: Synthesis and biological evaluation of hybrids of vindoline, anhydrovinblastine and vinorelbine with thiocolchicine, podophyllotoxin and baccatin III / D. Passarella et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. № 16. C. 6269–6285.
- 261. Synthesis and biological evaluation of novel anticancer bivalent colchicine–tubulizine hybrids / Y. B. Malysheva et al. // *Bioorg. Med. Chem.* **2012**. № 20. C. 4271–4278.
- 262. Identification of 12Cysβ on tubulin as the binding site of tubulyzine / Y. J. Kim et al. // *Bioorg. Med. Chem.* **2006**. № 14. C. 1169–1175.
- 263. Colchitaxel, a coupled compound made from microtubule inhibitors colchicine and paclitaxel / K. Bombuwala et al. // *Beilstein J. Org. Chem.* **2006**. № 2.
- 264. Synthesis and biological evaluation of paclitaxel-thiocolchicine hybrids / B. Danieli et al. // *Chem. Biodivers.* – **2004**. – № 1. – C. 327–345.
- 265. Sarabia, F. Chemistry and biology of novel microtubule-destabilizing agents that bind alfa-tubulin / F. Sarabia, M. Garcia-Castro, A. Sanchez-Ruiz // Curr. Bioact. Compd. 2006. № 2. C. 269–299.
- 266. Inhibitory effect of pironetin analogue/colchicine hybrids on the expression of the VEGF, hTERT and c-Myc genes / C. Vilanova et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015. № 25. C. 3194–3198.
- 267. Homologous series of novel adamantane–colchicine conjugates: synthesis and cytotoxic effect on human cancer cells / N. A. Zefirov et al. // *Mendeleev Commun.* 2018. № 28. C. 308–310.
- 268. Novel antimitotic agents related to tubuloclustin: synthesis and biological evaluation / O. N. Zefirova et al. // *Mol. Divers.* **2017**. № 21. C. 547–564.

- 269. Antiproliferative activity of tubuloclustin and its steroid analogs / O. N. Zefirova et al. // *Pharm. Chem. J.* **2014**. № 48. C. 373–378.
- 270. Unusual tubulin-clustering ability of specifically C7-modified colchicine analogues / O. N. Zefirova et al. // *ChemBioChem.* 2013. № 14. C. 1444–1449.
- 271. Synthesis and SAR requirements of adamantane–colchicine conjugates with both microtubule depolymerizing and tubulin clustering activities / O. N. Zefirova et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2011. № 19. C. 5529–5538.
- 272. Thiocolchicine–podophyllotoxin conjugates: dynamic libraries based on disulfide exchange reaction / Danieli B. et al. // *J. Org. Chem.* **2006**. № 71. C. 2848–2853.
- 273. "Combretatropones"—hybrids of combretastatin and colchicine. Synthesis and biochemical evaluation / C. J. Andres et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993. № 3. C. 565–570.
- 274. Caulerpenyne–colchicine hybrid: Synthesis and biological evaluation / J. Bourdron et al. // *Bioorg. Med. Chem.* **2006**. № 14. C. 5540–5548.
- 275. Synthesis of colchifulvin, a colchicine–griseofulvin hybrid / A. Marset et al. // *Tetrahedron Lett.* **2016**. № 57. C. 1540–1543.
- 276. Discorhabdins and pyrroloiminoquinone-related alkaloids / J.-F. Hu et al. // *Chem. Rev.* **2011**. № 111. C. 5465–5491.
- 277. Synthesis and biological evaluation of novel uracil and 5-fluorouracil-1-yl acetic acidcolchicine conjugate / L. Shen et al. // Chem. Res. Chinese Univ. – 2015. – № 31. – C. 367–371.
- 278. Glycopeptide dendrimer colchicine conjugates targeting cancer cells / E. M. V. Johansson et al. // *Bioorg. Med. Chem.* **2010**. № 18. C. 6589–6597.
- 279. Inhibition of mitosis by glycopeptide dendrimer conjugates of colchicine / D. Lagnoux et al. // *Chem. A Eur. J. –* **2005**. № 11. C. 3941–3950.
- 280. SPIKET and COBRA compounds as novel tubulin modulators with potent anticancer activity / F. M. Uckun et al. // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2000**. № 1. C. 252–256.
- 281. Recent advances in small molecule prodrugs for cancer therapy / P. Wang et al. // *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2014**. № 14. C. 418–439.
- 282. Colchicine prodrugs and codrugs: Chemistry and bioactivities / A. A. Ghawanmeh et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – № 144. – C. 229–242.
- 283. ZD6126: a novel vascular-targeting agent that causes selective destruction of tumor vasculature / P. D. Davis et al. // *Cancer Res.* **2002**. № 62. C. 7247–7253.
- 284. Synthesis of a novel legumain-cleavable colchicine prodrug with cell-specific toxicity / R. L. Smith et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2014. № 22. C. 3309–3315.
- 285. Design, synthesis, and antitumor activity of 4-halocolchicines and their pro-drugs activated by cathepsin B / N. Yasobu et al. // ACS Med. Chem. Lett. – 2011. – № 2. – C. 348–352.
- 286. Synthesis and biological evaluation of colchicine C-ring analogues tethered with aliphatic linkers suitable for prodrug derivatisation / J. Fournier-Dit-Chabert et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. № 22. C. 7693–7696.
- 287. Improvement of hepatocyte-specific gene expression by a targeted colchicine prodrug / S.
 M. W. van Rossenberg et al. // *ChemBioChem.* 2003. № 4. C. 633–639.
- 288. Singh, H. P. Preparation and in vitro, in vivo characterization of elastic liposomes encapsulating cyclodextrin-colchicine complexes for topical delivery of colchicine / H. P. Singh, A. K. Tiwary, S. Jain // Yakugaku Zasshi. – 2010. – № 130. – C. 397–407.
- 289. Antitumor activity of furanoallocolchicinoid-chitosan conjugate / E. V. Svirshchevskaya et al. // Med. Chem. (Los. Angeles). 2016. № 6. C. 571–577.
- 290. Lipophilic prodrugs of a triazole-containing colchicine analogue in liposomes: Biological effects on human tumor cells / N. R. Kuznetsova et al. // *Russ. J. Bioorganic Chem.* –

2013. – № 39. – C. 543–552.

- A polymeric colchicinoid prodrug with reduced toxicity and improved efficacy for vascular disruption in cancer therapy / B. J. Crielaard et al. // Int. J. Nanomedicine. 2011. № 6. C. 2697–2703.
- 292. Liposomes as carriers for colchicine-derived prodrugs: Vascular disrupting nanomedicines with tailorable drug release kinetics / B. J. Crielaard et al. // Eur. J. Pharm. Sci. 2012. Nº 45. C. 429–435.
- 293. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug / Y. Finkelstein et al. // *Clin. Toxicol.* **2010**. № 48. C. 407–414.
- 294. Folpini, A. Colchicine toxicity--clinical features and treatment. Massive overdose case report / A. Folpini, P. Furfori // J. Toxicol. Clin. Toxicol. **1995**. № 33. C. 71–77.
- 295. Colchicine today / E. Niel, J.-M. Scherrmann // *Jt. Bone Spine.* **2006**. № 73. C. 672–678.
- 296. Welsch, M. E. Privileged scaffolds for library design and drug discovery / M. E. Welsch, S. A. Snyder, B. R. Stockwell // *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**. № 14. C. 347–361.
- 297. Akhrem, A. A. The Favorskii rearrangement / A. A. Akhrem, T. K. Ustynyuk, Y. A. Titov // *Russ. Chem. Rev.* **1970**. № 39. C. 732–746.
- 298. Synthetic methods and reactions. 121. Zinc iodide catalyzed preparation of aroyl azides from aroyl chlorides and trimethylsilyl azide / G. K. S. Prakash et al. // J. Org. Chem. 1983. № 48. C. 3358–3359.
- Bandgar, B. P. Synthesis of acyl azides from carboxylic acids using cyanuric chloride / B.
 P. Bandgar, S. S. Pandit // *Tetrahedron Lett.* 2002. № 43. C. 3413–3414.
- 300. Glaser, C. Untersuchungen über einige Derivate der Zimmtsäure / C. Glaser // Ann. der Chemie und Pharm. 1870. № 154. C. 137–171.
- 301. Chinchilla, R. The Sonogashira reaction: a booming methodology in synthetic organic chemistry / R. Chinchilla, C. Nájera // *Chem. Rev.* **2007**. № 107. C. 874–922.
- 302. Vander Heiden, M.G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson // Science. 2009. № 324. C. 1029–1033.
- 303. Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation // Advances in mitochondrial medicine, advances in experimental medicine and biology. Springer Science+Business Media, 2012. P. 287–308.
- 304. Fischer, E. Synthese von Indolderivaten / E. Fischer, O. Hess // Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft. – 1884. – № 17. – C. 559–568.
- 305. Guram, A. S. Palladium-catalyzed aromatic aminations with in situ generated aminostannanes / A. S. Guram, S. L. Buchwald // J. Am. Chem. Soc. – 1994. – № 116. – C. 7901–7902.
- 306. Paul, F. Palladium-catalyzed formation of carbon-nitrogen bonds. Reaction intermediates and catalyst improvements in the hetero cross-coupling of aryl halides and tin amides / F. Paul, J. Patt, J. F. Hartwig // J. Am. Chem. Soc. – 1994. – № 116. – C. 5969–5970.
- 307. Sandmeyer, T. Ueber die Ersetzung der Amidgruppe durch Chlor in den aromatischen Substanzen / T. Sandmeyer // Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft. – 1884. – № 17. – C. 1633–1635.
- 308. Beletskaya, I. P. Copper in cross-coupling reactions / I. P. Beletskaya, A. V. Cheprakov // *Coord. Chem. Rev.* **2004**. № 248. C. 2337–2364.
- 309. Wagaw, S. A palladium-catalyzed strategy for the preparation of indoles: a novel entry into the fischer indole synthesis / S. Wagaw, B. H. Yang, S. L. Buchwald // J. Am. Chem. Soc. 1998. № 120.– C. 6621–6622.
- 310. Hughes, D. L. Progress in the Fischer indole reaction. A review / D. L. Hughes // Org. Prep. Proced. Int. - 1993. - № 25. - C. 607–632.

- 311. Glaser, C. Beiträge zur Kenntniss des Acetenylbenzols / C. Glaser // Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft. – 1869. – № 2. – C. 422–424.
- 312. Yue, D. Synthesis of 2,3-disubstituted benzo[b]furans by the palladium-catalyzed coupling of o- iodoanisoles and terminal alkynes, followed by electrophilic cyclization / D. Yue, T. Yao, R. C. Larock // J. Org. Chem. 2005. № 70. C. 10292–10296.
- Nair, R. N. One-pot formation of functionalized indole and benzofuran derivatives using a single bifunctional ruthenium catalyst / R. N. Nair, P. J. Lee, D. B. Grotjahn // *Top. Catal.* 2010. № 53. C. 1045–1047.
- 314. Palladium(II)-catalyzed C-H activation/C-C cross-coupling reactions: versatility and practicality / X. Chen et al. // Angew. Chem. Int. Ed. 2009. № 48. C. 5094–5115.
- 315. Covalent modification of biomolecules through maleimide-based labeling strategies / K. Renault et al. // *Bioconjug. Chem.* **2018**. № 29.– C. 2497–2513.
- 316. Systematic study of the glutathione (GSH) reactivity of N-arylacrylamides: 1. Effects of aryl substitution / V. J. Cee et al. // J. Med. Chem. 2015. № 58. C. 9171–9178.
- 317. The amido-pentadienoate-functionality of the rakicidins is a thiol reactive electrophile development of a general synthetic strategy / L. L. Clement et al. // Chem. Commun. 2015. № 51. C. 12427–12430.
- 318. Mechanism of action of thalassospiramides, a new class of calpain inhibitors / L. Lu et al // *Sci. Rep.* **2015**. № 5. C. 8783.
- Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of irreversible human rhinovirus 3C protease inhibitors. 1. Michael acceptor structure–activity studies / P. S. Dragovich et al. // J. Med. Chem. 1998. № 41. C. 2806–2818.
- 320. Proteomic studies on protein modification by cyclopentenone prostaglandins: Expanding our view on electrophile actions / B. Garzón et al. // J. Proteomics. 2011. № 74. C. 2243–2263.
- 321. Díez-Dacal, B. A-class prostaglandins: Early findings and new perspectives for overcoming tumor chemoresistance / B. Díez-Dacal, D. Pérez-Sala // Cancer Lett. 2012.
 № 320. C. 150–157.
- 322. The proto-oncometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS dependent signaling
 / L. B. Sullivan et al. // Mol. Cell. 2013. № 51. C. 236–248.
- 323. Lühmann, T. Nanotransporters for drug delivery / T. Lühmann, L. Meinel // Curr. Opin. Biotechnol. - 2016. - № 39. - C. 35-40.
- 324. Dendrimer-based nanocarriers: a versatile platform for drug delivery / H.-J. Hsu et al. // *Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*. **2017**. № 9. C. e1409.
- 325. Rodney, J. Y. H. Trends in translational medicine and drug targeting and delivery: new insights on an old concept—targeted drug delivery with antibody–drug conjugates for cancers / J. Y. H. Rodney, J. Chien // J. Pharm. Sci. 2014. № 103. C. 71–77.
- 326. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells / S. Zununi Vahed et al. // *Mater. Sci. Eng. C.* **2017**. № 71. C. 1327–1341.
- 327. Stimulus-responsive liposomes as smart nanoplatforms for drug delivery applications / P.
 S. Zangabad et al. // Nanotechnol. Rev. 2018. № 7. C. 95–122.
- 328. Expression of group IIa secretory phospholipase A2 increases with prostate tumor grade / J. R. Graff et al. // *Clin. Cancer Res.* 2001. № 7. C. 3857–3861.
- 329. The expression of phospholipase A2 group X is inversely associated with metastasis in colorectal cancer / M. Hiyoshi et al. // *Oncol. Lett.* **2013**. № 5. C. 533–538.
- 330. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention / E. A. Dennis et al. // *Chem. Rev.* 2011. № 111. C. 6130–6185.
- 331. Lateral stress profile and fluorescent lipid probes. FRET pair of probes that introduces minimal distortions into lipid packing / D. S.Tretiakova et al. // *Biochim. Biophys. Acta* -

Biomembr. - 2018. - 1860. - C. 2337-2347.

- 332. Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A2 / B. van den Berg et al. // *EMBO J.* − **1995**. − № 14. − C. 4123–4131.
- 333. Comparative structural studies of two natural isoforms of ammodytoxin, phospholipases A2 from Vipera ammodytes ammodytes which differ in neurotoxicity and anticoagulant activity / F. A. Saul et al. // J. Struct. Biol. – 2010. – № 169. – C. 360–369.
- 334. Enhanced activity and altered specificity of phospholipase A2 by deletion of a surface loop / O. P. Kuipers et al. // *Science*. **1989**. № 244. C. 82–85.
- 335. Vaskovsky, V. E. A universal reagent for phospholipid analysis / V. E.Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, I. M. Vasendin // J. Chromatogr. 1975. № 114. C. 129–141.
- 336. Sn2 lipase labile prodrugs and contact-facilitated drug delivery for lipid-encapsulated nanomedicines / D. Pan et al. // Control of Amphiphile Self-Assembling at the Molecular Level: Supra-Molecular Assemblies with Tuned Physicochemical Properties for Delivery Applications / ed. Ilies M.A. Washington, DC: American Chemical Society, 2017. P. 189– 209.
- 337. Contact-facilitated drug delivery with Sn2 lipase labile prodrugs optimize targeted lipid nanoparticle drug delivery / D. Pan et al. // Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology. – 2016. – № 8. – C. 85–106.
- 338. Fusion, leakage and surface hydrophobicity of vesicles containing phosphoinositides: influence of steric and electrostatic effects / M. Mueller et al. // J. Membr. Biol. 2003. N
 N
 192. C. 33–43.
- 339. Gabizon, A. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors / A. Gabizon, D. Papahadjopoulos // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988. № 85. C. 6949–6953.
- 340. Allen, T. M. Drug delivery systems: entering the mainstream / T. M. Allen, P. R. Cullis // *Science.* – **2004**. – № 303. – C. 1818–1822.
- 341. McIntosh, T. J. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers / T. J. McIntosh // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1978**. № 513 C. 43–58.
- 342. Cullis, P. R. Lateral diffusion rates of phosphatidylcholine in vesicle membranes: Eeffects of cholesterol and hydrocarbon phase transitions / P. R. Cullis // FEBS Lett. 1976. № 70. C. 223–228.
- 343. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo / T. M. Allen et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. № 1066. C. 29–36.
- 344. Neese, F. The ORCA program system / F. Neese // Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 2012. № 2. C. 73–78.
- 345. Alvarez, S. A cartography of the van der Waals territories / S. Alvarez // *Dalt. Trans.* **2013**. № 42. C. 8617–8636.
- 346. Bulacu, M. In silico design of robust bolalipid membranes / M. Bulacu, X. Périole, S. J. Marrink // *Biomacromolecules*. - 2012. - № 13. - C. 196-205.
- 347. Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer / N. R. Kuznetsova et al. // J. Control. Release. – 2012. – № 160. – C. 394–400.