

На правах рукописи

СИТНИКОВ НИКОЛАЙ СЕРГЕЕВИЧ

**МЕТОДОЛОГИИ СИНТЕЗА АНТИМИТОТИЧЕСКИХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ КОЛХИЦИНОВОГО РЯДА**

02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Нижний Новгород – 2012

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

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент
Фёдоров Алексей Юрьевич

Официальные оппоненты: Учреждение Российской академии наук Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН зав. лаборатории органических производных переходных металлов, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор
Федюшкин Игорь Леонидович

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Нижегородская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации зав. кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии, доктор химических наук, профессор
Мельникова Нина Борисовна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН

Защита диссертации состоится _____ 2012 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.05 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, 23, корп. 2, Конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан «___» _____ 2012 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

О.Г. Замышляева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Онкологические заболевания являются одной из наиболее острых проблем современной медицины не только в нашей стране, но и во всем мире. Прогноз 50% увеличения числа онкологических заболеваний к 2020 г. создает потребность в развитии новых противоопухолевых препаратов (Материалы 42-nd International Meeting on Medicinal Chemistry, 5-7 July, 2006, Marseille, France). Ключевая роль митотического веретена в клеточном делении сделала его перспективной мишенью для противоопухолевой химиотерапии. Антимитотические агенты таксол и таксотер относятся к наиболее успешным препаратам, используемым в современной клинической практике. Ряд антимитотических противоопухолевых агентов в настоящее время проходит клинические испытания (СА4Р, омбрабулин, подофиллотоксин, а также несколько соединений колхицинового и аллоколхицинового ряда).

Несмотря на существенный прогресс, достигнутый за последние два десятилетия в разработке новых противоопухолевых химиотерапевтических средств, подавляющее большинство лекарств, применяемых в медицинской практике, а также находящихся на стадии клинических тестов, обладает общими недостатками. К ним относятся низкая селективность биологического действия и, как следствие, высокая системная токсичность, а также снижение терапевтической активности ввиду множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Труднодоступность природных источников и отсутствие промышленно реализуемых путей синтеза (например, в случае таксанов) ограничивает клинические исследования и практическое внедрение многих противоопухолевых препаратов. В связи с этим, актуален поиск новых синтетически доступных антимитотических агентов, имеющих высокий терапевтический индекс (отношение минимальной токсичной дозы к эффективной терапевтической дозе), и улучшение их фармакокинетических параметров (биодоступность, распределение по органам и тканям) путем синтеза пролекарственных форм и создания адресных противоопухолевых препаратов на их основе.

Данная работа посвящена разработке методологий синтеза новых антимитотических противоопухолевых агентов - гетероциклических аналогов природных алкалоидов колхицина и аллоколхицина. Полученные соединения наряду с известным противоопухолевым агентом колхицинового сайта комбретастином А-4 были использованы для получения липофильных пролекарственных форм и создания липосомных систем адресной доставки лекарств на их основе.

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

- 1) Синтез индолсодержащих структурных аналогов природного алкалоида аллоколхицина с целью исследования их противоопухолевых свойств;
- 2) Синтез липофильных производных природных противоопухолевых агентов колхицина, аллоколхицина и комбретастина А-4 с целью их включения в состав липосомных систем адресной доставки лекарств и исследования противоопухолевых свойств.

Объекты исследования. Структурные аналоги аллоколхицина, содержащие 1*H*-индольный фрагмент; (1,2,3-триазол)содержащие структурные аналоги колхицина, аллоколхицина, а также их липофильные производные на основе олеиновой и пальмитиновой кислот; липофильные производные комбретастина А-4, содержащие остатки жирных кислот.

Методы исследования. В работе использованы современные методы тонкого органического синтеза и металлокомплексного катализа. Состав и строение соединений подтверждали физико-химическими методами (ЯМР-, ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, РСА). Для разделения соединений использовали хроматографические методы (ВЭЖХ, ТСХ, флэш-хроматография на силикагеле).

Научная новизна и практическая значимость работы. Предложены и реализованы методологии синтеза четырех структурных типов индолсодержащих аналогов алкалоида аллоколхицина исходя из коммерчески доступных реагентов – 3-(3',4',5'-триметоксифенил)пропионовой кислоты и производных индола. Методом ¹H ЯМР спектроскопии выявлено наличие атропизомеризационного равновесия некоторых аллоколхициноидов в растворе при комнатной температуре.

Установлено, что некоторые из полученных соединений проявляют антимитотическую и апоптоз-индуцирующую активность по отношению к штамму лимфомы Беркитта ВJAB в нано/субнанолярных концентрациях наряду с низкой неспецифической токсичностью.

Показано, что аллоколхициноид 1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*H*-6,7-дигидро-1-гидроксициклогепта[2,3-*e*]1*H*-1''-метилиндол ингибирует фазу G2/M клеточного цикла и индуцирует апоптоз нескольких штаммов клеток хронического лимфолейкоза в наномолярном интервале концентраций. Установлено, что данное соединение по цитотоксичности превосходит клинический препарат винкристин, используемый в терапии лимфолейкозов.

Синтезированы новые 7-триазолилзамещенные аналоги колхицина и аллоколхицина, а также их липофильные формы. Предложен механизм перегруппировки колхицинового молекулярного скелета в аллоколхициновый. Получены липофильные пролекарственные формы природного противоопухолевого агента комбретастина А-4.

Липофильные производные колхицина и комбретастина А-4 использованы для создания противоопухолевых липосом. Установлено, что производные колхицина и их липосомные формы проявляют цитотоксическую активность по отношению к пяти штаммам опухолевых клеток человека в наномолярном интервале концентраций. Липосомный препарат на основе олеоильного производного комбретастина А-4, содержащий адресные углеводные векторы SiaLe^X, продемонстрировал способность подавлять развитие опухоли у мышей линии BLRB/BYRB со спонтанно возникающим раком молочной железы.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Синтез индолсодержащих структурных аналогов аллоколхицина, липофильных производных колхицина, аллоколхицина, комбретастина А-4 выполнен в полном объеме лично диссертантом. Соискатель принимал активное участие в постановке цели и задач исследования, разработке структур целевых биологически активных молекул и методологий их получения, анализе результатов биологических исследований синтезированных соединений.

На защиту выносятся следующие положения:

- экспериментальные данные о синтезе индолсодержащих структурных аналогов аллоколхицина;
- экспериментальные данные о синтезе липофильных производных колхицина, аллоколхицина, комбретастина А-4;
- результаты исследования структуры полученных соединений физико-химическими методами;
- результаты исследования биологической активности полученных соединений.

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

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на международной конференции «International congress on Organic Chemistry» (Казань, 2011), XIV Молодежной конференции по органической химии (Екатеринбург, 2011),

15- и 16-ой Нижегородской сессии молодых ученых (естественнонаучная секция, г. Н.Новгород, 2010, 2011), 13- и 14-ой Конференции молодых ученых-химиков г. Н.Новгорода (2010, 2011), молодежной конференции «Topical problems of Organic Chemistry» (Казань, 2010), Международной конференции «Topical problems of organometallic and coordination chemistry. V Razuvaev lectures» (Нижний Новгород, 2010), Всероссийской конференции по органической химии (Москва, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи и тезисы 5 докладов на международных и всероссийских научных конференциях.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обоснования диссертационных исследований, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы (265 наименований) и одного приложения. Работа изложена на ___ страницах машинописного текста, включает ___ схем, ___ рисунков, ___ таблиц. Литературный обзор посвящен обсуждению известных методологий синтеза аллоколхицина и его структурных аналогов. В разделе «Обоснование диссертационных исследований» приводится информация о корреляции структура - физиологическая активность для противоопухолевых агентов колхицинового сайта клеточного белка тубулина, на основании которой предложены структуры целевых биологически активных молекул. В данном разделе также обосновывается перспективность применения липофильных форм противоопухолевых антимитотических агентов в составе липосомных систем адресной доставки лекарств.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Германской службы академических обменов (DAAD A0879551), Совета по грантам при Президенте РФ (МД_5606.2010.3), РФФИ (09-03-00647а), ФЦП (16.740.11.0476 и 14.740.12.1382).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез индолсодержащих структурных аналогов аллоколхицина

В работе предложены и реализованы методологии синтеза соединений **I-IV** – структурных аналогов природного антимитотического агента аллоколхицина (рис. 1).

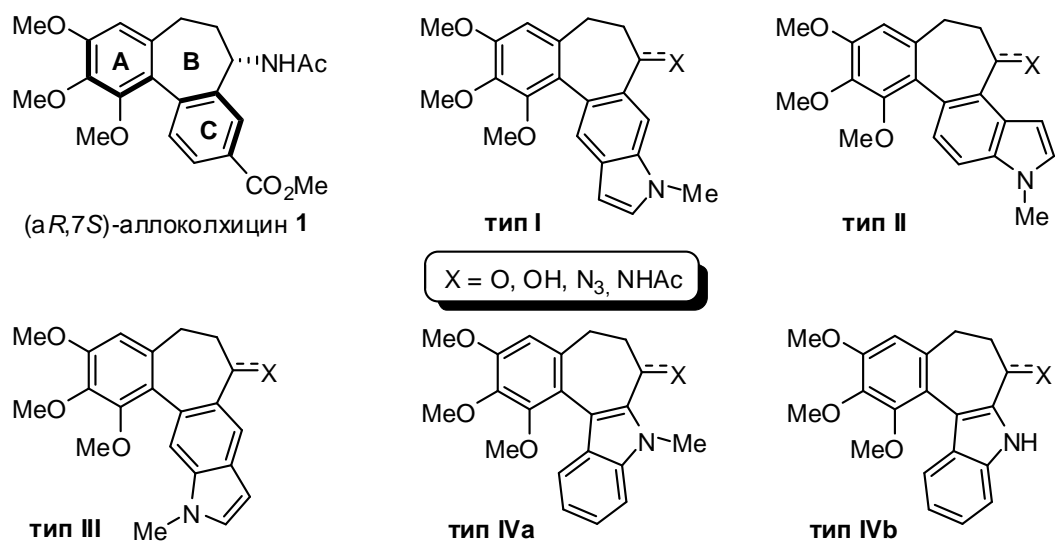


Рис. 1 Аллоколхицин и его гетероциклические структурные аналоги **I-IV**

Целевые производные **I-IV** сочетают в своей структуре циклы **A** и **B** алкалоида **1** и аннелированный *1H*-индольный фрагмент, который, в свою очередь, является фармакофорной группой 4-гетероарилкумаринов, гетерокомбретастинов и индолобензазепинов (рис. 2) – известных противоопухолевых агентов, общей биологической мишенью которых, подобно аллоколхицину **1**, является клеточный белок тубулин.

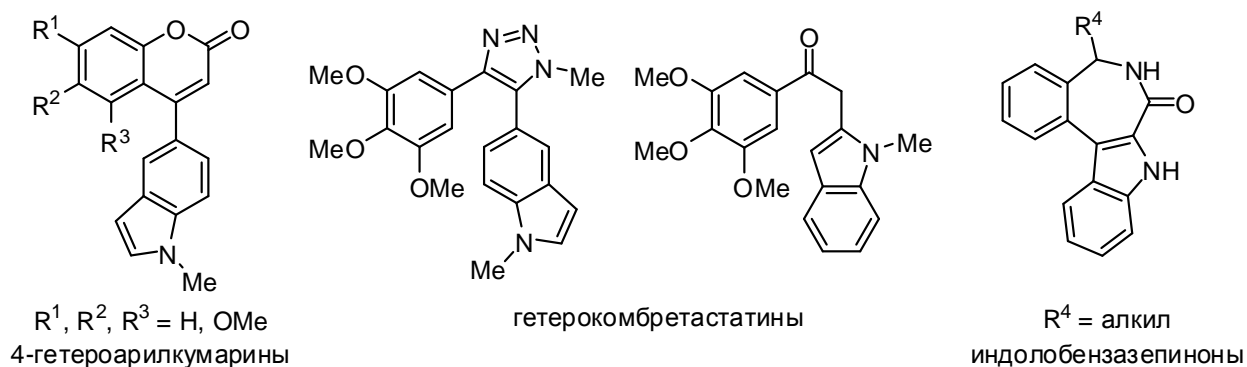
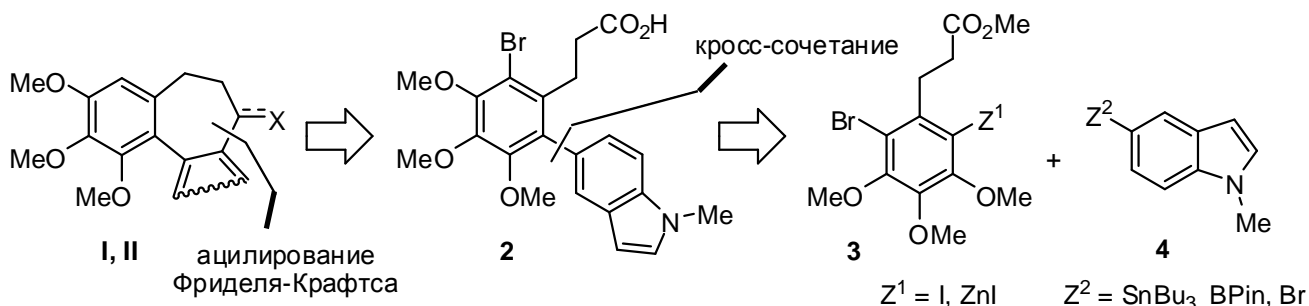


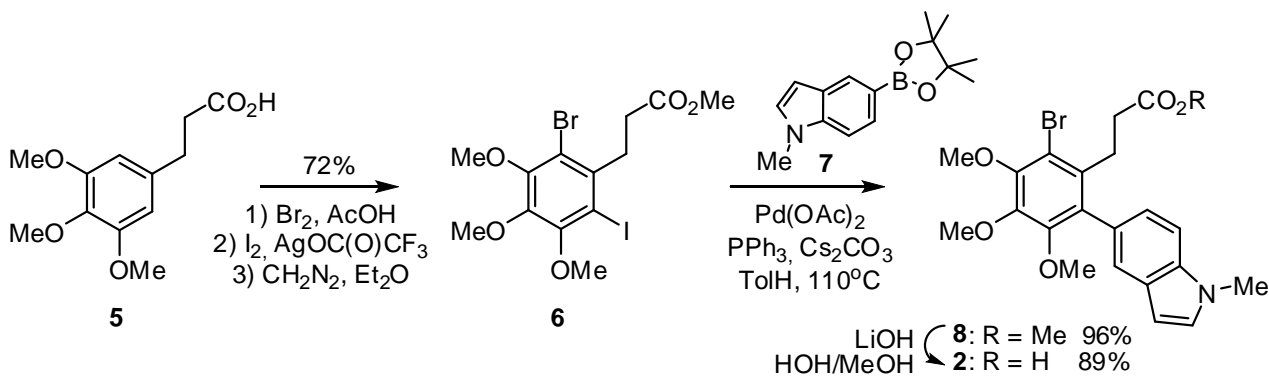
Рис. 2 Антимитотические противоопухолевые агенты, содержащие *1H*-индольный фармакофорный фрагмент

1.1. Синтез аллоколхициноидов I, II

Структурной особенностью соединений **I**, **II** (рис. 1) является расположение атома азота в пара-положении по отношению к связи арил-арил'. Поэтому оба типа производных было решено синтезировать исходя из общего синтетического интермедиата **2** по реакции ацилирования Фриделя-Крафтса (схема 1). Атом брома в соединении **2** выполняет роль защитной группы, предотвращающей электрофильную атаку в электрононасыщенный триметоксифенильный фрагмент.



Исследована применимость различных реагентов с общими формулами **3** и **4** для получения ключевого синтетического интермедиата **2**. Показано, что реакция галоген-селективного кросс-сочетания Сузуки-Мияура между борорганическим производным индола **6** и арилиодидом **7** в присутствии каталитической системы $\text{Pd}(\text{OAc})_2 - \text{PPh}_3 - \text{Cs}_2\text{CO}_3$ позволяет получить биарил **8** с высоким выходом (схема 2). С использованием данной реакции, соединение **2** было синтезировано из коммерчески доступной кислоты **5** в 5 стадий с суммарным выходом 62% (схема 2).



На следующей стадии кислоту **2** по реакции с 1-хлоро-*N,N*,2-триметил-1-пропениламином превращали в хлорангидрид **9**, который в присутствии двукратного избытка хлорида цинка претерпевал внутримолекулярное ацилирование Фриделя-Крафтса (схема 3). Применение данного подхода позволило получить региоизомеры **10** и **11** в соотношении 4:1 с суммарным выходом 40%. Другие кислоты Льюиса (AlCl_3 , ZnBr_2 , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$, EtAlCl_2 , Et_2AlCl) оказались менее эффективны.

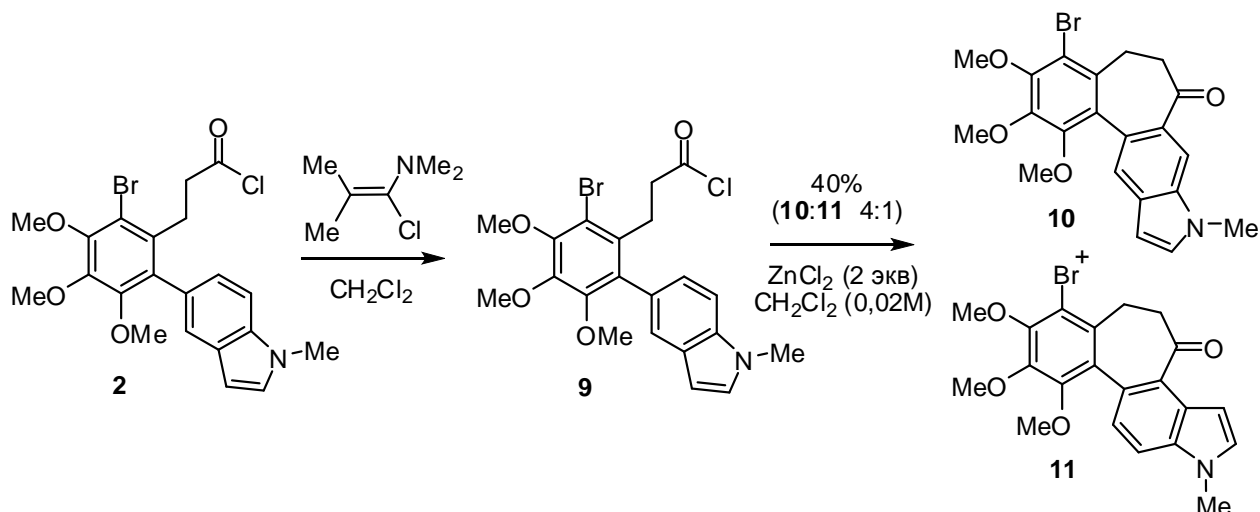


Схема 3

Удаление брома в соединениях **10**, **11** проводили по реакции восстановительного дегалогенирования трибутилстаннаном в присутствии ДАК (схема 4). Выход продуктов **12**, **13** составил 92% и 90% соответственно.

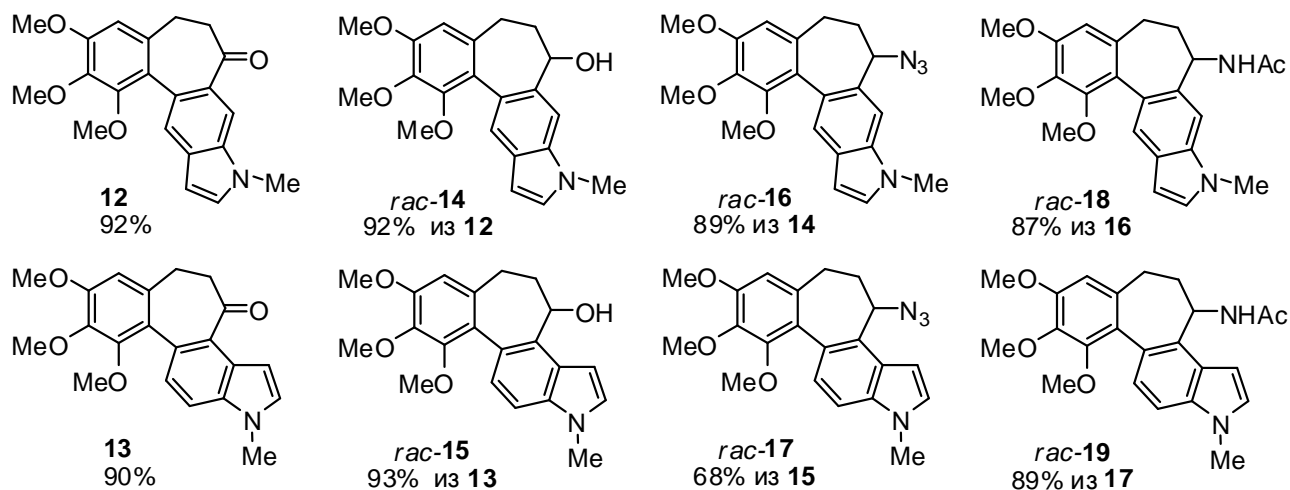
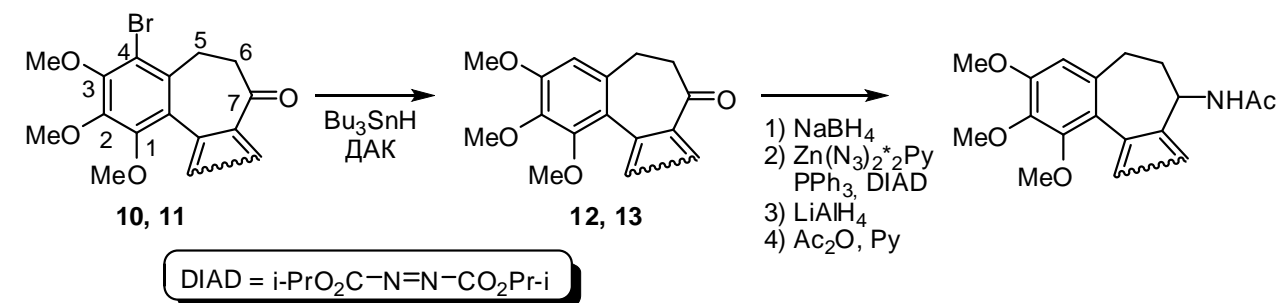


Схема 4

Последующие реакции взаимопревращения функциональных групп, включающие восстановление карбонильной группы боргидридом натрия, замещение гидроксильной группы на азидную по реакции Митсунобу, восстановление азида алюмогидридом лития и ацилирование полученного амина уксусным ангидридом в пиридине позволили с хорошими-высокими выходами синтезировать ряд аллоколхициноидов **14-19**, содержащих различные С-7 функциональные группы (схема 4).

Методом ^1H ЯМР спектроскопии показано, что продукты **14-19** претерпевают атропоизомеризацию в растворе при комнатной температуре (схема 5).

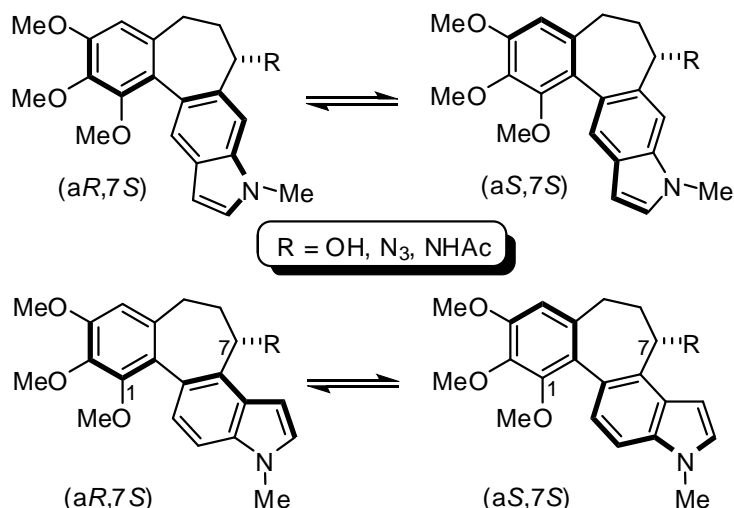


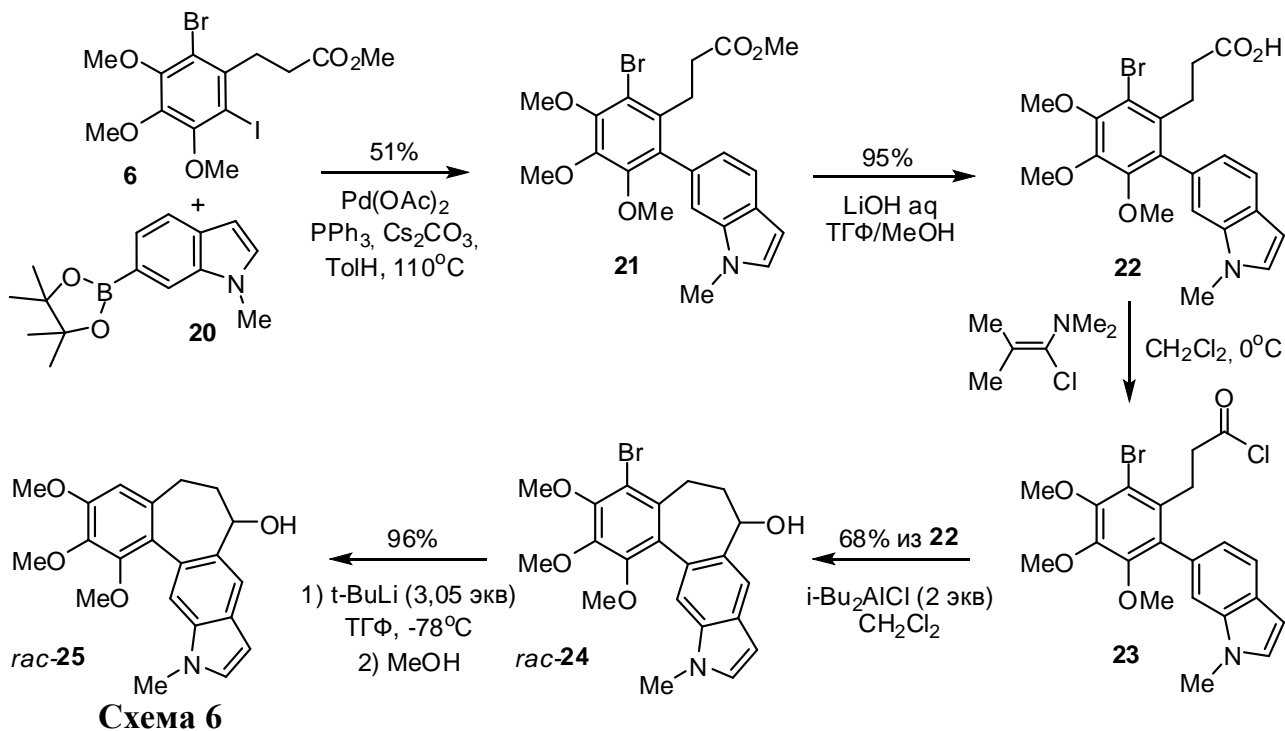
Схема 5

Соотношение стереоизомеров изменяется в зависимости от полярности растворителя, что может быть обусловлено различной энергией сольватации C-7 функциональной группы в диастереомерных молекулах.

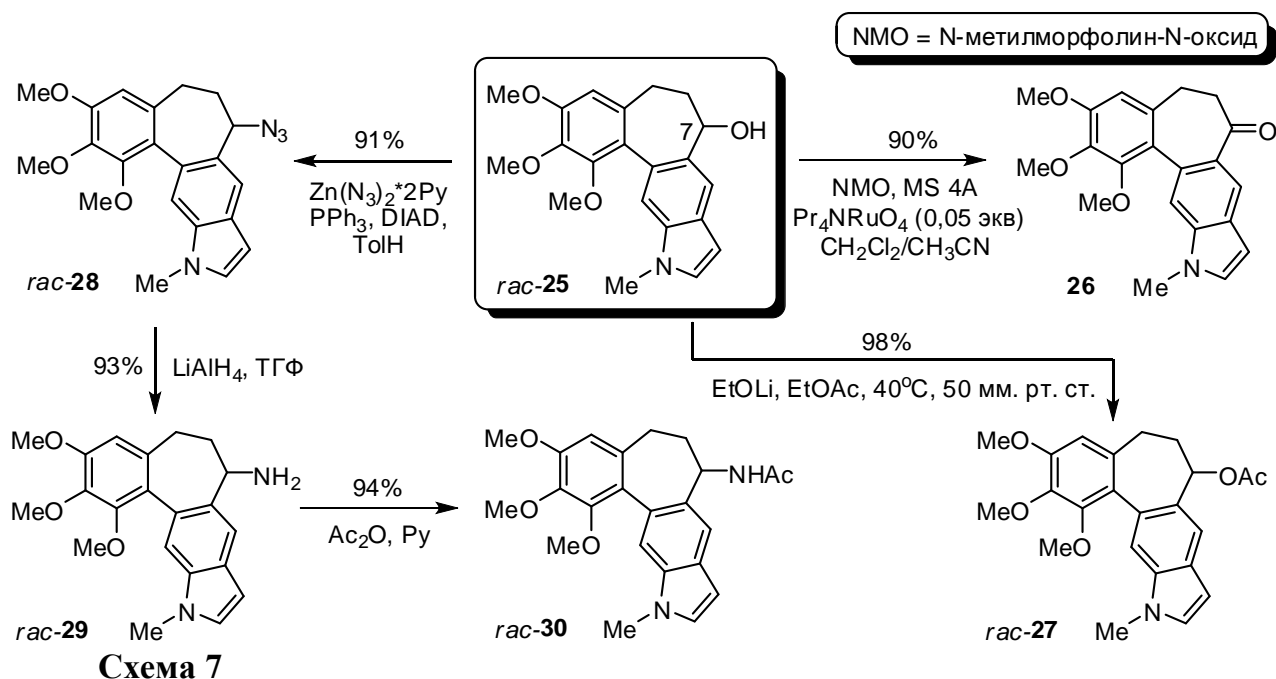
1.2. Синтез аллоколхициноидов III

Соединения **III** были получены с применением описанного выше синтетического подхода. Реакция кросс-сочетания Сузуки-Мияура между арилгалогенидом **6** и борорганическим производным индола **20** приводила к биарилу **21**, сложноэфирную группу которого подвергали основному гидролизу (схема 6). Выход производного **22** после двух стадий составил 48%. Кислоту **22** превращали в хлорангидрид **23**, который при действии двукратного избытка диизобутилалюминийхлорида претерпевал внутримолекулярное ацилирование Фриделя-Крафтса и *in situ* восстановление карбонильной группы*. Выход тетрациклического спирта **24** составил 68%. Удаление брома в соединении **24** по реакции с *tert*-бутиллитием в тетрагидрофуране позволило получить продукт **25** с выходом 96%.

* Насколько нам известно, возможность применения диизобутилалюминийхлорида для проведения реакции Фриделя-Крафтса с последующим *in situ* восстановлением карбонильной группы показана нами впервые.



Производное **25** является субстратом для получения аллоколхициноидов с различными С-7 функциональными группами (схема 7). Так, окисление соединения **25** N-метилморфолин-N-оксидом в присутствии каталитического количества перрутената тетрапропиламмония (реакция Лея) приводило к кетону **26** с выходом 90%. Превращение спирта **25** в ацетат **27** было осуществлено с выходом 98% по реакции переэтерификации с этилацетатом. Взаимодействие соединения **25** с азидом цинка в условиях реакции Митсунобу завершалось образованием продукта **28** (выход 93%), который был восстановлен алюмогидридом лития до амина **29** (выход 93%). Ацилирование последнего уксусным ангидридом в пиридине приводило к ацетамиду **30** с выходом 94%.



1.3. Синтез аллоколхициноидов IVa

Для формирования семичленного цикла аллоколхициноидов **IVa** нами предложено использовать реакцию внутримолекулярного каталитического C-H арилирования арилиодида **31**, который, в свою очередь, может быть получен по методу синтеза кетонов Вайнреба (схема 8).

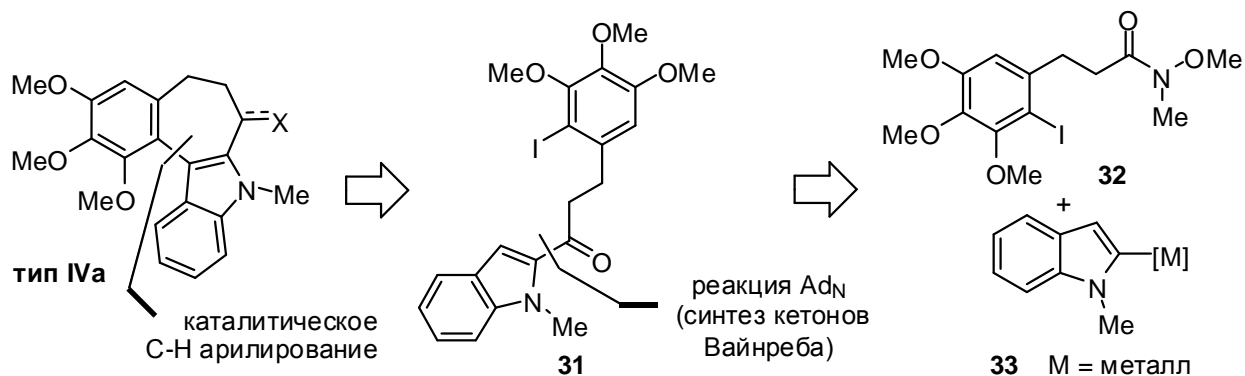


Схема 8

Амид Вайнреба **32** был синтезирован из коммерчески доступной кислоты **5** в 2 стадии с выходом 91% (схема 9). 1-Метилиндол **34** превращали в церийорганический реагент **36** с помощью реакции металлирования *tert*-бутиллитием и трансметаллирования хлоридом церия(III). Металлорганический реагент **36** использовали *in situ* в реакции с электрофилом **32**. Оптимизация условий проведения трех *one pot* стадий позволила получить кетон **31** с выходом 78% при использовании мультиграммовых количеств исходных субстратов. Показано, что реакция литийорганического соединения **35** с амидом **32** приводит к целевому продукту **30** с выходом не более 8%. Следует отметить, что гетероароматические соединения церия (III) к настоящему моменту практически не изучены.

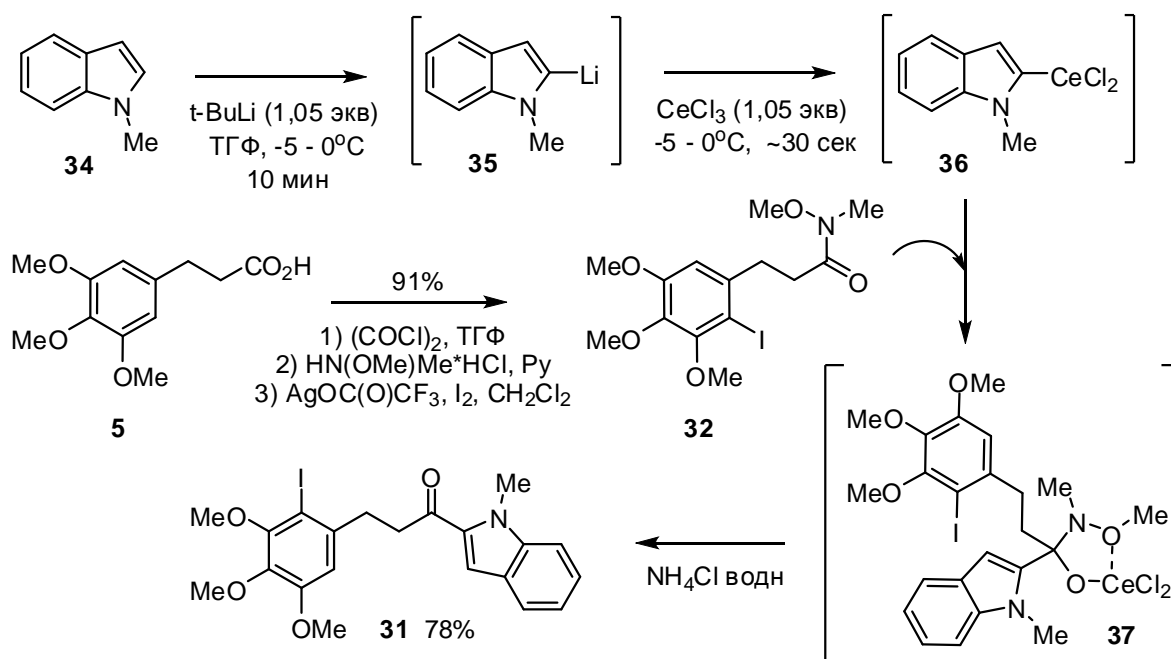


Схема 9

Превращение производного **31** в тетрациклический кетон **38** было осуществлено с выходом 71% по реакции внутримолекулярного каталитического С-Н арилирования в присутствии каталитической системы Pd(OAc)₂ – Cs₂CO₃ – *t*-BuCOOH – ДМФ (схема 10). Показано, что энантиоселективное восстановление кетона **38** боран-тетрагидрофурановым комплексом в присутствии (*S*)-метилоксазаборолидина **39** (восстановление Кори-Бакши-Шибата) приводит к образованию спирта **40** с выходом 90% и 89% ee (схема 10).

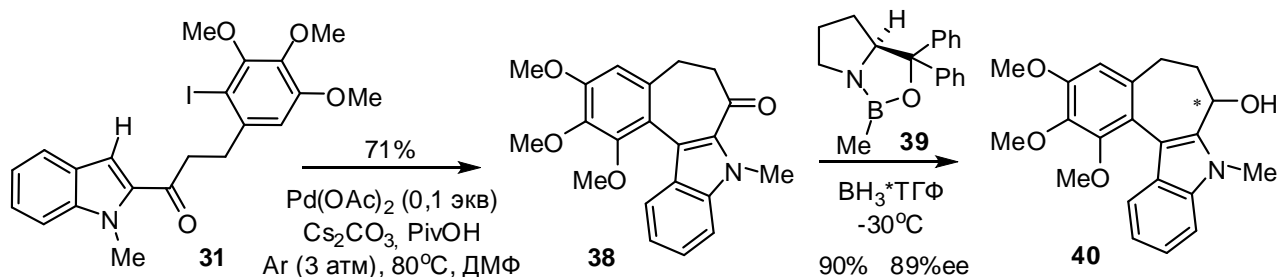


Схема 10

Соединение **40** подвержено легкой дегидратации, в связи с этим превращение кетона **31** в целевой ацетамид **42** было осуществлено через промежуточное образование оксима **41**, который восстанавливали системой боргидрид натрия – хлорид никеля(II) и ацилировали уксусным ангидридом в пиридине (схема 11). Выход продукта **42** после трех стадий составил 43%.

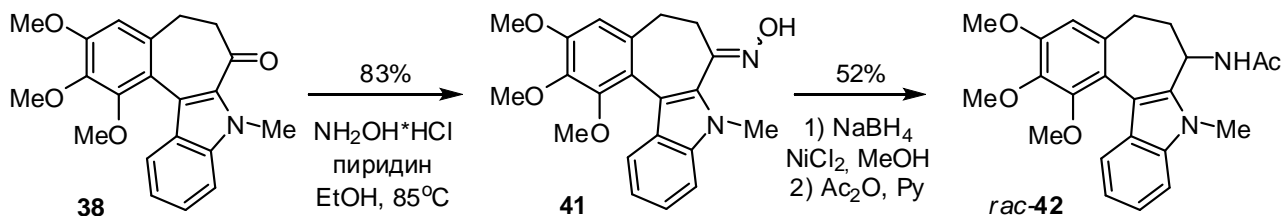


Схема 11

Установлено, что реакция восстановления оксима **41** алюмогидридом лития в тетрагидрофуране протекает иным образом и приводит к азиридину **43**, который при хроматографировании на силикагеле системой растворителей дихлорметан - метанол претерпевает раскрытие цикла с образованием α -метоксиамина **44** (схема 12). Ацилирование производного **44** уксусным ангидридом в присутствии пиридина завершается образованием продукта **45**. Ацетамид **45** получен в виде смеси диастереомеров в соотношении ~5:1 с выходом 42% относительно исходного оксима **41**. Структура соединения **45** подтверждена методом ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения и РСА (транс-диастереомер).

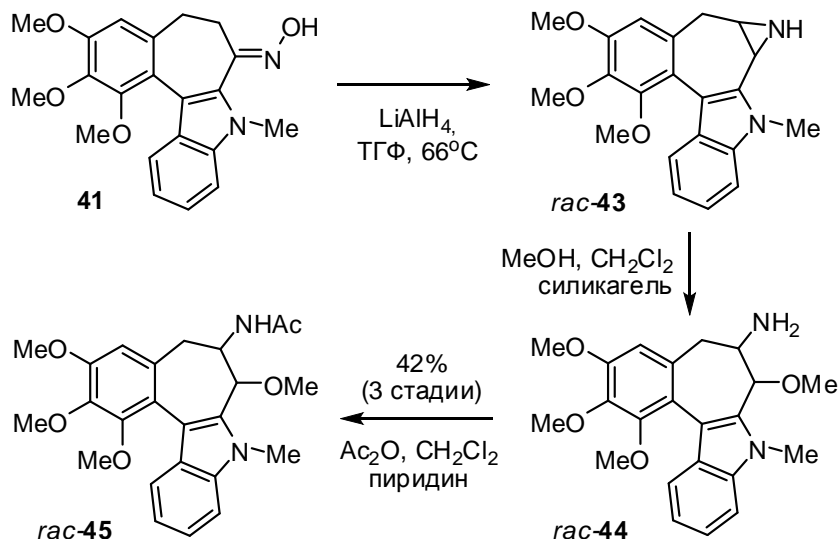


Схема 12

1.4. Синтез аллоколхициноидов IVb

По аналогии с соединениями IVa, для формирования семичленного цикла аллоколхициноидов IVb нами предложено использовать реакцию внутримолекулярного каталитического C-N арилирования производного 46 (схема 13). Применение описанного выше метода синтеза кетонов Вайнреба позволило получить соединение 46 с выходом не более 20%. Поэтому был использован альтернативный подход, включающий реакцию конденсации индолилкетона 47 и бензальдегида 48 и гидрирование двойной связи полученного енона.

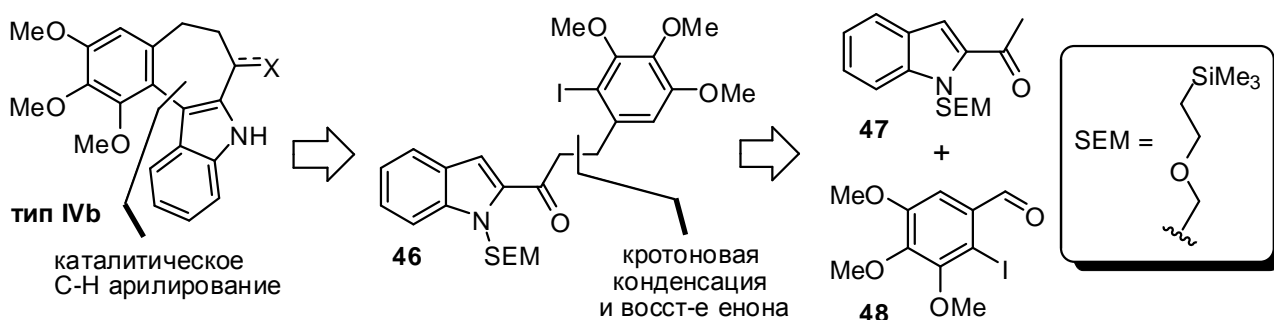


Схема 13

Синтез начинали с превращения 1*H*-индол-2-карбоновой кислоты 49 в кетон 47 с помощью реакций нуклеофильного присоединения метиллития и N-алкилирования 2-(хлорометокси)этилтриметилсианом (схема 14). Выход производного 47 составил 86%. Арилиодид 48 был получен из коммерческого реагента 51 с выходом 92% по реакции с *N*-йодосукцинимидом в присутствии каталитического количества трифторуксусной кислоты. Кратоновая конденсация соединений 47 и 48 в условиях основного катализа приводила к образованию сопряженного енона 52 с выходом 93%.

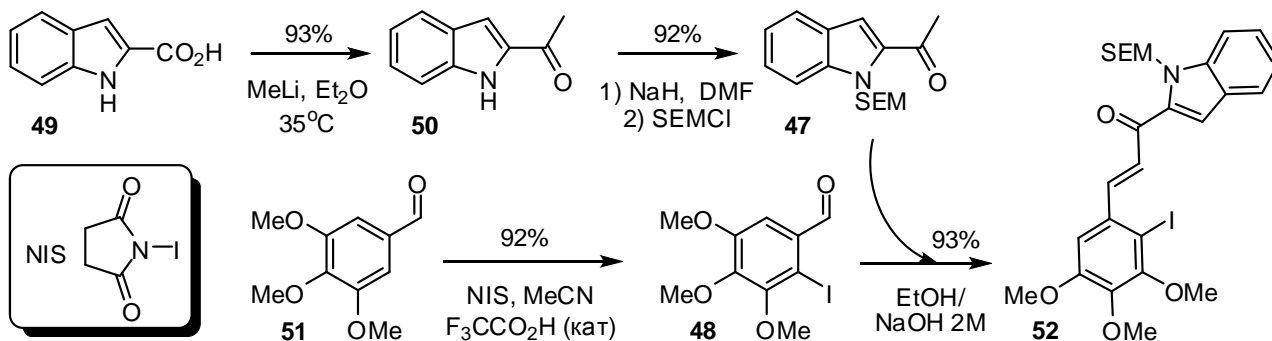


Схема 14

Проведен скрининг методов восстановления халконовых систем с целью превращения продукта **52** в синтетический интермедиат **46** (схема 15). Показано, что реакция енона **52** с гидридным комплексом меди $(PPh_3CuH)_6$ (реагент Страйкера) в бензоле в присутствии стехиометрического количества воды приводит к образованию продукта восстановления **46** с высоким выходом. Реакция внутримолекулярного каталитического C-H арилирования соединения **46** в присутствии каталитической системы $Pd_2(dba)_3 - t-BuCOOCs$ – ДМФ протекала с образованием тетрациклического продукта **53** (выход 68%). Удаление защитного SEM-фрагмента в производном **53** кислотным гидролизом в этаноле и восстановление карбонильной группы боргидридом натрия позволили получить аллоколхициноиды **54**, **55** с высокими выходами (схема 15).

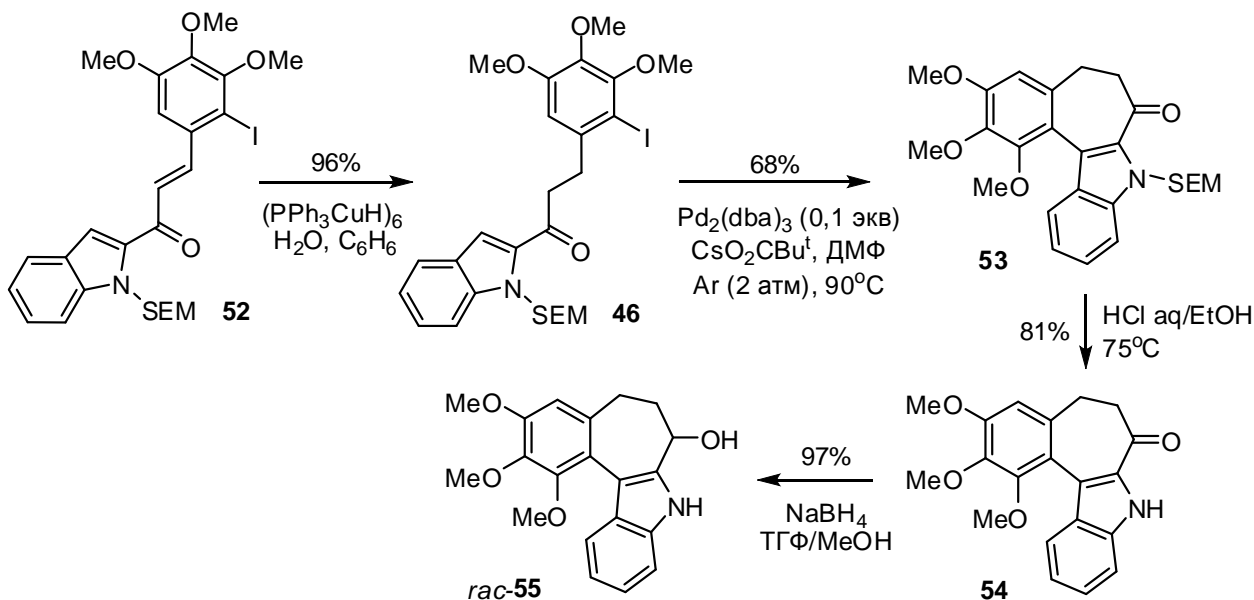


Схема 15

1.5. Результаты исследования противоопухолевой активности аллоколхициноидов I-IV

Определена цитотоксическая активность аллоколхициноидов I-IV по отношению к штамму лимфомы Беркитта ВJAB (Таблица 1).^{*} Выявлен ряд соединений (12-15, 18, 19, 25-27), ингибирующих клеточное деление и вызывающих апоптоз в наномолярном/субнаномолярном интервале концентраций. С помощью LDH-теста показана низкая неспецифическая токсичность указанных производных в концентрациях 0,001-100 мкМ.

Таблица 1 Цитотоксическая активность аллоколхициноидов I-IV по отношению к штамму лимфомы Беркитта ВJAB

структурн. тип (рис.1)	X	№ соед	IC ₅₀ ¹ [мкМ]	AC ₅₀ ² [мкМ]	Ингибир-е пролиферации при AC ₅₀ [%]	Некроз при AC ₅₀ [%] ³
колхицин			0,02	0,03	-	-
I	O	12	0,001-0,005	0,005	84	0
	OH	14	0,01-0,05	0,1	83	1
	N ₃	16	0,1-0,5	0,1-0,5	32-93	0
	NHAc	18	0,05-0,1	0,1-0,5	76-99	0
II	O	13	<0,001	<0,001	83 (при 0,001M)	0
	OH	15	0,005-0,01	0,01	85	0
	NHAc	19	0,01-0,05	0,01-0,05	24-84	4
III	OH	25	0,001	0,001	52	7
	O	26	0,01-0,05	0,05	98	4
	OAc	27	0,01-0,05	0,05	89	0
	N ₃	28	~50	>100	30	1
	NH ₂	29	0,5-1	5	90	29
	NHAc	30	>100	>100	-	-
IV	NHAc	42	0,1-0,5	0,5	70	20
V	O	54	>100	>100	-	-
	OH	55	>100	>100	-	-

¹ – концентрация вещества, ингибирующая деление клеток на 50%; параметр определен методом *CASY cell counting* после 48 часов инкубации

² – концентрация вещества, вызывающая апоптоз 50% клеток; параметр определен по фрагментации ДНК после 72 часов инкубации

³ – параметр определен с помощью LDH-теста после 1 часа инкубации

Наиболее активными среди исследованных структурных изомеров являются аллоколхициноиды II, содержащие 4,5-аннелированный 1-метилиндольный фрагмент. С-7 функциональная группа оказывает существенное влияние на цитотоксические

* Исследования проведены в группе Dr. A. Prokop, Отделение педиатрической гематологии/онкологии, Детский госпиталь г. Кельн, Германия.

свойства. Общей тенденцией является более высокая активность производных, содержащих C(7)-O связь (рис.1, X = O, OH, OAc) по сравнению с соответствующими C(7)-N аналогами (X = N₃, NH₂, NHAc).

Исследовано влияние аллоколхициноидов **I**, **II** в концентрации 50 нМ на метаболическую активность клеток хронического лимфолейкоза Мес-1 (Таблица 2).^{*} Наибольшее снижение метаболической активности вызвало соединение **15**.

Таблица 2 Цитотоксическая активность аллоколхициноидов **I,II** по отношению к штамму хронического лимфолейкоза Мес-1 по результатам ХТТ-теста

	колхицин	12	13	14	15	16	18	19
метаболическая активность [%] ¹	10	100	32	35	26	98	77	82

¹ Величина рассчитана относительно контрольного эксперимента без терапевтического агента

Проведен сравнительный анализ апоптоз-индуцирующей активности аллоколхициноида **15**, колхицина и клинического препарата винкристина по отношению к нескольким штаммам хронического лимфолейкоза, в том числе к первичным клеткам (CLL1-CLL4), полученным после проведения биопсии у четырех пациентов. На основании полученных данных рассчитаны параметры IC₅₀ (таблица 3). В случае первичных клеток CLL1-4 цитотоксичность аллоколхициноида **15** превысила активность винкристина и уступила активности колхицина.

Таблица 3 Цитотоксическая активность аллоколхициноида **15**, колхицина и винкристина по отношению к различным штаммам хронического лимфолейкоза по результатам проточной цитометрии FACS

	IC ₅₀ [нМ]					
	Мес-1	SU-DHL-5	CLL1	CLL2	CLL3	CLL4
колхицин	13	10	20	14	11	22
15	11	11	60	76	33	57
винкристин	45	~ 0,4	172	90	119	126

Показано, что механизм биологического действия аллоколхициноида **15** аналогичен таковому для колхицина и винкристина и заключается в нарушении формирования веретена деления клетки, ведущем к остановке клеточного цикла в фазе G2/M, и, впоследствии, к апоптозу.

^{*} Исследования проведены в группе Dr. G. Krause, Department of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology Köln Bonn, Кёльнский университет, Германия.

2. Синтез липофильных производных колхицина, аллоколхицина и комбретастина А-4

2.1. Синтез липофильных производных колхицина и аллоколхицина

В работе синтезированы новые 7^{*}-(1',2',3'-триазилил)замещенные аналоги природных противоопухолевых агентов колхицина и аллоколхицина, а также их липофильные формы на основе олеиновой и пальмитиновой кислот.

Целевые соединения были получены в 5-6 стадий из природного колхицина **56** (схема 16). Трехстадийное удаление ацетильной группы алкалоида **56** проводили в соответствии с известной методикой [*J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8987]. Дезацетилколхицин **59** превращали в азид **60** по реакции диазотрансфера с трифлилазидом в присутствии карбоната калия и каталитического количества сульфата меди(II). Применение данного подхода позволило получить продукт **60** с суммарным выходом 4 стадий 48%.

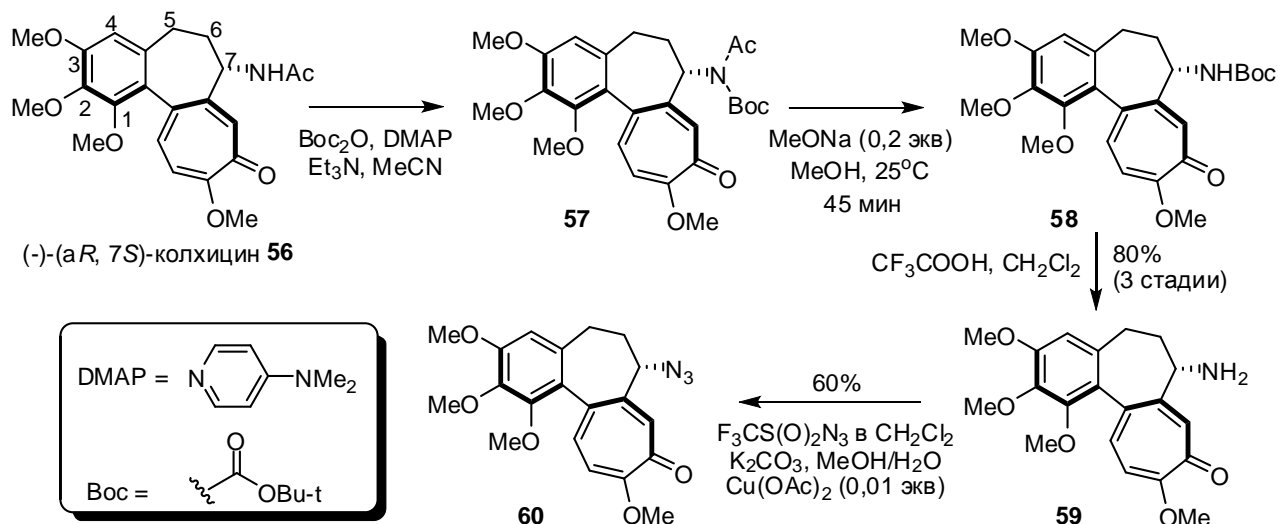


Схема 16

Превращение колхициноида **60** в алло-аналог **63** было осуществлено с применением классической методики, описанной Фернхольцем в 1950 году для аналогичной трансформации (нагревание с избытком метилата натрия в метаноле, схема 17) [*Liebigs Ann. Chem.* **1950**, *568*, 63]. Возможный механизм данной основно-катализируемой перегруппировки с сокращением цикла представлен на схеме 17. Мы предполагаем, что на первом этапе происходит обратимое нуклеофильное присоединение метокси-аниона к карбонильной группе трополонового фрагмента, приводящее к неароматическому интермедиату **61**, который далее претерпевает термическую дисротаторную б π -электроциклизацию с образованием норкаррадиена

* Использована нумерация колхицина, схема 15

62. Фрагментация циклопропанового кольца интермедиата **62** сопровождается перераспределением кратных связей и элиминированием метокси-аниона, приводя к ароматическому аллоколхициноиду **63**.

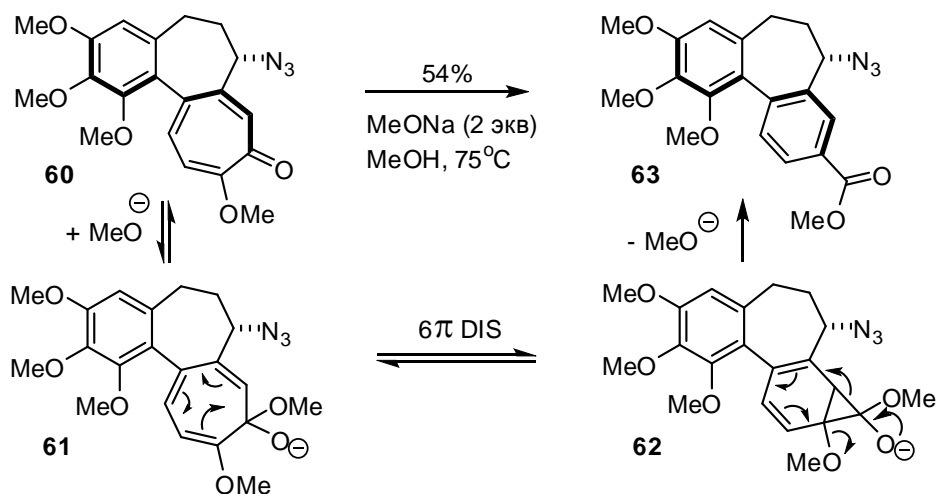


Схема 16

Азиды **60** и **63** использовали в реакции медь(I)-катализируемого диполярного [3+2]-циклоприсоединения с пропаргильным спиртом и пропаргильными эфирами олеиновой и пальмитиновой кислот (схема 18).

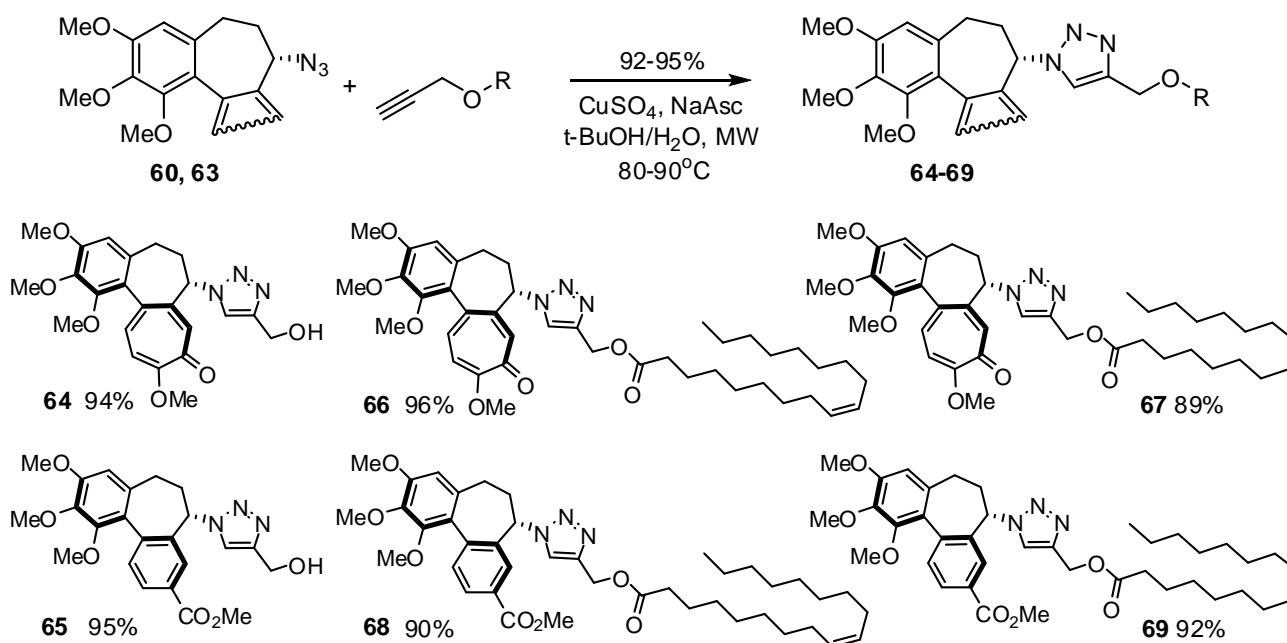


Схема 18

Проведение взаимодействия в микроволновом реакторе в присутствии каталитической системы CuSO_4 – аскорбат натрия – $t\text{-BuOH}$ – H_2O позволило получить целевые триазолсодержащие соединения **64**, **65** и их липофильные пролекарственные формы **66-69** с выходами 89-96%.

Следует отметить, что производные **66-69** содержат биodeградируемую сложноэфирную связь, способную претерпевать внутриклеточный гидролиз под действием ферментов (эстераз) с высвобождением исходного терапевтического агента

(64 либо 65). Эти соединения были использованы для включения в состав липосомных частиц-носителей лекарств.

2.2. Результаты исследования противоопухолевой активности соединений 58-63 и липосомных препаратов на их основе

С помощью DAPI-теста изучена способность соединений 64-69 ингибировать полимеризацию белка тубулина, который является биологической мишенью колхицина.* Показано, что производные 64 и 65 ингибируют полимеризацию белка (3 мг/мл) в концентрации 40 мкМ. Колхициноиды 66, 67 проявляют умеренную ингибирующую активность в данной концентрации, в то время как аллоколхициноиды 68, 69 не оказывают воздействия на полимеризационный процесс. Известно, что колхицин ингибирует полимеризацию тубулина (3 мг/мл) в концентрации 3 мкМ [*ChemMedChem* 2010, 5, 661].

Исследована антимитотическая и апоптоз-индуцирующая активность соединений 64-69 по отношению к штамму лимфомы ВЈАВ (таблица 4)†.

Таблица 4 Цитотоксическая активность соединений 64-69 по отношению к штамму лимфомы Беркитта ВЈАВ

	Колхицин	64	66	67	65	68	69
IC ₅₀ [нМ] ¹	20	25	4	6	300	15000	20000
AC ₅₀ [нМ] ¹	30	25	8	8,5	800	10000	18000

¹ - параметр определен методом *CASY cell counting* после 48 часов инкубации

² - параметр определен по фрагментации ДНК после 72 часов инкубации

Показано, что цитотоксичность колхициноида 64 примерно равна активности колхицина, в то время как липофильные пролекарства 66, 67 являются более эффективными ингибиторами клеточного деления. Поскольку способность производных 66, 67 нарушать полимеризацию тубулина ниже таковой для соединения 64, повышение их противоопухолевой активности *in vitro* может быть обусловлено вторичными эффектами, такими как улучшенный транспорт липофильных форм сквозь плазматическую мембрану клетки. С помощью LDH-теста показана низкая неспецифическая токсичность соединений 66, 67 в интервале концентраций 1 нМ – 100 мкМ (после инкубации в течение 1ч некроз клеток ВЈАВ составил не более 3%).

* Исследования проведены в группе Prof. H. Oschkinat, Институт молекулярной фармакологии, Берлин

† Исследования проведены в группе Dr. A. Prokop, Отделение педиатрической гематологии/онкологии, Детский госпиталь г. Кельн, Германия.

В отличие от производных колхицина, алло-аналог **65**, и, в особенности, его липофильные производные **68**, **69** продемонстрировали на несколько порядков меньшую цитотоксичность.

Методом экструзии получены моноламеллярные липосомы (85 ± 36 нм), состоящие из природных фосфолипидов (фосфатидилхолин /фосфатидилинозит, 8:1, 90 мольн%) и липофильного производного **66** либо **67** (10 мольн%)* (рис. 3).

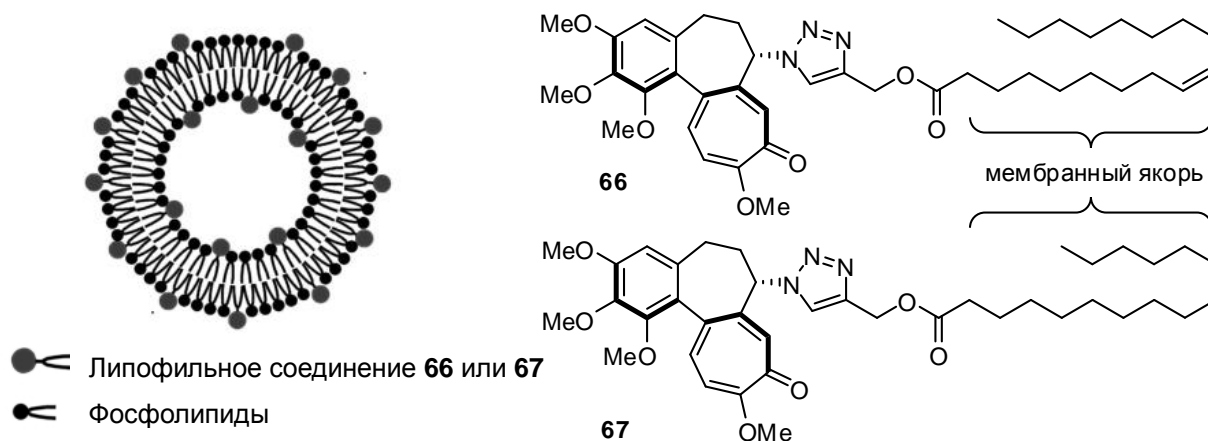


Рис. 3 Состав терапевтических липосом

Исследована *in vitro* противоопухолевая активность колхициноида **64**, соединений **66**, **67**, а также их липосомных форм **L66** и **L67** по отношению к нескольким типам опухолевых клеток человека (таблица 5). Данные препараты проявляют цитотоксические свойства в наномолярных концентрациях (2,5 – 100 нМ) и оказывают дозозависимый ингибирующий эффект на клеточную пролиферацию. Все линии опухолевых клеток, за исключением Т-лимфомы Jurkat, показали более высокую чувствительность к липофильным производным **66**, **67** по сравнению с колхициноидом **64**. Включение олеоильного эфира **66** в состав липосом привело к увеличению цитотоксичности (1,5-3 раза).

Таблица 5 Цитотоксическая активность колхициноида **64**, липофильных производных **66**, **67** и их липосомных форм **L66** и **L67** по результатам МТТ-теста

	линия клеток	64	66	67	L66	L67
IC ₅₀ (нМ)	HBL-100	9	3,5	3,5	2,5	4,5
	K562	40	20	16	8,5	14
	HaCaT	35	27	15	9	40
	Jurkat	10	15	30	100	80

Исследовано влияние соединений **64**, **66**, **67** на протекание клеточного цикла и апоптоз штаммов HBL-100, HaCaT, Jurkat (рис. 4). Показано, что высокая

* Исследования проведены в группе проф. Е. Л. Водовозовой, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва.

восприимчивость клеток HBL-100 к действию колхициноидов обусловлена блокированием клеточного цикла в фазе G2/M в сочетании с повышением количества апоптотических клеток. Основным механизмом воздействия колхициноидов на клетки линий HaCaT и Jurkat является индуцирование апоптоза.

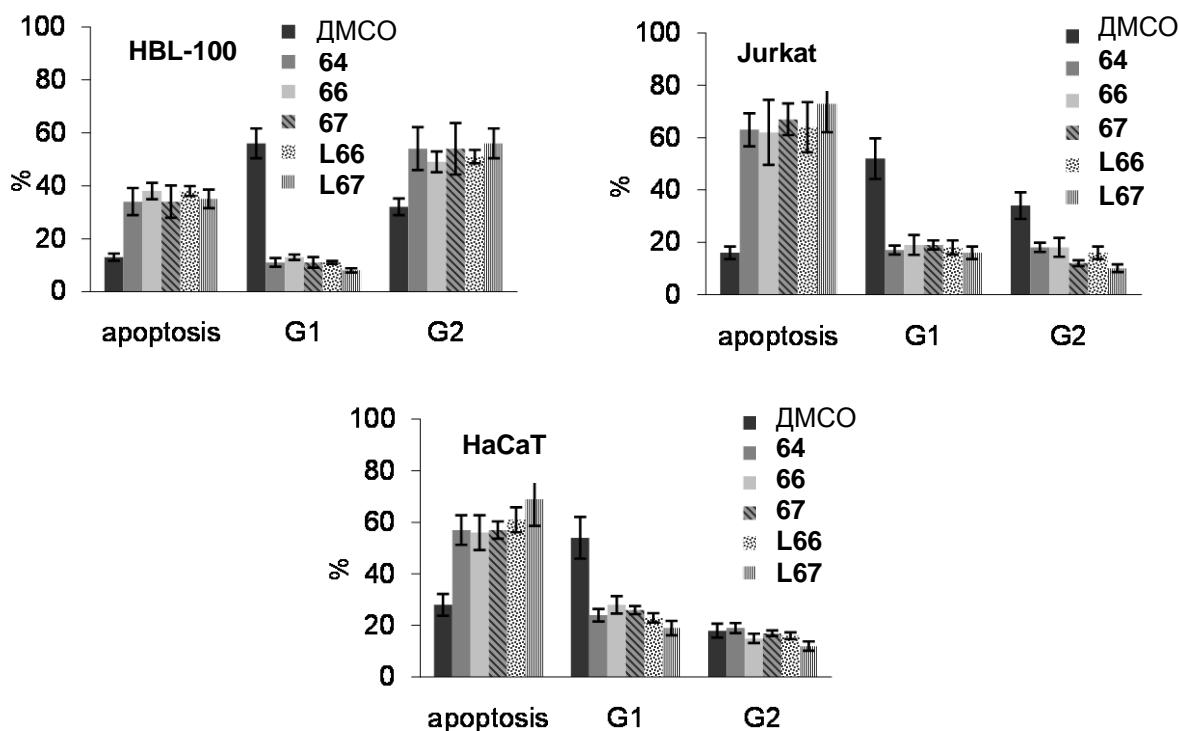


Рис. 4 Влияние колхициноидов **64**, **66**, **67** и липосомных форм **L66**, **L67** в концентрации 1 мМ на протекание клеточного цикла штаммов HBL-100, HaCaT, Jurkat после 48 часов инкубации

2.3. Синтез липофильных производных комбретастина А-4 (СА-4)

Комбретастин А-4 синтезировали по известной методике [*Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 7007] исходя из коммерчески доступного 3,4,5-триметоксибензальдегида **51** в 5 стадий с суммарным выходом 26% (схема 19). Противоопухолевый агент **70** далее переводили в липофильные производные **71**, **72** с хорошими выходами по реакции ацилирования хлорангидами олеиновой и пальмитиновой кислот.

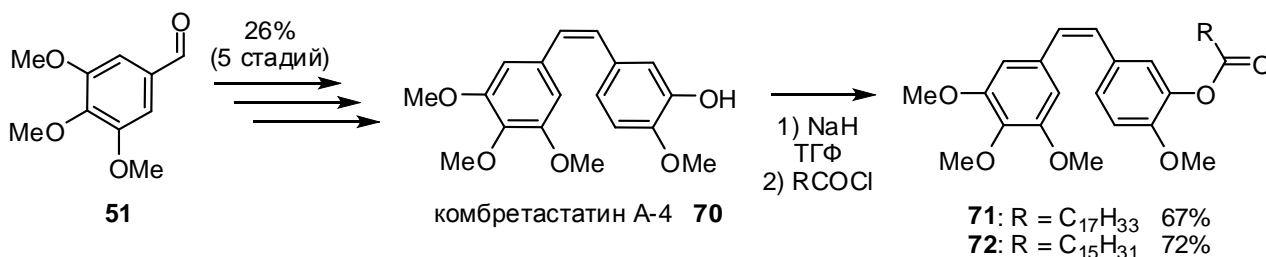


Схема 19

2.4. Результаты исследования *in vivo* противоопухолевой активности липофильных производных СА-4 в составе адресных липосом*

Методом экструзии получены моноламеллярные липосомы (85 ± 36 нм), состоящие из природных фосфолипидов (фосфатидилхолин 75 мольн% и фосфатидилинозитол 10 мольн%), липофильного производного **71** (13 мольн%) и олигосахаридного лиганда SiaLe^X (2 мольн%), обладающего сродством к белкам селектинам, экспрессируемым на мембранах эндотелиальных клеток опухолевых тканей (рис. 4).

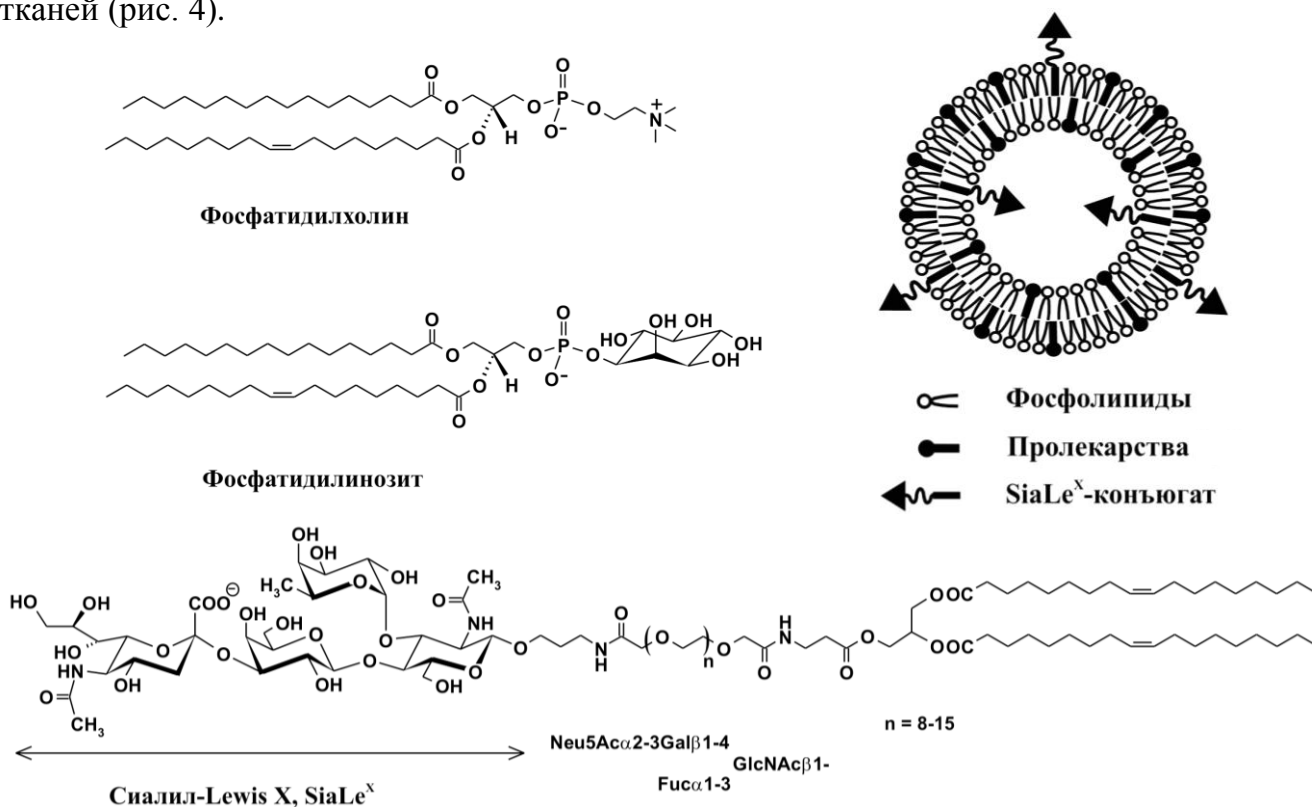


Рис. 4 Состав адресных терапевтических липосом

Противоопухолевый эффект полученного липосомного препарата исследован *in vivo* на линии мышей BLRB/BYRB, характеризующейся высокой частотой спонтанного возникновения рака молочной железы. Препараты SiaLe^X -липосом с пролекарством **71** (0,2 мл дисперсии в фосфатном буферном растворе, 22 мг/кг в эквивалентной дозе по СА-4 **70**) вводили экспериментальным животным ($n = 4$) внутривенно 3 раза с интервалом в одну неделю после достижения опухолями диаметра ~ 10 мм (объема ~ 0.5 см³). У трех из четырех исследованных животных трехкратная инъекция липосомного препарата (4, 5 и 6 недели) вызвала остановку развития опухоли. Противоопухолевый эффект отсутствовал в одном из исследованных случаев.

*Исследования проведены в группе проф. Е. Л. Водовозовой, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва.

ВЫВОДЫ

1. Впервые разработаны методологии получения и осуществлен синтез структурных аналогов природного антимитотического агента аллоколхицина – 1-замещенных 1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*H*-6,7-дигидроциклогепта-[**2,3-e** или **2,3-f** или **3,2-f**]1*H*-1''-метилиндолов **I-III** и 1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*H*-6,7-дигидроциклогепта[2,3-**b**]1*H*-индолов **IV**.
2. Установлено, что некоторые гетероциклические аллоколхициноиды проявляют антимитотическую и апоптоз-индуцирующую активность по отношению к штамму лимфомы Беркитта ВJAB в нано/субнанолярных концентрациях и обладают низкой неспецифической токсичностью. Показано, что 1',2',3'-триметоксибензо[4',5':4,5]1*H*-6,7-дигидро-1-гидроксициклогепта[2,3-*e*]1*H*-1''-метилиндол ингибирует фазу G2/M клеточного цикла и индуцирует апоптоз нескольких штаммов клеток хронического лимфолейкоза в нанолярном интервале концентраций. Данное соединение по цитотоксичности превосходит клинический препарат винкристин, используемый в терапии лимфолейкозов.
3. Впервые синтезированы 7-триазолилзамещенные производные колхицина и аллоколхицина по реакции каталитического диполярного [3+2]-циклоприсоединения 7-азидоколхицина и 7-азидоаллоколхицина с пропаргиловым спиртом и пропаргиловыми эфирами олеиновой и пальмитиновой кислот.
4. Установлено, что липофильные триазолзамещенные производные колхицина, а также липосомные препараты на их основе обладают цитотоксической активностью по отношению к пяти штаммам опухолевых клеток человека в нанолярном интервале концентраций.
5. Впервые получены липофильные пролекарственные формы комбретастина А-4, содержащие остатки олеиновой и пальмитиновой кислот. Установлено, что фосфолипидные липосомы, несущие олеоильное производное комбретастина А-4 и углеводный лиганд селективов SiaLeX, обладают способностью подавлять развитие опухоли у мышей линии BLRB/BYRB со спонтанно возникающим раком молочной железы.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Nicolaus N., Reball J., Sitnikov N., Velder J., Termath A., Fedorov A.Yu., Schmalz H.-G. A Convenient Entry to New C-7-Modified Colchicinoids through Azide Alkyne [3+2] Cycloaddition: Application of Ring-Contractive Rearrangements // *Heterocycles* – 2011. – V. 82. – P. 1585-1600.
2. Moiseeva E.V., Kuznetsova N.R., Svirshchevskaya E.V., Bovin N.V., Sitnikov N.S., Shavyrin A.S., Beletskaya I.P., Combes S., Fedorov A.Yu., Vodovozova E.L. Liposome Formulations of Combretastatin A-4 and Its 4-Arylcoumarin Analogue Prodrugs: the Antitumor Effect in the Mouse Model of Breast Cancer // *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* – 2011. V. 5 – P. 276-283.
3. Ситников Н.С., Болдырев И.А., Моисеева Е.В., Шавырин А.С., Белецкая И.П., Комб С., Бовин Н.В., Федоров А.Ю., Водовозова Е.Л. Противоопухолевые липосомы с пролекарством комбретастина А-4 и тетрасахаридным лигандом селектинов // *Изв. АН Сер. Хим.* – 2010. – Вып. 12. – С. 2234-2240.
4. Sitnikov N.S., Velder J., Prokop A., Fedorov A.Yu., Schmalz H.-G. Synthesis and biological evaluation of indole-containing allocolchicinoids // *Abstracts of the International Butlerov Congress on Organic Chemistry.* – Kazan, Russia. – 2011. – P. 187-188.
5. Ситников Н.С., Федоров А.Ю., Вельдер Я., Шмальц Г.-Г. Синтез индолсодержащих аллоколхициноидов // *Материалы XIV Молодежной конференции по органической химии.* – Екатеринбург. – 2011. – С. 221-223.
6. Ситников Н.С., Вельдер Я., Шмальц Г.-Г., Федоров А.Ю. Синтез и исследование противоопухолевой активности индолсодержащих аналогов аллоколхицина // *Материалы XVI Нижегородской сессии молодых ученых. Естественные науки.* – Нижний Новгород. – 2011. – С. 157-158.
7. Ситников Н.С., Федоров А.Ю., Вельдер Я., Шмальц Г.-Г. Синтез индолсодержащих аллоколхициноидов // *Материалы всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Актуальные проблемы органической химии».* – Казань. – 2010. – С. 65.
8. Fedorov A.Yu., Sitnikov N.S., Vodovozova E.L., Schmalz H.-G., Velder J., Beletskaya I.P. Development of liposomic drug delivery systems for the selective transport of colchicines site antitumour agents // *Abstracts of the International conference «Topical Problems of Organometallic and Coordination Chemistry».* – Nizhny Novgorod. – 2010. – P21.

9. Ситников Н.С., Федоров А.Ю., Водовозова Е.Л., Моисеева Е.В. Создание липосомных систем селективной доставки антимитотических агентов к опухолевым тканям // Материалы XV Нижегородской сессии молодых ученых. Естественные науки. – Нижний Новгород. – 2010. – С. 141-142.
10. Ситников Н.С., Моисеева Е.В., Болдырев И.А., Кузнецова Н.Р., Водовозова Е.Л., Белецкая И.П., Федоров А.Ю. Создание липосомных систем селективной доставки антимитотических агентов к опухолевым тканям // Материалы Всероссийской конференции по органической химии. – Москва – 2009. – С. 387.

Благодарности

Автор выражает благодарность за ценные научные консультации и помощь академику РАН Белецкой И.П. (МГУ им. М.В. Ломоносова), проф. Шмальцу Г.-Г. (Кёльнский университет, Германия), д.х.н. Водовозовой Е.Л. (ИБХ РАН), д.х.н. Фукину Г.К. (ИМХ РАН), к.х.н. Вельдер Я. (Кёльнский университет, Германия), к.х.н. Малышевой Ю.Б. (ННГУ им. Н.И. Лобачевского), к.х.н. Дрэгичу А.И. и фирме ДАЛХИМ, аспиранту Нючеву А.В. (ННГУ им. Н.И. Лобачевского).