

О. Н. Зефирова^{1,2}, Е. В. Нуриева¹, Я. С. Глазкова¹, Н. А. Зефирова¹,
А. В. Мамаева¹, Б. Вобит³, В. И. Романенко⁴, Н. А. Лесная⁴,
Е. М. Трещалина⁴, С. А. Кузнецов³

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ТУБУЛОКЛАСТИНА И ЕГО СТЕРОИДНЫХ АНАЛОГОВ

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия; e-mail: olgaz@org.chem.msu.ru

² Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, Россия

³ Институт биологических наук Ростокского университета, Росток, Германия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина" Российской Академии медицинских наук, Москва, Россия

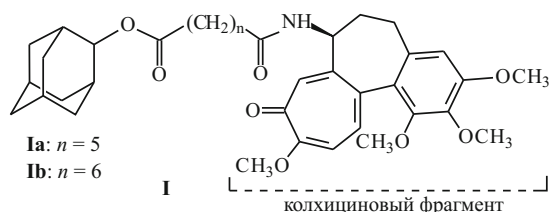
Использование тубулокластина при схеме лечения 1 мг/кг ежедневно внутривнутрибрюшинно в течение 5 дней приводит к значимому и достоверному увеличению продолжительности жизни мышей BDF₁ с внутривнутрибрюшинно трансплантированным лимфолейкозом P388 на 45 % в сравнении с нелеченым контролем (17 против 11,7 ± 3 дня). Принципиальная возможность получения аналогов этого соединения на основе 2-метоксиэстрадиола с линкером, присоединенным через сложноэфирную связь при C6 стероида, продемонстрирована в работе. Полученные конъюгаты **Ia** и **Iб** отличаются, однако невысокой стабильностью из-за сильной склонности к элиминированию по связи C⁶-C⁷, что может быть причиной их низкой цитотоксичности в МТТ тесте на культуре клеток A549 (IC₅₀ > 10 μM). Сделан вывод о необходимости разработки синтеза более стабильных конъюгатов в качестве потенциальных противоопухолевых средств.

Ключевые слова: производные колхицина; адамантан; тубулин; тубулокластин; лимфолейкоз P388; противоопухолевая активность; 2-метоксиэстрадиол; клеточная линия карциномы легкого человека A549; цитотоксичность.

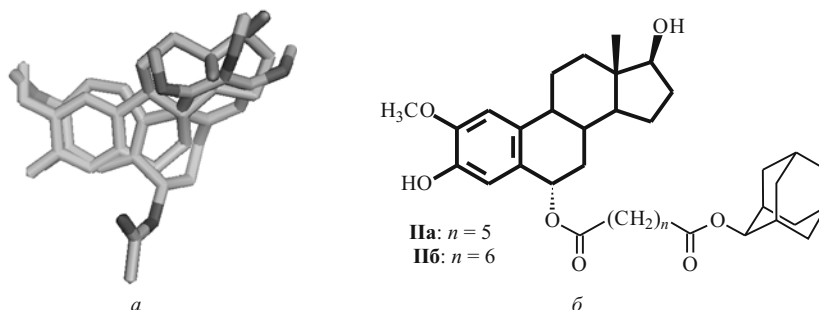
Основной молекулярной мишенью противоопухолевого действия таксола, винбластина и колхицина, а также их многочисленных аналогов является клеточный белок тубулин и построенные из него микротрубочки. Эти соединения ингибируют митоз путем связывания с различными областями белка и либо запуска неконтролируемой полимеризации тубулина (таксаны: таксол, таксотер), либо ингибирования процесса сборки микротрубочек (колхицин, алкалоиды барвинка) [1 – 3]. Высокоэффективные таксаны и винкаалкалоиды широко используют при наиболее распространенных злокачественных новообразованиях, несмотря на трудоемкость получения таксанов из природных источников и лимитирующей нейротоксичностью этих цитостатиков. Альтернативой таксанам и винкаалкалоидам представляются относительно малотоксичные упрощенные миметики таксола и существенно более доступные структурные аналоги колхицина [4 – 6].

Ранее нами получены конъюгаты колхицина с адамантаном, содержащим в качестве заместителя боковую цепь молекулы таксотера [5, 7]. Один из них проявил способность вызывать деполимеризацию микротрубочек и необычную агрегацию тубулина и показал значимую цитотоксичность для клеток рака легкого человека A549 (IC₅₀ = 2 нМ) [7]. Близкую цитотоксичность показали и его аналоги без таксолевой цепи **Ia**, **Iб** (IC₅₀ = 5 – 6 нМ A549), причем для конъюгата колхицина — пимелиновый мостик — адамантан (соединения **Ia**), названного нами тубулокластином (tubuloclustin) за способность вызывать образование

необычных кластеров тубулина, было доказано ингибирование связывания и [³H]-колхицина и [³H]-таксола *in vitro* [8]. Эти результаты определили цели настоящего исследования, включающие изучение противоопухолевой активности **Ia** *in vivo*, а также синтез и оценку цитотоксичности *in vitro* аналогов **Ia**, **Iб** с заменой колхицинового фрагмента другим лигандом колхицинового сайта связывания тубулина.



Соединение **Ia** было получено из адамантанолола, полиангирида пимелиновой кислоты и N-дезацетилколхицина по ранее описанной методике [7]. Изучение противоопухолевой активности проведено на лимфолейкозе P388, трансплантированном мышам-самкам BDF₁ [DBA2 · C57Bl6j] массой тела 24 – 27 г внутривнутрибрюшинно по стандартной методике [9]. На 2 – 6 сут после трансплантации лейкоза мышам ежедневно внутривнутрибрюшинно вводили **Ia** в 10 % растворе этанола в разовых дозах 1, 5 и 10 мг/кг (суммарные дозы 5, 25 и 50 мг/кг). За мышами наблюдали до гибели от лейкоза, после чего рассчитывали среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в обеих группах, соотношение которой использовали для расчета увеличения продолжительности жизни по формуле T/C %



а) Расположение молекул колхицина и 2-метоксиэстрадиола в области связывания колхицина с тубулином (темным показаны атомы азота и кислорода); б) структуры предложенных конъюгатов **IIa**, **IIб** (темным выделен фрагмент 2-метоксиэстрадиола).

[(treatment/control) · 100 %]; СПЖ в группе контроля (без лечения) принимали за 100 %. Дополнительными показателями антипролиферативного действия служили уменьшение накопления асцита и показатель генерализации лейкозного процесса относительной (к массе тела мыши) массы селезенки. О переносимости лечения судили по гибели мышей, как правило, раньше контроля с визуальными или макроскопическими (на аутопсии) признаками интоксикации (уменьшение массы тела, клиническая симптоматика и наличие патологических изменений внутренних органов при аутопсии павших). Результаты представлены в таблице.

Как видно из таблицы, **Ia** в разовой дозе 1 мг/кг при удовлетворительной переносимости дает значимое и достоверное Т/С = 145 % ($p < 0,05$) с отсутствием у мышей лейкозного асцита, но без положительной динамики массы селезенки. При разовой дозе 5 мг/кг переносимость лечения удовлетворительная, а Т/С = 111 %, масса селезенки леченых мышей — на уровне контроля. При разовой дозе 10 мг/кг на фоне отсутствия асцита отмечено отсутствие положительной динамики массы селезенки и достоверное двукратное уменьшение продолжительности жизни мышей, Т/С = 51 % ($p < 0,05$). Полученные данные дают основания считать, что **Ia** в переносимой разовой дозе 1 мг/кг при 5-кратном внутривнутрибрюшинном введении (суммарная доза 5 мг/кг) ингибирует развитие локализованного в брюшной полости лейкозного процесса, но не предупреждает генерализацию с развитием спленомегалии.

Ретроспективный анализ результатов действия на лимфолейкоз Р388 колхицина и таксола [10–12] в сравнении с **Ia** показывает их сопоставимость, а выявленные различия могут быть объяснены различными схемами введения.

Полученные данные стимулировали дальнейший поиск аналогов **Ia**, в которых колхициновый фрагмент заменен другими лигандами колхицинового сайта связывания тубулина с меньшей общей токсичностью, в частности, 2-метоксиэстрадиолом. Сравнение расположения молекул колхицина и 2-метоксиэстрадиола в области взаимодействия с белком показывает, что наиболее удобной позицией в стероидном скелете для присоединения линкера с адамантаном является атом углерода при С6, расположенный очень близко к амид-

ной группировке колхицина (расстояние между ними составляет менее 1 Å, рисунок). Поэтому для синтеза были предложены структуры **IIa** и **IIб** с перемычкой такой же длины, как и в исходных соединениях **Ia** и **Iб** (рисунок).

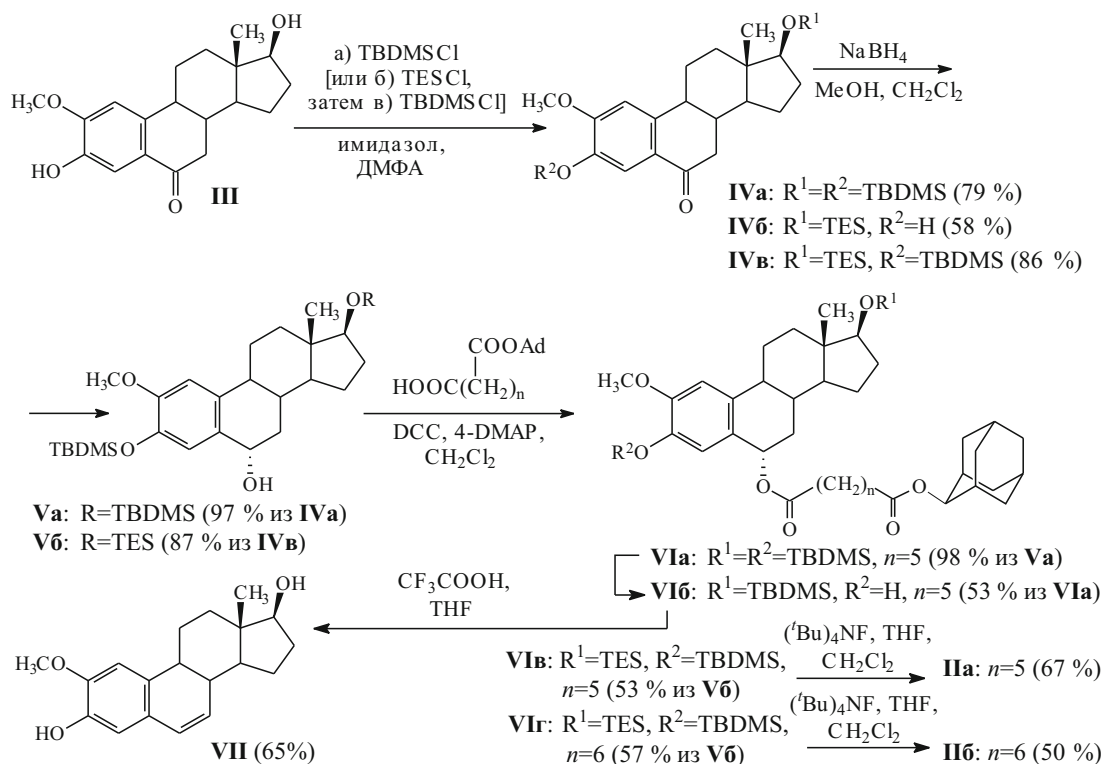
Синтез целевых веществ **IIa**, **IIб** осуществляли по схеме 1 из С⁶-кетопроизводного 2-метоксиэстрадиола **III** (получено в 3 стадии окислением 2-метоксиэстрадиола по методике [13]) (схема).

После присоединения различных комбинаций защитных групп [*трет*-бутилдиметилсилильной (ТБДМС) или триэтилсилильной (ТЭС)] соединения **IVa** и **IVb** стереоселективно восстановили боргидридом натрия в метаноле, получив соответствующие спирты **Va**, **Vб**. Реакции этих спиртов с полученными ранее моноэфиром пимелиновой или суберовой кислот [7] с 2-адамантанолом в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC) и 4-N,N'-диметиламинопиридина (4-DMAP) привели к требуемым конъюгатам **VIa**, **VIb** и **VIг**. В спектрах ЯМР ¹H этих соединений характеристическими являются сигналы протона С⁶H-О в области 5,90–6,00 м.д. и протона адамантанового фрагмента С(О)О-С^{2Ad}H в области 4,93–5,09 м.д.

В ходе реакции **VIa** с тетрабутиламмоний фторидом произошло отщепление только одной защитной группы (структура **VIб**), а попытка отщепления другой в трифторуксусной кислоте в тетрагидрофуране (ТГФ) привела к выделению исключительно продукта элиминирования с двойной связью при С⁶-С⁷ (структура **VII**). Более удачным оказалось использование лабильной ТЭС-защиты в стероидном фрагменте. Реакцией **VIb** и **VIг** с (tBu)₄NF удалось получить требуемые соединения **IIa** и **IIб**, загрязненные, однако, небольшим количеством примеси продукта **VII** (около 10 % после трехкратного колоночного хроматографирования на силикагеле, см. экспериментальную часть), что свидетельствует о низкой стабильности целевых конъюгатов из-за сильной склонности к элиминированию.

Полученные в работе соединения **IIa** и **IIб** (учитывая небольшое содержание примеси) были протестированы на цитотоксичность на культуре клеток А549 в стандартном колориметрическом тесте с использованием красителя 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифе-

Схема



нил-2*H*-тетразолилбромид (МТТ) [14] по методике [8]. Это исследование показало резкое падение цитотоксичности **IIa** и **IIб** ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$) по сравнению с соединениями-лидерами **Ia**, **б**, которое, однако, может быть вызвано не потерей способности веществ **IIa** и **IIб** к связыванию с тубулином, а их быстрым элиминированием по связи C⁶-C⁷ в культуральной среде.

Таким образом, хотя принципиальная возможность получения конъюгатов типа 2-метоксиэстрадиол-С6-линкер-адамantan показана нами в настоящей работе, дальнейший поиск эффективных агентов на основе соединений-лидеров **Ia**, **б** следует сосредоточить среди более стабильных аналогов таких конъюгатов. Принимая во внимание результаты тестирования **Ia** на лимфолейкозе P388 (см. таблицу) и особенно дозовые характеристики активности и токсичности, ин-

терес представляет также синтез его аналогов с менее токсичными и отличными от 2-метоксиэстрадиола лигандами колхицинового сайта связывания тубулина, например, с производными комбретастина. Подходы к синтезу таких веществ в настоящее время изучаются.

Экспериментальная химическая часть

Хроматографическое разделение проводили на колонках с силикагелем Acros (40 – 60 мкм); элюент: петролейный эфир 40 – 60 °С (ПЭ) и/или этилацетат – петролейный эфир 40 – 60 °С (ЭА – ПЭ). Спектры ЯМР ¹H и ¹³C регистрировали при 28 °С на приборе Bruker Avance 400 (400 и 100 МГц соответственно). Химические сдвиги приведены в шкале δ (м.д.) относительно остаточного сигнала растворителя, констан-

Результаты тестирования тубулокластина (**Ia**) на мышах BDF₁ с внутрибрюшинным лимфолейкозом P388 (введение внутрибрюшинно ежедневно на 2 – 6 сутки после перевивки)

Группа, n = 3	Ср. масса тела, M _{ср} ± m _{ср}	Доза			Показатели эффективности		
		Разовая	Суммарная	СПЖ, дни	T/C %	Наличие асцита (+/-)*	Увелич. ср. массы селезенки (+/-)**
Контроль роста опухоли, 10 % раствор EtOH	24,5 ± 0,9	0,5 мл	2,5 мл	11,7 ± 3	100	+	++
Ia	24,1 ± 0,8	1 мг/кг	5 мг/кг	17,0	145***	-	++
	27,4 ± 0,4	2 мг/кг	10 мг/кг	13,0 ± 5	111	-	++
	25,5 ± 0,6	10 мг/кг	50 мг/кг	5,7 ± 2	51***	-	++

* (+) — Наличие лейкозного асцита в брюшной полости павших мышей при аутопсии;
 ** средняя масса селезенки здоровых мышей 100 ± 20 мг;
 *** p < 0,05.

ты спин-спинового взаимодействия указаны в герцах (Гц). MALDI-TOF масс-спектры регистрировали на приборе VISION-2000.

3,17β-Ди-О-(трет-бутилдиметилсилил)-2-метокси-6-оксоэстрадиол (IVa). К раствору 0,210 г III (0,66 ммоль) в 2 мл ДМФА в атмосфере аргона добавляют 0,4 г имидазола (5,88 ммоль) и 0,417 г трет-бутилдиметилсилилхлорида (2,78 ммоль), перемешивают 12 ч при 20 °С. Добавляют 20 мл воды, экстрагируют CH_2Cl_2 (3×25 мл), органические слои объединяют, высушивают Na_2SO_4 , растворитель упаривают. Хроматографируют (ЭА – ПЭ, 1:6). Выход 79 % (0,3 г IVa, белые кристаллы). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 0,02 (с, 3H, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,03 (с, 3H, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,17 (с, 6H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,76 (с, 3H, C^{18}H_3), 0,90 (с, 9H, $\text{C}^{17}\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 0,99 (с, 9H, $\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 1,25 – 1,36 (м, 3H), 1,50 (м, 1H), 1,59 – 1,70 (м, 3H), 1,95 (м, 2H, J 13,5 Гц), 2,14 (м, 1H, J 13,5 Гц), 2,31 (м, 1H, C^7H_2), 2,41 (м, 1H, C^7H_2), 2,68 (дд, 1H, J 3,3 Гц, J 13,5 Гц), 3,67 (дд, 1H, J 8,2 Гц, J 8,4 Гц, C^{17}H), 3,88 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 6,83 (с, 1H, C^1H), 7,53 (с, 1H, C^4H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): – 4,83 ($\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), – 4,46 ($\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 11,24 (C^{18}), 18,09 ($\text{C}^{17}\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 18,42 ($\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 22,99, 25,68 ($\text{C}^{17}\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 25,83 ($\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 30,81, 36,67, 40,28, 43,38, 43,90, 49,69, 55,40 ($\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 81,43 (C^{17}), 107,71 (C^1), 118,77 (C^4), 126,08 (C^5), 142,57 (C^{10}), 143,54 (C^3), 155,68 (C^2), 196,929 (C^6).

17β-О-(триэтилсилил)-2-метокси-6-оксоэстрадиол (IVб) получают аналогично IVa из 0,102 г III (0,32 ммоль), 0,264 г имидазола (3,87 ммоль) и 0,292 г триэтилсилилхлорида (1,93 ммоль). Выход: 58 % (0,075 г IVб, белые кристаллы). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 0,58 (кв, 6H, J 7,7 Гц, $\text{OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 0,76 (с, 3H, C^{18}H_3), 0,97 (т, 9H, J 7,9 Гц, $\text{OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,24 – 1,35 (м, 3H), 1,52 (м, 1H), 1,63 (м, 2H), 1,89 – 1,99 (м, 3H), 2,15 (дд, 1H, J 13,5 Гц, J 16,6 Гц), 2,33 (м, 1H, C^7H_2), 2,45 (м, 1H, C^7H_2), 2,68 (м, 1H, J 3,3 Гц, J 13,5 Гц, C^9H), 3,67 (дд, 1H, J 8,4 Гц, J 8,5 Гц, C^{17}H), 3,96 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 5,77 (уш. с, 1H, OH), 6,85 (с, 1H, C^1H), 7,60 (с, 1H, C^4H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 4,88 ($\text{OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 6,82 ($\text{OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 11,11 (C^{18}), 22,91, 25,75, 30,91, 36,56, 40,33, 43,24, 43,79, 49,62, 55,89 ($\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 81,22 ($\text{C}^{17}\text{-OH}$), 106,68 (C^1), 112,61 (C^4), 126,45 (C^5), 141,27 (C^{10}), 144,11 ($\text{C}^3\text{-OH}$), 151,21 (C^2), 197,02 ($\text{C}^6=\text{O}$).

3-О-(трет-бутилдиметилсилил)-17β-О-(триэтилсилил)-2-метокси-6-оксоэстрадиол (IVв) получают аналогично IVa из 0,060 г IVб (0,14 ммоль), 0,057 г имидазола (0,84 ммоль) и 0,063 г трет-бутилдиметилсилил хлорида (0,42 ммоль). Выход: 86 % (0,65 г IVв, белые кристаллы). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 0,14 (с, 6H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,57 (кв, 6H, J 7,7 Гц, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 0,75 (с, 3H, C^{18}H_3), 0,95 (т, 9H, J 7,9 Гц, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 0,97 (с, 9H, $\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 1,22 – 1,35 (м, 3H), 1,47 – 1,65 (м, 3H), 1,88 – 1,97 (м, 3H), 2,12 (дд, 1H, J 12,7 Гц, J 16,7 Гц), 2,30 (м, 1H, C^7H_2), 2,42 (м, 1H, C^7H_2), 2,65 (дд, 1H, J 3,4 Гц, J 16,7 Гц, C^9H), 3,65 (дд, 1H, J 8,4 Гц, J 8,5 Гц, C^{17}H),

3,85 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 6,80 (с, 1H, C^1H), 7,50 (с, 1H, C^4H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): – 4,23 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 4,98 ($\text{Si}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 6,85 ($\text{Si}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 11,18 (C^{18}), 18,89 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 22,98, 26,67 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 26,95, 30,81, 36,65, 40,29, 43,37, 43,88, 49,75, 55,41 ($\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 81,43 (C^{17}), 107,71 (C^1), 118,76 (C^4), 126,08 (C^5), 142,56 (C^{10}), 143,54 (C^3), 155,69 (C^2), 196,92 ($\text{C}^6=\text{O}$).

3,17β-Ди-О-(трет-бутилдиметилсилил)-2-метокси-6α-гидроксиэстрадиол (Va) получают по стандартной методике из 0,3 г IVa (0,55 ммоль) в 5 мл метанола и 0,021 г боргидрида натрия (0,55 ммоль) (1 ч, 25 °С). Хроматографируют (ЭА – ПЭ, 1:20, затем 1:10, затем 1:7). Выход: 97 % (0,29 г Va, бесцветное аморфное вещество). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 0,02 (с, 3H, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,03 (с, 3H, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,15 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,16 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,74 (с, 3H, C^{18}H_3), 0,89 (с, 9H, $\text{C}^{17}\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 0,9 (с, 9H, $\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 1,17 – 1,55 (м, 7H), 1,66 (м, 2H, J 7,7 Гц), 1,87 – 2,00 (м, 2H), 2,23 – 2,28 (м, 2H), 3,64 (дд, 1H, J 8,1 Гц, J 8,2 Гц, C^{17}H), 3,77 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 4,73 (м, 1H, J 8,1 Гц, C^6H), 6,72 (с, 1H, C^1H), 7,02 (с, 1H, C^4H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): – 4,82 ($\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), – 4,45 ($\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 11,33 (C^{18}), 18,09 ($\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 18,42 ($\text{C}^{17}\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 23,20, 25,74 ($\text{C}^{17}\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 25,84 ($\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 30,90, 37,05, 38,23, 38,39, 43,49, 44,68, 49,09, 55,61 ($\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 69,55 ($\text{C}^6\text{-OH}$), 81,61 (C^{17}), 109,15 (C^1), 119,31 (C^4), 132,20 (C^5), 133,63 (C^{10}), 143,32 (C^3), 149,96 (C^2).

3-О-(трет-бутилдиметилсилил)-17β-О-(триэтилсилил)-2-метокси-6α-гидроксиэстрадиол (Vб) получают аналогично Vб из 0,065 г IVв (0,12 ммоль) в 2 мл CH_2Cl_2 и 0,01 г боргидрида натрия (0,24 ммоль). Выход: 87 % (0,057 г Vб, бесцветное аморфное вещество). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 0,19 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,20 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,73 (кв, 6H, J 7,8 Гц, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 0,88 (с, 3H, C^{18}H_3), 1,12 (т, 9H, J 7,9 Гц, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,23 (с, 9H, $\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 1,26 – 1,75 (м, 5H), 1,90 – 2,26 (м, 4H), 2,29 – 2,48 (м, 2H, C^7H_2), 2,53 (м, 1H, C^9H), 3,59 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 3,61 (м, 1H, C^{17}H), 4,77 (м, 1H, C^6H), 5,33 (уш. с, 1H, OH), 6,98 (м, 1H, C^1H), 7,53 (м, 1H, C^4H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): – 4,22 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 5,54 ($\text{Si}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 7,34 ($\text{Si}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 11,53 (C^{18}), 18,88 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 23,52, 24,86, 26,20 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 26,95, 31,63, 37,18, 37,69, 38,77, 43,02, 45,25, 49,34, 55,65 ($\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 69,66 (C^6), 81,99 (C^{17}), 109,43 (C^1), 120,32 (C^4), 130,40 (C^5), 133,53 (C^{10}), 143,82 (C^3), 150,62 (C^2).

2-Адамантил-3,17β-ди-(трет-бутилдиметилсилилокси)-2-метоксиэстра-1,3,5(10)-триен-6α-ил пимелат (VIa). К раствору 0,060 г 7-(2-адамантилокси)-7-оксогептановой кислоты (0,20 ммоль) в 10 мл CH_2Cl_2 добавляют 0,062 г ДЦК (0,30 ммоль), 0,067 г Va (0,12 ммоль) и каталитическое количество 4-ДМАП. Перемешивают 24 ч при 20 °С, упаривают, добавляют 20 мл EtOAc и выдерживают 3 ч при – 5 °С. Отфильтровывают, промывают охлажденным EtOAc , упаривают. Хроматографируют (ПЭ, затем ЭА – ПЭ, 1:9). Выход: 98 % (0,100 г VIa, бесцветное

аморфное вещество). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 0,01 (с, 3H, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,02 (с, 3H, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,13 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,14 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,74 (с, 3H, C^{18}H_3), 0,90 (с, 9H, $\text{C}^{17}\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 0,99 (с, 9H, $\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 1,19 – 1,38 (м, 6H), 1,50 – 1,84 (м, 20H), 1,97 – 2,03 (м, 5H), 2,23 – 2,37 (м, 6H), 3,65 (дд, 1H, J 8,2 Гц, J 8,4 Гц, C^{17}H), 3,79 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 4,93 (м, 1H, $\text{C}^{2\text{Ad}}\text{H}$), 6,00 (дд, 1H, J 7,2 Гц, J 2,4 Гц, C^6H), 6,65 (с, 1H, C^1H), 6,76 (с, 1H, C^4H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): – 4,85 ($\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), – 4,52 ($\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 11,27 (C^{18}), 18,04 ($\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 18,37 ($\text{C}^{17}\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 23,15, 24,93, 25,69 ($\text{C}^{17}\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 25,80 ($\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 26,96, 27,20, 28,83, 30,86, 31,76, 31,84, 33,94, 34,72, 36,29, 37,36, 38,02, 43,48, 44,13, 49,20, 55,59 ($\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 71,56 (C^6), 76,67 ($\text{C}^{2\text{Ad}}$), 81,55 (C^{17}), 109,17 (C^1), 119,57 (C^4), 127,48 (C^5), 134,67 (C^{10}), 143,21 (C^3), 150,24 (C^2), 172,99 ($\text{C}^6\text{-O}(\text{O})\text{C}$), 173,68 ($\text{C}(\text{O})\text{O-Ad}$).

2-Адамантил-17 β -(трет-бутилдиметилсилилокси)-3-гидрокси-2-метоксиэстра-1,3,5(10)-триен-6 α -ил пимелат (VIб) получают по стандартной методике из 0,1 г VIа (0,12 ммоль) в 2 мл CH_2Cl_2 и 0,5 мл 1 М раствора тетрабутиламмоний фторида в ТГФ (20 ч, 20 °С). Хроматографируют (ПЭ, затем ЭА – ПЭ, 1:20). Выход 53 % (0,045 г VIб, бесцветное аморфное вещество). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 0,01 (с, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0,02 (с, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0,73 (с, 3H, C^{18}H_3), 0,88 (с, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 1,15 – 1,40 (м, 6H), 1,49 – 1,84 (м, 20H), 1,97 – 2,03 (м, 5H), 2,24 – 2,36 (м, 6H), 3,62 (дд, 1H, J 8,4 Гц, J 8,5 Гц, C^{17}H), 3,88 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 4,93 (м, 1H, $\text{C}^{2\text{Ad}}\text{H}$), 5,56 (с, 1H, OH), 6,00 (дд, 1H, J 7,2 Гц, J 2,4 Гц, C^6H), 6,73 (с, 1H, C^1H), 6,77 (с, 1H, C^4H).

К 0,038 г VIб (0,05 ммоль) в 2 мл ТГФ прибавляют 0,5 мл 1 М CF_3COOH , перемешивают 5 ч при 20 °С. Выделяют стандартным методом, хроматографируют (ПЭ, затем ЭА – ПЭ, 1:20). Получают **2-метоксиэстра-1,3,5(10),6(7)-тетраен-3,17 β -диол (VII)** (выход 65 %, 0,01 г, белые кристаллы). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 0,78 (с, 3H, C^{18}H_3), 1,27 (м, 1H), 1,42 (м, 2H), 1,48 – 1,63 (м, 3H), 1,75 (м, 1H), 1,86 (м, 1H), 1,98 (м, 1H), 2,11 – 2,22 (м, 2H), 2,34 (м, 1H), 3,77 (дд, 1H, J 8,6 Гц, J 8,8 Гц, C^{17}H), 3,91 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 5,45 (с, 1H, OH), 5,86 (д, 1H, J 9,6 Гц, C^7H), 6,39 (дд, 1H, J 2,7 Гц, J 9,6 Гц, C^6H), 6,69 (с, 1H, C^4H), 6,82 (с, 1H, C^1H).

2-Адамантил 3-(трет-бутилдиметилсилилокси)-17 β -(триэтилсилилокси)-2-метоксиэстра-1,3,5(10)-триен-6 α -ил пимелат (VIв) получают аналогично VIа из 0,057 г Vб (0,1 ммоль), 0,031 г адамантилового моноэфира гептандиовой кислоты (0,1 ммоль) и 0,032 г ДЦК (0,16 ммоль). Хроматографируют (ПЭ, затем ЭА – ПЭ, 1:9). Выход 53 % (0,044 г VIб, бесцветное аморфное вещество). Спектр ЯМР ^1H (бензол- d_6): 0,27 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,28 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,64 (кв, 6H, J 7,7 Гц, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 0,75 (с, 3H, C^{18}H_3), 1,06 (т, 9H, J 7,9 Гц, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,13 (с, 9H, $\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 1,25 – 1,70 (м, 21H), 1,75 – 2,01 (м, 5H), 2,04 – 2,28 (м, 10H), 2,39 (м, 1H), 3,47 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 3,50 (м, 1H, C^{17}H), 5,09 (м, 1H, $\text{C}^{2\text{Ad}}\text{H}$), 6,37

(м, 1H, O- C^6H), 6,75 (с, 1H, C^4H), 7,19 (с, 1H, C^1H). Спектр ЯМР ^{13}C (бензол- d_6): – 3,92 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 5,77 ($\text{Si}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 7,56 ($\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 11,95 (C^{18}), 19,12 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 23,57, 25,52, 26,40 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27,02, 27,75, 28,07, 29,39, 31,79, 32,49, 32,69, 35,00, 35,18, 36,87, 37,79, 37,98, 38,77, 44,18, 44,96, 49,67, 55,72 ($\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 72,15 ($\text{C}^6\text{-O}$), 76,95 ($\text{C}^{2\text{Ad}}$), 82,14 (C^{17}), 110,03 (C^1), 120,77 (C^4), 129,08, 135,45, 144,39 (C^3), 151,32 (C^2), 172,45 ($\text{C}^6\text{-O}(\text{O})\text{C}$), 173,58 ($\text{C}(\text{O})\text{O-Ad}$).

2-Адамантил-3-(трет-бутилдиметилсилилокси)-17 β -(триэтилсилилокси)-2-метоксиэстра-1,3,5(10)-триен-6 α -ил суберат (VIг) получают аналогично VIа из 0,057 г Vб (0,1 ммоль), 0,032 г адамантилового моноэфира суберовой кислоты (0,1 ммоль) и 0,032 г ДЦК (0,16 ммоль). Хроматографируют (ПЭ, затем ЭА – ПЭ, 1:9). Выход: 57 % (0,049 г VIг, бесцветное аморфное вещество). Спектр ЯМР ^1H (бензол- d_6): 0,27 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,28 (с, 3H, $\text{C}^3\text{-OSi}(\text{CH}_3)_2$), 0,64 (кв, 6H, J 7,6 Гц, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 0,75 (с, 3H, C^{18}H_3), 1,06 (т, 9H, J 7,5 Гц, $\text{C}^{17}\text{-OSi}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,12 (с, 9H, $\text{C}^3\text{-OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 1,22 – 1,67 (м, 23H), 1,75 – 1,97 (м, 5H), 2,04 – 2,30 (м, 10H), 2,39 (м, 1H), 3,48 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 3,50 (м, 1H, C^{17}H), 5,09 (м, 1H, $\text{C}^{2\text{Ad}}\text{H}$), 6,37 (м, 1H, O- C^6H), 6,75 (с, 1H, C^4H), 7,18 (с, 1H, C^1H).

2-Адамантил-3,17 β -дигидрокси-2-метоксиэстра-1,3,5(10)-триен-6 α -ил пимелат (IIа) получают аналогично VIб из 0,036 г VIв (0,043 ммоль) в 2 мл CH_2Cl_2 и 0,088 мл 1 М раствора тетрабутиламмоний фторида в ТГФ. Трижды хроматографируют (ПЭ, затем ЭА – ПЭ, 1:20). Выход: 67 % (0,017 г IIа, бесцветное аморфное вещество; химическая чистота: 85 – 90 %). Спектр ЯМР ^1H (бензол- d_6): 0,66 (с, 3H, C^{18}H_3), 1,02 – 1,64 (м, 22H), 1,74 (м, 2H), 1,87 – 1,90 (м, 3H), 2,03 – 2,21 (м, 10H), 2,37 (м, 1H), 3,31 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 3,45 (м, 1H, C^{17}H), 5,08 (м, 1H, $\text{C}^{2\text{Ad}}\text{H}$), 5,47 (с, 1H, OH), 6,32 (м, 1H, O- C^6H), 6,61 (с, 1H, C^4H), 7,23 (с, 1H, C^1H). Масс-спектр (MALDI-TOF) m/z : 633 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

2-Адамантил-3,17 β -дигидрокси-2-метоксиэстра-1,3,5(10)-триен-6 α -ил суберат (IIб) получают аналогично IIа из 0,037 г VIг (0,044 ммоль) в 2 мл CH_2Cl_2 и 0,088 мл 1 М раствора тетрабутиламмоний фторида в ТГФ. Хроматографируют (ПЭ, затем ЭА – ПЭ, 1:20). Выход: 50 % (0,014 г IIб, бесцветное аморфное вещество; химическая чистота: 85 – 90 %). Спектр ЯМР ^1H (бензол- d_6): 0,65 (с, 3H, C^{18}H_3), 1,02 – 1,66 (м, 24H), 1,74 – 1,95 (м, 5H), 2,05 – 2,20 (м, 10H), 2,43 (м, 1H), 3,29 (с, 3H, $\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 3,47 (м, 1H, C^{17}H), 5,12 (м, 1H, $\text{C}^{2\text{Ad}}\text{H}$), 5,50 (с, 1H, OH), 6,35 (м, 1H, O- C^6H), 6,62 (с, 1H, C^4H), 7,25 (с, 1H, C^1H). Масс-спектр (MALDI-TOF) m/z : 631 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 647 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

Экспериментальная биологическая часть

Тестирование *in vivo*. Эксперименты выполнены на половозрелых мышах-самках BDF_1 разведения ФГБУ “РОНЦ им. Н. Н. Блохина” РАМН с перевитым внутрибрюшинно лимфолейкозом P388. Мышей содержали в конвенциональном виварии РОНЦ с естест-

венным световым режимом, постоянным доступом к воде и на полноценном рационе в соответствии с ГОСТ Р50258-92, Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите экспериментальных позвоночных животных (1997) и правилами проведения доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351000.3-96 и 51000.4-96)¹. Штамм P388 из Банка РОНЦ получен от мышей-доноров DBA2 того же разведения и свойств и трансплантирован внутрибрюшинно по 1 млн. клеток в 0,3 мл питательной среды 199 по стандартной методике [9]. После трансплантации лейкоза мышей делили на 4 группы, 3 из которых ($n = 3$) получали лечение, а одна группа ($n = 4$) оставалась без специфического лечения. Тубулокластин (**Ia**) растворяли *ex tempore* в 10 % растворе этанола с физиологическим раствором и в разовых дозах 1, 5 и 10 мг/кг вводили мышам опытных групп внутрибрюшинно ежедневно на 2 – 6 сут после трансплантации (5 инъекций). Мыши контрольной группы получали растворитель в адекватном объеме и схеме введения. Противоопухолевый эффект оценивали по увеличению продолжительности жизни (Т/С %, минимальный критерий эффективности ≥ 125 %), динамике массы асцита и селезенки в сравнении с контролем. Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента в модификации Р. Б. Стрелкова, рассчитывая доверительные интервалы средних срав-

¹ Исследования *in vivo* выполнены в соответствии с действующими в РФ методическими указаниями о соблюдении гуманных методов обращения с лабораторными животными [9] и требованиями нормативных документов: 1) гражданский кодекс РФ, Бюджетный кодекс РФ, ФЗ “О размещении заказов на поставки товаров, выполнение работ, оказание услуг для государственных и муниципальных нужд” от 21.07.2005 г. № 94-ФЗ и иные нормативно-правовые акты РФ на основании п. 32 ч. 2 ст. 55 ФЗ № 94-ФЗ; 2) ГОСТ Р 53434 – 2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”; 3) ФЗ от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ “Об обращении лекарственных средств” (ст. 10, 11, 12, 13, 28, 29, 30, 38, 39, 40, 41); 4) приказ Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г. № 708н. “Об утверждении правил лабораторной практики”.

ваемых величин. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Тестирование *in vitro*. Оценку цитотоксичности модифицированных соединений **IIa, б** проводили на клетках карциномы легкого человека А549 с помощью МТТ-теста [8].

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (12-03-00720; 13-03-12460) и при поддержке немецкой организации DAAD, German Academic Exchange Service академического обмена в рамках соглашения о сотрудничестве между Московским и Роттердамским университетами.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. A. Stanton, K. M. Gernert, J. H. Nettles, and R. Aneja, *Med. Res. Rev.*, **31**(3), 443 – 481 (2011).
2. О. Н. Зефирова, Е. В. Нуриева, А. Н. Рыжов и др., *Ж. орган. химии*, **41**(3), 329 – 362 (2005).
3. О. Н. Зефирова, А. Г. Дийков, Н. В. Зык, Н. С. Зефилов, *Изв. РАН. Сер. хим.*, **56**(4), 655 – 662 (2007).
4. O. N. Zefirova, E. V. Nurieva, H. Lemcke, et al., *Mendeleev Commun.*, **18**(4), 183 – 185 (2008).
5. O. N. Zefirova, E. V. Nurieva, H. Lemcke, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**(18), 5091 – 5094 (2008).
6. J. Chen, T. Liu, X. Dong, and Y. Hu, *Mini Rev. Med. Chem.*, **9**(10), 1174 – 1190 (2009).
7. O. N. Zefirova, E. V. Nurieva, D. V. Shishov, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **19**(18), 5529 – 5538 (2011).
8. O. N. Zefirova, H. Lemcke, M. Lantow, et al., *Chem. Bio. Chem.*, **14**(12), 1444 – 1449 (2013).
9. Е. М. Трещалина, Н. В. Андропова, Г. К. Герасимова и др.; в кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*, изд. Гриф и К., Москва (2012), 39, сс. 642 – 657.
10. M. Rösner, H.-G. Capraro, A. E. Jacobson, et al., *J. Med. Chem.*, **24**(3), 257 – 261 (1981).
11. P. Kerekes, P. N. Sharma, A. Brossi, et al., *J. Med. Chem.*, **28**(9), 1204 – 1208 (1985).
12. N. F. Magri, D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.*, **51**(2), 298 – 306 (1988).
13. Zh. Fang, G. E. Agoston, G. Ladouceur, et al., *Tetrahedron*, **65**(1), 10535 – 10543 (2009).
14. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **65**(1 – 2), 55 – 63 (1983).

Поступила 11.10.13

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF TUBULOCLUSTIN AND ITS STEROID ANALOGS

O. N. Zefirova^{1,2}, E. V. Nurieva¹, Ya. S. Glazkova^{1*}, N. A. Zefirov¹, A. V. Mamaeva¹, B. Wobith³, V. I. Romanenko⁴, N. A. Lesnaya⁴, E. M. Treshchalina⁴, and S. A. Kuznetsov³

¹ Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

² Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, Russia

³ Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Rostock, Germany

⁴ Blokhin Russian Oncological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia

* e-mail: olgaz@org.chem.msu.ru

Daily administration of tubuloclustin (1/24 h × 5 day, i.p.) in BDF1 mice with transplanted peritoneal lympholeukemia P388 leads to a significantly (45%) increased life span (17 days against 11.7 ± 3 days, $p < 0,05$). The principal possibility of the synthesis of analogs on the basis of 2-methoxyestradiol with a linker attached by ester bond at C6 of the steroid is demonstrated. However, the obtained conjugates were found to be rather unstable because of their strong tendency to elimination with the formation of C⁶–C⁷ double bond. This circumstance can be responsible for a low cytotoxicity of obtained analogs in MTT test on A549 cell line (IC₅₀ 10 mM,) and requires developing the synthesis of more stable conjugates as potential antitumor agents.

Keywords: colchicine derivatives, adamantane, tubulin, tubuloclustin, lympholeukemia P388, antitumor activity, 2-methoxyestradiol, human lung carcinoma A549 cell line, cytotoxicity