

В. М. Ржезников¹, Л. Е. Голубовская¹, О. Н. Минайлова¹, Б. И. Кеда¹,
Т. И. Иваненко¹, В. П. Федотов¹, Л. П. Сушина², Т. А. Тимова²,
В. Н. Толкачев², И. П. Осетрова², З. С. Смирнова²

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СТЕРОИДЫ. 2. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 11 α -ГИДРОКСИЭСТРА-1,3,5(10)-ТРИЕНОВ С БИС-(2-ХЛОРЭТИЛ)АМИНОСОДЕРЖАЩИМ ЗАМЕСТИТЕЛЕМ В ПОЛОЖЕНИИ 11

¹ Эндокринологический научный центр РАМН, Москва;

² Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Этерификацией карбодиимидным способом 3-ацетатов 11 α -гидроксипроизводных эстрадиола и 17 α -этинилэстрадиола *para*-[бис(2-хлорэтил)амино]фенилуксусной кислотой получены противоопухолевые стероиды с цитотоксическим заместителем, присоединенным к стероиду без участия природных функциональных групп. Отдельные представители этого ряда соединений сочетают противоопухолевую активность с антиэстрогенной.

Ранее мы показали, что некоторые эфиры 11 α -гидроксиэстра-1,3,5(10)-триенов с бис-(2-хлорэтил)аминосодержащим заместителем в положении 3 обладают редким сочетанием цитотоксических и антиэстрогенных свойств, обуславливающих их высокую противоопухолевую активность [1, 2]. В качестве синтонов для получения указанных соединений использовали 11 α -гидроксиэстра-1,3,5(10)-триены. Наличие в их структуре дополнительной гидроксильной группы существенно расширяет возможности описанного синтеза, позволяет решать задачи получения новых противоопухолевых веществ и исследования связи между строением и активностью цитотоксических стероидов.

Еще одной важной проблемой в синтезе цитотоксических стероидов является получение веществ с максимальной способностью связывания с рецепторами к гормонам. Только в этом случае стероид может наилучшим образом выполнять функцию направленного транспорта цитостатика в опухоль. Известные противоопухолевые препараты на основе цитотоксических эстрогенов эстрацит и бусрамустин обладают весьма незначительной рецепцией и потому низкой селективностью действия [3].

Введение цитотоксического фрагмента в положение 11 делает возможным синтез стероидных цитостатиков со свободными природными функциональными группами, вносящими существенный вклад в степень связывания стероида с рецепторными, а также транспортными белками [4, 5].

Для решения отмеченных выше задач был предпринят синтез эфиров 11 α -гидроксиэстра-1,3,5(10)-триенов с бис-(2-хлорэтил)аминосодержащим заместителем в положении 11, включая соединения с одной (C³) и двумя (C³ и C¹⁷) незамещенными гидроксильными группами.

В плане структурно-функционального анализа интересным представлялось сравнение противоопухолевой активности соединений III – V и их региоизомеров с цитотоксическим заместителем в положении 3 [1] и оценка влияния на биологические свойства синтезиро-

ванных соединений этого объемистого заместителя, расположенного весьма необычно для известных цитотоксических стероидов.

Синтез противоопухолевых стероидных цитостатиков был проведен в ряду эстрадиола и 17 α -этинилэстрадиола. Для выполнения поставленной цели необходимо было дифференцировать гидроксильные группы в ранее описанных диолах (I). Региоселективное 11-ацилирование возможно только в случае формилирования и уже не удастся при ацетиловании [1]. Однако в щелочных условиях ацетилование диолов (I) протекает легко и региоселективно и при действии уксусного ангидрида образуются только 3-ацетаты (II) с выходом до 80 %.

Последние этерифицировали *para*-[бис(2-хлорэтил)амино]фенилуксусной кислотой (CytOH) карбодиимидным методом с дициклогексилкарбодиимидом (ДЦК) и диметиламинопиридином (ДМАП) в качестве катализатора [6]. Соединения со свободной 3-ОН группой получали гидролизом соответствующих ацетатов триэтиламино. Сложноэфирная связь при атоме 11-С настолько прочная, что позволяет удалять не только 3-ацетильную группу, но и остаток пропионовой кислоты в положении 17 действием поташа на диэфир (III).

Физико-химические и спектральные характеристики синтезированных соединений представлены в табл. 1. Сравнение спектральных данных этих соединений с аналогичными для их 3-региоизомеров [1, 2] свидетельствует об отсутствии заметного влияния на УФ и ИК спектры изменения положения в молекуле стероида бис-(2-хлорэтил)аминосодержащего заместителя.

Этот объемистый заместитель также не влияет на величины химических сдвигов сигналов углеродной метильной группы и протона 11-Н в спектрах ¹H ЯМР, так что их значения мало отличаются от таковых даже для эфиров 11 α -гидроксиэстра-1,3,5(10)-триенов с не большими ацильными радикалами типа формиатов или ацетатов [1].

Экспериментальная химическая часть

Температуру плавления определяли на нагревательном столике “Boetius”. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Hilger-Watts в хлороформе. Уф-спектры снимали на приборе Specord UV-Vis в этаноле, а ИК-спектры на приборе Specord 75 IR в таблетках с KBr. Спектры ЯМР ¹H записывали на спектрометре Bruker DPX-400 в CDCl₃, внутренний стандарт TMS. ТСХ выполняли на пластинках Silufol UV 254 в системах этилацетат (30, 40 %) – гексан. Найденные величины элементных анализов соответствуют вычисленным.

Этерификацию 11α-гидроксистероидов с CytOH и гидролиз 3-ацетатов проводили описанным способом [1].

Общая методика получения 3-ацетатов (II). К перемешиваемому раствору (суспензии) 1,0 ммоль диола (I) в 10 мл ацетона приливают 30 мл 0,5 н. раствора (15 ммоль) NaOH и при охлаждении 1,4 мл (15 ммоль) укусного ангидрида. Смесь продолжают перемешивать 5 – 10 мин, нейтрализуют 10 % HCl, технический продукт высаживают водой и очищают хроматографией на SiO₂.

11-пара-[Бис(2-хлорэтил)аминофенилацетат эстра-1, 3, 5(10)-триен-3,11α,17β-триола (V). Раствор 970 мг (1,0 ммоль) эфира (IVa) в 40 мл метанола перемешивают при комнатной температуре с 560 мг (4,0 ммоль) K₂CO₃ в течение 16 ч, нейтрализуют 10 % HCl, остаток после упаривания растворяют в CHCl₃, фильтруют через 10 г силикагеля и выделяют 480 мг (58 %) диола V с т. пл. 98 – 101 °С.

Экспериментальная биологическая часть

Противоопухолевую активность исследуемых веществ изучали на перевиваемых моделях опухолей мышей — аденокарциноме молочной железы Ca-755 и меланоме В-16.

Критериями оценки активности служили процент торможения роста опухоли (ТРО), увеличение продолжительности жизни (УПЖ) и процент излечения

опытных животных по сравнению с контрольными [7, 8]. Вещества вводили подкожно в масляном растворе в течение 5 дней в суммарной дозе 10 – 100 мг/кг через 48 ч после перевивки опухолей.

Антиэстрогенную активность (АЭА) определяли в утеротропном тесте по степени ингибирования исследуемыми соединениями в дозе 100 мкг/животное утеротропного действия одновременно вводимого эстрогена в дозе 1 мкг/животное на матки неполовозрелых самок крыс при подкожном введении препаратов [9]. Взаимодействие с эстрогенными рецепторами матки крыс изучали *in vitro* (конкурентный анализ) [10, 11] и оценивали как относительную связывающую активность (ОСА) в процентах к связывающей способности эстрадиола.

Модель соединения V и приведенные расчеты выполнены с использованием программы Chemoffice Uitra 8.0 [16].

Результаты и их обсуждение

Синтезированные соединения представляют собой принципиально новый тип цитотоксических стероидов, в которых, в отличие от описанных [12], цитотоксический фрагмент присоединен к молекуле стероида, но не к его природной функциональной группе. Четыре из пяти исследованных соединений проявляют умеренную противоопухолевую активность на аденокарциноме молочной железы мышей Ca-755 (см. табл. 2), наиболее употребительной модели оценки противоопухолевого действия стероидных производных [13]. При этом производные эстрадиола IIIa, б характеризуются равными значениями ТРО — 73 %, несмотря на то, что фенол IIIб обладает максимальной для всех соединений антиэстрогенной активностью. В ряду этинилэстрадиола фенол IVб активнее ацетата IVa, ТРО составляет 77 и 58 % соответственно. Оба соединения не обладают антиэстрогенным эффектом, а ацетат даже незначительно (менее 5 %) усиливает действие эстрогена. Последнее соединение V со свободными гидроксильными группами проявляет наивысшую проти-

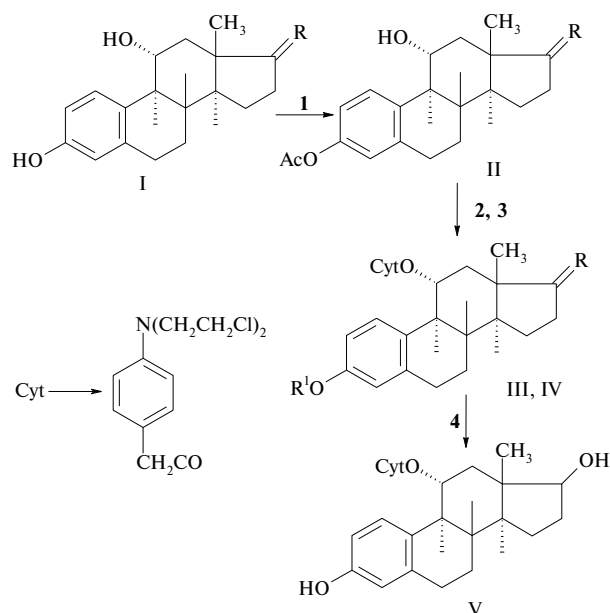
Таблица 1

Физико-химические и спектральные характеристики соединений III – V

Соединение	Т. пл., °С (растворитель)	[α] _D , град	λ _{max} (lgε)	¹ H ЯМР: CDCl ₃ , м. д., мультиплетность, КССВ в Гц						
				18-CH ₃ с	C≡CH с	11-Н тд	CH ₂ в Cyt м	Наром (7H)	Ацил	17-Н т
IIIa	аморфн.	-39	262 (4,3) 300,5 (3,37)	0,84		5,35 10 и 5	3,51, 3,66	6,56 – 7,2	1,13 т (COEt), 2,27 с (Ac)	4,72
IIIб	144 – 148 (метанол)	-115	262,5 (4,3) 300 (3,32)	0,92	2,65	5,35 9,5 и 5	3,54, 3,65	6,3 – 7,23	2,03 с (Ac)	
IVa	аморфн.	-57	261 (4,3)	0,84		5,31 10 и 5	3,51, 3,67	6,3 – 7,2	1,13 т (COEt)	4,73
IVб	183 – 186 (эфир)	-118	262 (4,27) 296* (3,28)	0,91	2,65	5,35 9,8 и 5	3,54, 3,66	6,67 – 7,22	2,03 с (Ac)	
V	100 – 102 (метанол)	-52	261 (4,45) 296* (3,46)	0,78		5,34 10 и 5	3,51**, 3,65	6,25 – 7,21		

* плечо

** мультиплет включает сигнал 17-Н



R = β -OCOEt + α -H(a), β -OAc + α -C \equiv CH (б)

R¹ = Ac(III), H(IV)

1. Ac₂O, NaOH

2. CytOH, ДЦК, ДМАП

3. (C₂H₅)₃N

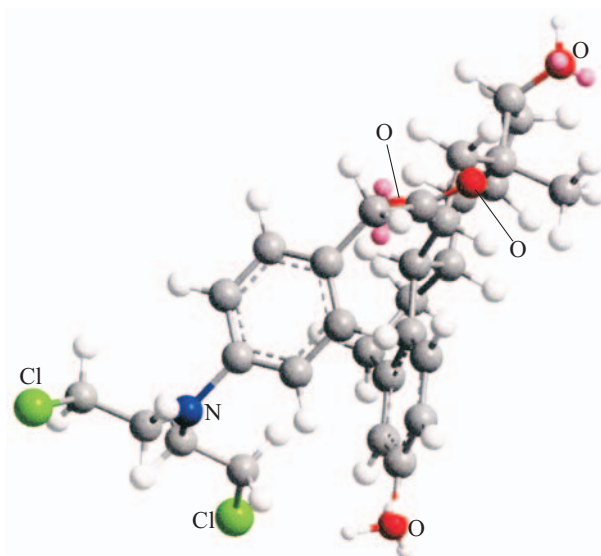
4. K₂CO₃

воопухоловую активность с ТРО равным 92 %, V обладает также антиэстрогенной активностью.

Можно отметить, что в плане изучения связи между строением и активностью производные 11 α -гидроксиэстра-1,3,5(10)-триенов крайне скудно представлены в литературе, приведены данные антиэстрогенной активности лишь некоторых простых эфиров и формиатов 11 α -гидрокси-17 α -этинилэстрадиола [14, 15]. В этой связи антиэстрогенная активность соединений IIIб и V с объемистым 11-заместителем представляет интерес.

Как следует из табл. 2, рецепцией обладают лишь соединения со свободными гидроксилами: в очень слабой степени она присутствует у фенолов IIIб, IVб, но фенол V с дополнительной гидроксильной группой в положении 17 обладает рецепцией, почти на два порядка превосходящей таковую для известного стероидного цитостатика эстрацита [12].

На проекции пространственной структуры V видно (см. рисунок), что объемистый 11-заместитель не экранирует гидроксильные группы и, тем самым, не препятствует связыванию его с эстрогенными рецепторами, что обеспечивает транспорт стероидного цитостатика в опухоль и его высокую активность. Отсутствие экранирующего влияния обусловлено экваториальной конфигурацией заместителя, размеры которого вполне сопоставимы с размерами стероидного фрагмента, расстояние между удаленными атомами хлора и кислорода карбонильной группы в цитотоксическом заместителе составляет 9,766 Å, тогда как между кислородными атомами O³ и O¹⁷ в стероиде 10,884 Å.



Пространственная структура соединения V

Сравнение противоопухолевой активности представленных соединений и их аналогов с цитотоксическим заместителем в положении 3 позволяет оценить влияние этого изменения структуры на активность. Первые уступают своим аналогам и их менее выраженная противоопухолевая активность, как мы полагаем, связана с характером сложноэфирной связи между стероидом и цитотоксическим фрагментом. У соединений с этим фрагментом, присоединенным к кольцу A, сложноэфирная связь, как образованная с участием фенольного гидроксила, должна быть менее стабильной и более подверженной гидролизу, что должно способствовать созданию более высокой концентрации бис-(2-хлорэтил)аминосодержащего цитостатика в опухолевых тканях.

К достоинствам описанных соединений можно отнести высокую рецепцию диола V, сочетающуюся с данными противоопухолевой активности. Для V характерны не только ТРО, превышающее 90 %, но и до-

Таблица 2
Биологическая активность соединений III – V

Соединение	АЭА, %	Противоопухолевая активность						ОСА, %
		Ca-755			B-16			
		Доза, мг/кг	ТРО, %	УПЖ, %	Доза, мг/кг	ТРО, %	УПЖ, %	
IIIa	0	75	73	27	н/и**	н/и	н/и	0,0
IIIб	31,0	25	73	30	10	40	4	0,12
IVa	с. а.*	75	58	11	н/и	н/и	н/и	0,0
IVb	0	50	77	76	10	40	0	0,05
V	14,4	25	92	65 (25***)	н/и	н/и	н/и	7,8

Значения активности достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$

* слабый агонист эстрогена

** н/и — не исследовалось

*** % излечения опытных животных

вольно редкая способность вызывать частичное излечение подопытных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Ржезников, Л. Е. Голубовская, О. Н. Минайлова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **41**(4), 8 – 11(2007).
2. Л. Е. Голубовская, З. С. Смирнова, В. Н. Толкачев, В. М. Ржезников, *Биоорг. химия*, **32**(2), 118 – 121 (2006).
3. J. L. Wittliff, S. A. Wiehle, J. P. Sandoz, et al., in: *Cytotoxic estrogens in hormone receptive tumors*, J. Raus, H. Martens, G. Leclerq (eds.), Academic press, London (1980), pp. 147 – 163.
4. G. Leclerq, *Arch. Geschwulstforsch*, **51**(7), 643 – 649 (1981).
5. J. P. Raynaud, M. M. Bouton, in: *Cytotoxic estrogens in hormone receptive tumors*, J. Raus, H. Martens, G. Leclerq (eds.), Academic press, London (1980), pp. 49 – 70.
6. Д. М. Браун, *Успехи органической химии*, Мир, Москва (1966), сб. 3.
7. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Ремедиум, Москва (2000), сс. 319 – 325.
8. H. Michina, M. R. Schneider, El Nishino, and M. F. Etreby, *J. Steroid Biochem.*, **34**, 447 – 453 (1989).
9. J. Bowler, T. J. Lilley, J. D. Pittam, and A. E. Wakeling, *Steroids*, **54**, 71 – 100 (1989).
10. M. R. Schneider and E. Angerer, *J. Med. Chem.*, **25**, 1070 (1982).
11. В. М. Ржезников, Т. И. Иваненко, Е. В. Покровская, В. П. Федотов, *Хим.-фарм. журн.*, **20**(9), 1057 – 1060 (1986).
12. *Cytotoxic estrogens in hormone receptive tumors*, J. Raus, H. Martens, G. Leclerq (eds.), Academic press, London (1980).
13. З. С. Смирнова, *Дис. докт. мед. наук*, Москва (2000).
14. L. Ferland, F. Labric, P. A. Kelly, and J. P. Raynaud, *Biol. Reprod.*, **18**, 99 – 104 (1978).
15. В. М. Ржезников, *Химия природ. соедин.*, № 5, 729 – 730 (1991).
16. <http://www.cambridgesoft.com>.

Поступила 02.11.06

ANTITUMOR STEROIDS: 2. SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF 11 α -HYDROXYESTRA-1,3,5,(10)-TRIENE DERIVATIVES WITH BIS-(2-CHLOROETHYL)AMINO-CONTAINING SUBSTITUENTS

V. M. Rzhzheznikov¹, L. E. Golubovskaya¹, O. N. Minailova¹, B. I. Keda¹, T. I. Ivanenko¹, V. P. Fedotov¹, L. P. Sushinina², T. A. Titova², V. N. Tolkachev², I. P. Osetrova², and Z. S. Smirnova²

¹ Scientific Endocrinological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia;

² Blokhin Oncological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Antitumor steroids with a cytotoxic substituent attached to the steroid nucleus without participation of natural functional groups have been obtained by esterification of 3-acetates of 11 α -hydroxyderivatives of estradiol and 17 α -ethynylestradiol with *para*-[bis(2-chloroethyl)amino]phenylacetic acid using the carbodiimide method. Some substances of this series combine antitumor and antiestrogen activities.