

Н. А. Зефирова^{1, 2}, Ю. А. Евтеева¹, А. Р. Фаткулин¹, С. Шульц³,
С. А. Кузнецов³, О. Н. Зефирова^{1, 2*}

СИНТЕЗ, АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И ДЕЙСТВИЕ НА МИКРОТРУБОЧКИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ A549 НОВЫХ АНАЛОГОВ ТУБУЛОКЛАСТИНА

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, Москва.

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

³ Институт биологических наук Ростокского университета, Германия, Росток.

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

Комбретастиновые миметики противоопухолевого вещества тубулокластина [*N*-(7-(адамтан-2-илокси)-7-оксогептаноил)-*N*-дезацетилколхицина] получены этерификацией комбретастина моноэфирами пимелиновой или адипиновой кислот с адамантан-2-олом или (адамтан-1-ил)метанолом. Эти конъюгаты стабильны, цитотоксичны к клеткам карциномы легких человека A549 ($EC_{50} \approx 50 - 70$ нМ), вызывают деполимеризацию микротрубочек и слабую кластеризацию тубулина. Аналоги тубулокластина с укороченными линкерными цепями получены амидированием моноэфиров адипиновой или янтарной кислот с адамантан-1-олом или (адамтан-1-ил)метанолом *N*-дезацетилколхицином. Конъюгат *N*-(6-(адамтан-1-ил)-6-оксогексаноил)-*N*-дезацетилколхицин более активен ($EC_{50} \approx 4$ нМ), чем тубулокластин, и проявляет сильный тубулин-кластеризующий эффект. Все соединения серии вызывают апоптоз клеток A549. Сделан вывод о перспективности тестирования *N*-(6-(адамтан-1-ил)-6-оксогексаноил)-*N*-дезацетилколхицина на экспериментальных моделях карциномы A549 *in vivo*.

Ключевые слова: карцинома A 549; тубулокластин; колхицин; комбретастин; адамантан.

Противоопухолевая активность лигандов колхицинового домена димерного белка α, β -тубулина обусловлена их способностью ингибировать полимеризацию этого белка до микротрубочек, играющих важную роль в жизнедеятельности клетки [1, 2]. Хотя к настоящему моменту получено и изучено множество таких веществ, как природных, так и синтетических, их использование в клинической практике ограничивается единичными примерами из-за высокой общей токсичности [3] или малой эффективности *in vitro* и/или *in vivo* (см. примеры в [1, 4]). В ходе создания структур более активных и менее токсичных лигандов колхицинового домена тубулина в последнее десятилетие интенсивно используется прием “сдваивания” молекулярных фрагментов [5, 6], в том числе объединение колхицина (взаимодействующего преимущественно с β -субъединицей белка) с группировками, способными к связыванию с α -субъединицей тубулина (см. например, структуры **Ia** – **e** на рис. 1) [7 – 10].

С помощью такого подхода нами были получены тубулокластин (**Id**) и его узловой аналог **Ie**, обладающие не характерным для колхицина свойством кластеризации тубулина *in vitro* [10] и проявляющие высокую антипролиферативную активность по отношению к опухолевым клеткам *in vitro* [11] и *in vivo* [12].

Дальнейшие попытки увеличить активность и уменьшить общую токсичность тубулокластина имели ограниченный успех [12 – 16]. Поэтому целью настоящего исследования стало получение двух пар новых его аналогов, определение их антипролиферативной активности и влияния на сеть микротрубочек опухоле-

вых клеток, а также объяснение полученных результатов методами компьютерного молекулярного моделирования.

Для синтеза были предложены соединения **IIa**, **b** и **IIIa**, **b** (рис. 2), выбор которых базировался на ранее полученных данных структура — активность для аналогов тубулокластина [11, 13, 15]. Поскольку все изученные варианты замены колхицина в структурах **Id** и **Ie** фрагментами молекул других лигандов колхицинового домена тубулина с меньшей, чем у колхицина, общей токсичностью (2-метоксиэстрадиолом, комбретастином А-4 и др.) приводили к малоактивным соединениям [12, 14 – 16], мы предприняли еще одну попытку в этом направлении. Пара **IIa**, **b** представляет собой миметики исходных молекул **Id** и **Ie**, в которых вместо колхицинового фрагмента присутствует комбретастиновый, присоединенный к фенольному гидроксилу через сложноэфирную связь (такой тип присоединения нами ранее не изучался). В соединении **IIb** общая длина линкерной цепи не изменена по сравнению с соединением-лидером **Ie**, но одна сложноэфирная связь “сдвинута” от адамантанового фрагмента для придания большей конформационной гибкости терминальному фрагменту конъюгата.

Структуры конъюгатов **IIIa**, **b** были предложены на основе результатов исследования [13], показавшего возможность некоторого повышения антипролиферативной активности с помощью модификаций оксогептаноильной цепи молекулы **Ie** и целесообразность дальнейшего изучения ее аналогов с линкерной цепью, содержащей 4 и менее метиленовых групп.

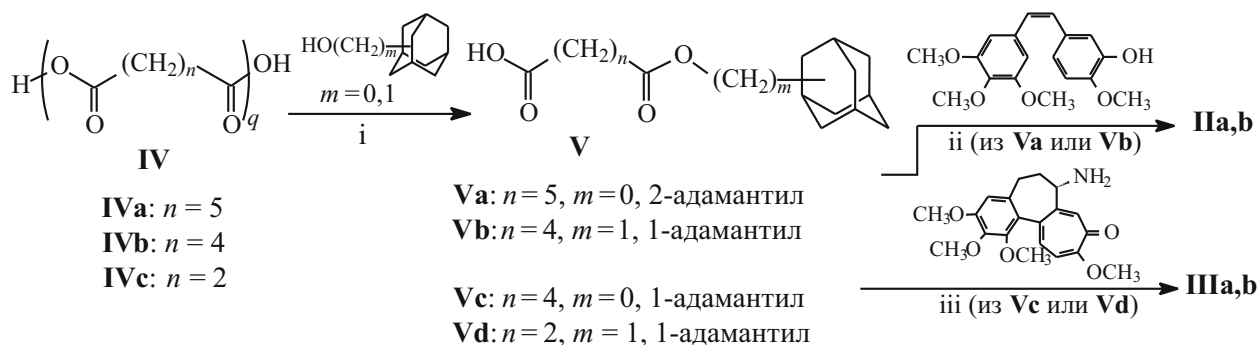


Схема 1. Реагенты и условия: i) 4-DMAP, CH_2Cl_2 , $t_{\text{комн.}}$, 24 ч [**Va** из **IVa** и адамантан-2-ола, 71 %; **Vb** из **IVb** и (адамантан-1-ил)метанола, 60 %; **Vc** из **IVb** и адамантан-1-ола, 49 %; **Vd** из **IVc** и (адамантан-1-ил)метанола, 50 %]; ii) комбретастиг А-4, **Va** или **Vb**, DCC, 4-DMAP, DMF, $t_{\text{комн.}}$ [**IIa** из **Va**, 67 %; **IIb** из **Vb**, 59 %]; iii) *N*-дезацетилколхицин, **Vc** или **Vd**, EEDQ, CH_2Cl_2 , $t_{\text{комн.}}$, 12 ч [**IIIa** из **Vc**, 56 %; **IIIb** из **Vd**, 25 %].

Синтез целевых конъюгатов **IIa, b** и **IIIa, b** осуществляли поэтапно. Изначально реакцией полиангидридов пимелиновой или адипиновой кислот или ангидрида янтарной кислоты **IVa – c** (полученных взаимодействием соответствующих двухосновных кислот с укусным ангидридом) с адамантан-2-олом, (адамантан-1-ил)метанолом или адамантан-1-олом в присутствии каталитического количества 4-диметиламинопиридина (4-DMAP) нами были получены моноэфиры **Va – d** с выходами 49 – 71 % (схема 1). В спектрах ЯМР ^{13}C ранее неописанных соединений **Vc** и **Vd** (см. экспериментальную часть) появляется характеристический сигнал атомов углерода сложноэфирной группы (173,55 м.д. для **Vc** и 172,18 м.д. для **Vd**). В спектре ЯМР ^1H соединения **Vd** наблюдается также характерный сдвиг сигнала протонов $\text{Ad-CH}_2\text{-O-}$ (3,70 м.д.) в область слабого поля по сравнению с таковым для исходного каркасного спирта (3,17 м.д.).

Целевую пару соединений **IIa, b** синтезировали по реакции этерификации полученных моноэфиров карбоновых кислот **Va, b** с комбретастигином А-4 в при-

сутствии *N,N*-дициклогексилкарбодиимида (DCC) и 4-DMAP. Образование сложноэфирной связи подтверждает наличие в спектрах ЯМР ^{13}C конъюгатов **IIa, b** 2 сигнала карбонильных атомов углерода сложноэфирных групп при 171,42 м.д. и 172,97 м.д. для **IIa** и при 172,24 и 173,63 м.д. для **IIIa**. В MALDI-TOF масс-спектрах наблюдаются пики молекулярного иона m/z 592 (M^+). Отметим, что хотя сложные эфиры комбретастигина А-4 достаточно стабильны (см., например, [17]), стабильность соединений **IIa, b** в растворе CDCl_3 в течение 3 сут была дополнительно доказана с помощью спектроскопии ЯМР.

Для получения целевой пары конъюгатов колхицина **IIIa, b** предварительно был проведен трехстадийный синтез *N*-дезацетилколхицина по методикам, описанным в [18, 19]. Реакция амидирования моноэфиров **Vc** и **Vd** *N*-дезацетилколхицином в присутствии *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина (EEDQ) привела к искомым конъюгатам **IIIa** и **IIIb** с выходами 56 и 25 %. В спектрах ^1H ЯМР соединений **IIIa** и **IIIb** наблюдалось смещение сигнала протона при C_7 колхи-

Результаты биотестирования на клеточной линии легочной эпителиальной карциномы человека A549

Соединение	Цитотоксичность* EC ₅₀ , нМ	Влияние на микротубулярную сеть**
IIa	70 ± 6	10 μМ: 24 ч — деполимеризация микротрубочек, 72 ч — в некоторых клетках точечная кластеризация
IIb	53 ± 5	10 μМ: 24 ч — деполимеризация микротрубочек, в некоторых клетках точечная кластеризация
IIIa	4,2 ± 0,5	100 нМ: 24 ч — полная деполимеризация микротрубочек, 800 нМ: 24 – 72 ч — сильная кластеризация
IIIb	13 ± 2	1 μМ: 24 ч — полная деполимеризация микротрубочек, 72 ч — умеренная кластеризация
Id (тубулокластин)	6 [11]	1 μМ: 24 ч — деполимеризация и сильная кластеризация
II [R = $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5\text{C}(\text{O})\text{O}-^2\text{Ad}$]	1040 [15]	10 μМ: 24 ч — деполимеризация микротрубочек, 72 ч — в некоторых клетках точечная кластеризация [15]
Ie	11 [11]	1 μМ: 24 ч — деполимеризация и сильная кластеризация
СА-4	10 ± 2	1 μМ: 24 – 72 ч: деполимеризация микротрубочек и отсутствие кластеризации
Колхицин	31 ± 5	1 μМ: 24 – 72 ч: деполимеризация микротрубочек и отсутствие кластеризации

* Среднее из 3 независимых экспериментов;

** эффект на микротубулярную сеть при указанных концентрациях и периодах инкубации.

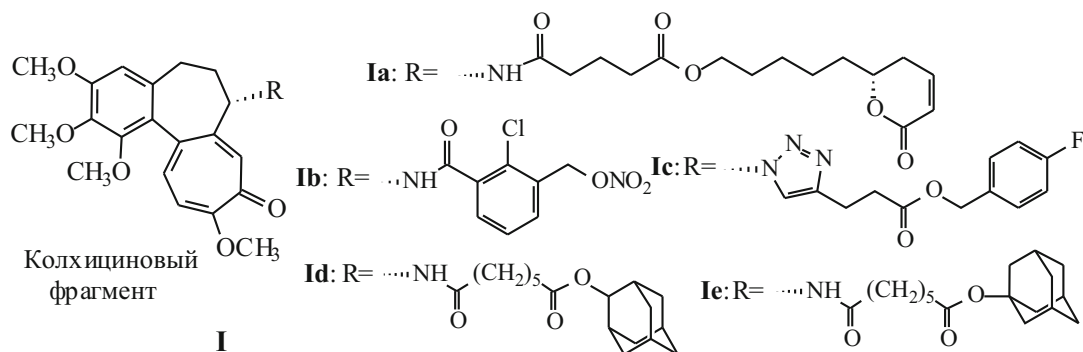


Рис. 1. Описанные в литературе конъюгаты колхицина с группировками, взаимодействующими с α -субъединицей тубулина, **Id** — тубулокластин.

цинового фрагмента в более слабое поле (4,65 м.д.) относительно сигнала того же протона в спектре *N*-дезацетилколхицина (~ 3,71 м.д.), что подтверждает образование амидной связи. В спектрах ^{13}C ЯМР соединений **IIIa** и **IIIb** исчезает характерный для исходных кислот **Va**, **b** сигнал карбонильного атома углерода карбоксила (178,42 – 179,52 м.д.). Данные масс-спектрометрии и элементного анализа подтверждают строение всех ранее не описанных веществ.

Антипролиферативную активность (цитотоксичность) целевых конъюгатов комбретастина **IIa**, **b** и колхицина **IIIa**, **b** по отношению к клеткам эпителиальной легочной карциномы человека A549 определяли в стандартном колориметрическом тесте с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола гидробромидом (МТТ, [20]), а также прямым подсчетом клеток A549 под микроскопом через 24 и 48 ч обработки тестируемыми веществами. С помощью метода иммунофлуоресцентной спектроскопии нами была изучена способность полученных соединений оказывать эффект на сеть микротрубочек клеток A549 и стимулировать апоптоз (таблица, рис. 3, *a–f*).

Согласно данным МТТ теста комбретастиновые конъюгаты **IIa** и **IIb** обладают высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам карциномы A549 со значениями EC_{50} около 50 – 70 нМ, то есть приблизительно равными EC_{50} колхицина и несколько превышающими EC_{50} комбретастина А-4 (табл. 1). В эксперименте по прямому подсчету клеток показано, что через 24 ч их обработки соединениями **IIa** и **IIb** в концентрации 10 μM клеточная пролиферация полностью ингибируется. Оба конъюгата вызывают также апоптоз опухолевых клеток [% клеток с фрагментацией ядра, характерной для апоптоза (рис. 3, *e*), при обработке 10 μM **IIa**: 24 ч — 18, 48 ч — 42, 72 ч — 48; **IIb**: 24 ч — 42, 48 ч — 47, 72 ч — 60].

Интересные результаты были получены методом иммунофлуоресцентной микроскопии (рис. 3, *a–d*). Оба конъюгата **IIa** и **IIb** полностью деполимеризовали микротрубочки клеток A549 и вызывали в некоторых из них образование небольших точечных кластеров тубулина (рис. 3, *c*), характерных для ряда аналогов тубулокластина и для ранее полученного нами близко по структуре и менее цитотоксичного конъюгата **II**

[$\text{R} = -\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5\text{C}(\text{O})\text{O}-^2\text{Ad}$] (таблица) [16]. Эти данные, во-первых, указывают на то, что возможный гидролиз сложноэфирной связи по фенольному гидроксильному в соединениях **IIa**, **b** неспецифическими клеточными эстеразами, если и происходит, то в незначительной степени, и в клетках остается большое число негидролизованых молекул (так как продукты гидролиза не обладают кластеризующим эффектом). Кроме того, полученные результаты дополнительно подтверждают высказывавшуюся нами ранее гипотезу о том, что кластеризующий эффект может проявляться аналогами тубулокластина, содержащими фрагменты различных лигандов колхицинового домена тубулина [15].

Компьютерный докинг соединений **IIa**, **IIb** и **II** [$\text{R} = -\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5\text{C}(\text{O})\text{O}-^2\text{Ad}$] в трехмерные модели структур комплексов тубулинового димера с различными лигандами колхицинового домена (PDB ID: 1SAO, 4O2B) с помощью программы CLC Drug Discovery Workbench (Version 1.5) позволил выявить вариант расположения 3 указанных молекул в модели 4O2B (из нескольких с минимальными значениями оценочных функций), объясняющий полученные результаты тестирования (рис. 4).

Как видно из рис. 4, позиции линкерной группировки с адамантаном у конъюгатов **IIa** и **IIb** близки и отличаются от таковой для соединения **II** [$\text{R} = -\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5\text{C}(\text{O})\text{O}-^2\text{Ad}$]. Однако адамантановый каркас всех 3 молекул оказывается в липофильных областях α -субъединицы белка, недалеко от аминокислотного остатка $\alpha\text{Tyr}224$, что характерно для соединений, способных вызывать характерный для тубулокластина и его аналогов кластеризующий эффект [10, 15]. Расположение комбретастиновых фрагментов рассматриваемых молекул в белке близко к таковому для свободного комбретастина в случае конъюгатов **IIa**, **b**, и заметно отличается от него для соединения **II** [$\text{R} = -\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5\text{C}(\text{O})\text{O}-^2\text{Ad}$]. По-видимому, это различие обусловлено ограничением свободного вращения вокруг фенольной сложноэфирной связи в соединениях **IIa**, **b**, так как карбонильный атом кислорода указанной группировки не участвует, по данным моделирования, в образовании водородной связи с аминокислотными остатками белка.

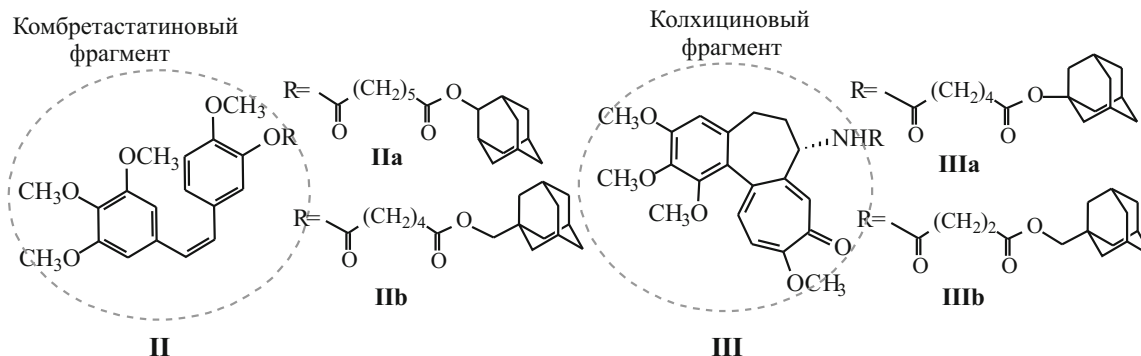


Рис. 2. Структуры новых аналогов молекул **Ia** и **Ib** с заменой колхицинового фрагмента комбретастиновым и модификациями линкерной цепи.

Согласно данным МТТ-теста колхициновых конъюгатов с укороченными линкерными цепочками **IIIa** и **IIIb**, оба проявляют высокую цитотоксичность к опухолевым клеткам, причем значение EC_{50} для конъюгата **IIIa** на порядок ниже, чем для колхицина. Более того, это соединение превосходит по цитотоксичности и тубулокластин **Id**, и его узловой аналог **Ie** (таблица). Уже в концентрации 100 нМ конъюгат **IIIa** вызывает полную деполимеризацию тубулина (таблица), а при 800 нМ дает сильный (рис. 3, *d*) кластеризующий эффект (образование точечных кластеров начинается при существенно более низких концентрациях). Оба соединения в концентрации 1 мМ полностью ингибируют клеточный рост и вызывают апоптоз (определено по фрагментации ядер, рис. 3, *e*).

В целом, результаты данного исследования демонстрируют возможность получения миметиков тубулокластина с заменой колхицинового фрагмента менее токсичным лигандом колхицинового сайта тубулина с сохранением значимой цитотоксичности к опухолевым клеткам и стимулируют дальнейшие исследования в этом направлении. Цитотоксичность конъюгата **IIIa** к клеточной линии карциномы легких человека A549 сравнима с таковой для одного из наиболее эффективных тубулин-направленных клинически используемых противоопухолевых препаратов — таксола. В связи с этим конъюгат **IIIa** представляет интерес для последующего изучения в тестах *in vivo*.

Экспериментальная химическая часть

Контроль хода реакций и чистоты веществ осуществляли методом ТСХ на пластинах Silufol-UV254. Хроматографическое разделение проводили на колонках с силикагелем Acros (40 – 60 мкм). Спектры ЯМР 1H и ^{13}C регистрировали при 28 °C на спектрометре Bruker Avance 400 (400 и 100 МГц соответственно). Химические сдвиги приведены в шкале δ (м.д.) относительно остаточного сигнала растворителя, константы спин-спинового взаимодействия указаны в герцах (Гц). Элементный анализ выполняли на CHN-анализаторе Vario micro cube. MALDI-TOF масс-спектры регистрировали на приборе Bruker Autoflex II. В работе использовали колхицин фирмы Sigma-Aldrich (чистота

по данным HPLC > 95 %) и тубулокластин, синтезированный по методике, описанной в [11] (чистота по данным 1H ЯМР спектроскопии и элементного анализа > 95 %).

7-(2-Адамантилокси)-7-оксогептановая кислота (Va) получена по методике, описанной в [11]. Выход 71 %.

6-(Адамант-1-илметокси)-6-оксогексановая кислота (Vb) получена по методике, описанной в [13]. Выход 60 %.

6-(Адамант-1-ил)-6-оксогексановая кислота (Vc). К раствору 0,217 г (1,31 ммоль) адамантан-1-ола в CH_2Cl_2 (5 мл) прибавляют 0,500 г (3,9 ммоль) полиангидрида адипиновой кислоты и каталитическое количество (0,01 г) DMAP. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре 48 ч, растворитель упаривают на роторном испарителе. Остаток хроматографируют [элюент — этилацетат/петролейный эфир (40 – 70 °C), градиент 1:5 – 1:3]. Получают 0,180 г соединения **Vc** (выход 49 %), бесцветная масляная жидкость. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 1,51 – 1,52 (6H, м), 1,63 – 1,74 (10H, м), 1,98 (3H, м), 2,34 – 2,40 (4H, м), 10,70 (1H, уш. с, COOH). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 24,06, 24,32, 27,96, 33,08, 33,61, 33,88, 36,89, 39,21, 173,55 [C(O)O], 179,52 (COOH). $C_{16}H_{24}O_4$.

4-(Адамант-1-илметокси)-4-оксобутановая кислота (Vd). К раствору 0,341 г (2,05 ммоль) адамантан-1-илметанола в ТГФ (5 мл) прибавляют 0,612 г (6,12 ммоль) янтарного ангидрида и каталитическое количество (0,01 г) DMAP. Реакционную смесь кипятят с обратным холодильником 24 ч, растворитель упаривают. Остаток хроматографируют [элюент — этилацетат/петролейный эфир (40 – 70 °C), градиент 1:7 – 1:4]. Получают 0,270 г соединения **Vd** (выход 50 %), бесцветная масляная жидкость. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 1,51 – 1,52 (6H, м), 1,62 – 1,65 (3H, м), 1,71 – 1,74 (3H, м), 1,96 – 1,97 (3H, м), 2,63 – 2,71 (4H, м), 3,70 (2H, с, AdCH₂), 10,79 (1H, уш. с, COOH). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 27,96, 28,92, 29,03, 33,13, 36,87, 39,13, 74,39 (AdCH₂), 172,18 (COO), 178,42 (COOH). $C_{15}H_{22}O_4$.

1-Адамантан-2-ил-7-(2-метокси-5-((Z)-3,4,5-три-метоксистирил)фенил)гептандиоат (IIa). К раствору

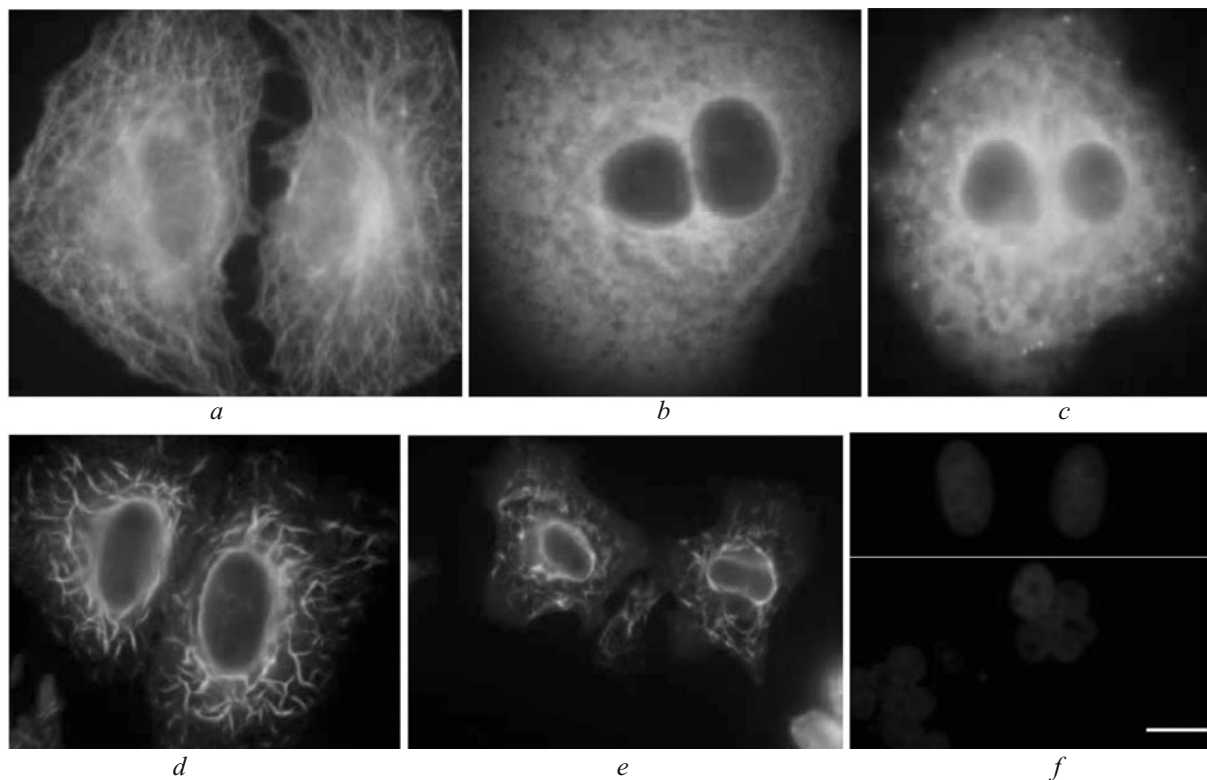


Рис. 3. Локализация тубулина в клетках карциномы A549, обработанных тестируемыми или контрольными веществами: *a* — целые микротрубочки (отрицательный контроль, 0,5 % ДМСО); *b* — диффузное распределение тубулина после деполимеризации микротрубочек (СА-4, положительный контроль); *c* — слабая (точечная) кластеризация тубулина; *d* — сильная кластеризация тубулина, аналогичная действию тубулокластина; *e* — умеренная кластеризация тубулина; *f* — нормальные нефрагментированные ядра (сверху), ядерная фрагментация, характерная для апоптозных клеток (снизу). Шкала 10 $\mu\text{м}$.

0,020 г (0,068 ммоль) соединения **Va** в CH_2Cl_2 (10 мл) прибавляют 0,020 г (0,063 ммоль) комбрегастатина А-4, 0,028 г (0,135 ммоль) DCC и каталитическое количество (0,01 г) DMAP. Перемешивают при комнатной температуре 12 ч, добавляют 5–10 мкл уксусной кислоты и через 15 мин растворитель упаривают. Остаток растворяют в этилацетате (10–20 мл) и выдерживают при 0–4 °С 2–3 ч. Выпавший осадок *N,N'*-дициклогексилмочевины отфильтровывают, промывают охлажденным этилацетатом (2 × 10 мл), фильтрат промывают насыщенным раствором NaCl (10 мл), водой (10 мл), сушат Na_2SO_4 и упаривают. Остаток хроматографируют [элюент: этилацетат — петролейный эфир (40–70 °С) 1:8–1:5]. Получают 0,025 г соединения **Pa** (выход 67 %), бесцветная маслянистая жидкость. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 1,46 (2H, м); 1,58 (3H, м); 1,67–1,78 (3H, м); 1,84 (6H, м); 1,99 (3H, м); 2,36 (2H, м, J = 6,9 Гц); 2,43 (1H, м, J = 6,9 Гц); 2,55 (2H, т, J = 7,5 Гц); 3,68 (2H, с, AdCH_2); 3,71 (6H, с, OCH_3); 3,80 (3H, с, OCH_3); 3,84 (3H, с, OCH_3); 4,93 (1H, м); 6,46 (2H, д, $\text{CH}=\text{CH}$, J = 1,5 Гц); 6,51 (2H, с, Ar); 6,85 (1H, д, Ar, J = 8,6 Гц); 7,00 (2H, д, Ar, J = 2,1 Гц); 7,12 (1H, дд, Ar, J = 2,1, 8,4 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 24,61, 24,79, 28,50, 31,77, 32,72, 33,71, 34,65, 36,30, 37,35, 55,89, 56,07, 60,86, 76,77, 103,35, 105,79, 111,91, 120,28, 123,12, 127,58, 128,57, 129,44, 130,04, 132,42, 139,44,

150,20, 152,92, 171,42 (C=O), 172,97 (C=O). Масс-спектр (MALDI-TOF) m/z : 592 [M^+K^+].

Адамант-1-илметокси-6-(2-метокси-5-((Z)-3,4,5-триметоксистирил)фенил)гександиоат (Pb) синтезирован аналогично соединению **Pa** из 0,021 г (0,071 ммоль) соединения **Vb**, 0,020 г (0,063 ммоль), комбрегастатина А-4 и 0,028 г (0,135 ммоль) DCC. Получено 0,022 г соединения **Pb** (выход 59 %), желтая маслянистая жидкость. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 1,53 (6H, м); 1,60–1,78 (9H, м); 1,98 (3H, м); 2,34–2,40 (2H, м, J = 6,9 Гц); 2,57 (2H, т, J = 6,9 Гц); 3,68 (2H, с, AdCH_2); 3,71 (6H, с, OCH_3); 3,80 (3H, с, OCH_3); 3,84 (3H, с, OCH_3); 6,45 (2H, д, $\text{CH}=\text{CH}$, J = 1,3 Гц); 6,50 (2H, с, Ar); 6,85 (1H, д, Ar, J = 8,5 Гц); 7,00 (2H, д, Ar, J = 2,1 Гц); 7,12 (1H, дд, Ar, J = 2,1, 8,5 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 24,30, 24,42, 27,99, 33,11, 33,52, 33,89, 36,91, 39,23, 55,83, 55,87, 60,84, 73,95, 105,77, 111,88, 123,07, 127,60, 128,54, 129,44, 130,01, 132,41, 137,08, 139,39, 150,16, 152,91, 171,17 (C=O), 173,49 (C=O). Масс-спектр (MALDI-TOF) m/z : 592 [M^+K^+].

N-{6-[Адамантил]-6-оксогексаноил}-N-дезацетилколхицин (Pc). К раствору 0,050 г (0,15 ммоль) соединения **Vc** в CH_2Cl_2 (10 мл) при перемешивании прибавляют 0,037 г (0,15 ммоль) EEDQ и 0,48 г (0,13 ммоль) *N*-дезацетилколхицина. Перемешивают при комнатной температуре 24 ч, растворитель упаривают, остаток хроматографируют [элюенты: этилаце-

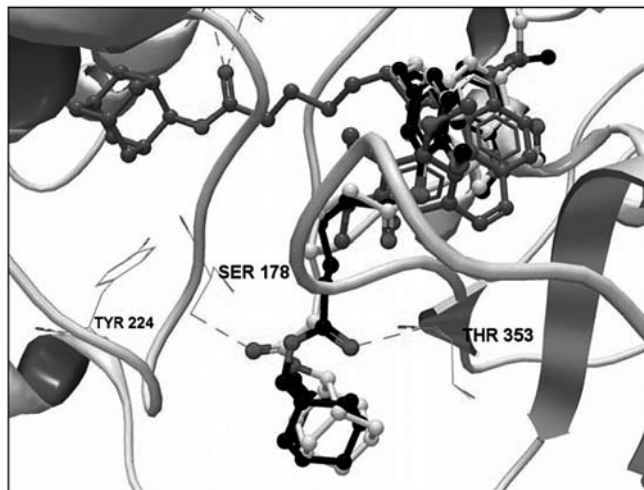


Рис. 4. Вариант расположения структур **Па** (показана светло-серым), **Пб** (показана черным) и **П** [$R = -CH_2-(CH_2)_5C(O)O^{-2}Ad$] (показана серым) в α , β -тубулиновом димере (β -субъединица представлена справа, α -субъединица — слева, водородные связи обозначены пунктирными линиями, большинство атомов водорода не показано для ясности).

тат — петролейный эфир (40–70 °С), 1:5, затем CH_2Cl_2 :метанол, 30:1]. Получено 0,045 г соединения **IIIa** (выход 56 %), желтая маслянистая жидкость. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 1,51–1,69 (м, 8H), 1,84–1,90 (м, 2H), 2,07 (м, 6H), 2,14 (м, 3H, H^6 колх.), 2,18–2,29 (м, 5H), 2,37–2,42 (м, 1H), 2,51 (дд, 1H, J 13,5, 6,2 Гц, H^5 колх.), 3,65 (с, 3H, OCH_3), 3,90 (с, 3H, OCH_3), 3,94 (с, 3H, OCH_3), 3,99 (с, 3H, OCH_3), 4,65 (м, 1H, H^7 колх.), 6,53 (с, 1H, H^4 колх.), 6,83 (д, 1H, J 11,0 Гц, H^{11} колх.), 6,91 (уш. с., 1H, NH), 7,30 (д, 1H, J 11,0 Гц, H^{12} колх.), 7,43 (с, 1H, H^8 колх.). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 24,58, 24,98, 25,83, 28,67, 29,93, 30,26, 33,36, 34,26, 34,28, 34,69, 35,96, 36,98, 51,64 (OCH_3), 52,15 (C^7 колх.), 56,12 (OCH_3), 56,44 (OCH_3), 61,40 (OCH_3), 61,62 (OCH_3), 66,91, 107,38, 113,02, 125,56, 130,64, 134,22, 135,82, 138,70, 141,68, 146,41, 152,19, 153,57, 164,02, 172,51 (C=O), 173,02 (C=O), 177,47 (C^9 колх.=O). $C_{36}H_{45}NO_8$.

N-{4-[Адамант-1-илметокси]-4-оксобутаноил}-**N**-дезацетилколхицин (**IIIb**) синтезирован аналогично конъюгату **IIIa** из 0,041 г (0,15 ммоль) соединения **Vd**, 0,037 г (0,15 ммоль) EEDQ и 0,050 г (0,14 ммоль) **N**-дезацетилколхицина. Получено 0,021 г соединения **IIIb** (выход 25 %), желтая маслянистая жидкость. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 1,51–1,69 (м, 5H), 1,84–1,90 (м, 2H), 2,07 (м, 6H), 2,14 (м, 3H, H^6 колх.), 1,83 (м, 1H), 1,93–1,98 (м, 3H), 2,25 (м, 1H), 2,42 (м, 1H), 2,69–2,70 (м, 2H), 3,64 (с, 3H, OCH_3), 3,91 (с, 3H, OCH_3), 3,94 (с, 3H, OCH_3), 4,00 (с, 3H, OCH_3), 4,65 (ддд, 1H, J 12,9, 6,7, 5,9 Гц, H^7 колх.), 6,49 (уш. с., 1H, NH), 6,53 (с, 1H, H^4 колх.), 6,86 (д, 1H, J 11,0 Гц, H^{11} колх.), 7,33 (д, 1H, J 11,0 Гц, H^{12} колх.), 7,50 (с, 1H, H^8 колх.). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 20,67, 27,97, 29,91, 33,08, 33,48, 35,15, 36,90, 37,04, 39,21, 52,28 (C^7 колх.), 56,08 (OCH_3), 56,51 (OCH_3), 61,34 (OCH_3), 61,59 (OCH_3), 74,00 ($AdCH_2$), 107,37,

112,74, 125,67, 130,65, 134,26, 135,42, 136,65, 141,64, 151,25, 153,52, 153,45, 163,93, 172,24 (C=O), 173,63 (C=O), 179,15 (C^9 колх.=O). $C_{35}H_{43}NO_8$.

Экспериментальная биологическая часть

МТТ тест на цитотоксичность проводили на линии клеток эпителиальной легочной карциномы человека А-549 (ССL-185) по методике, описанной в работе [13]. Тестирование каждого соединения повторяли трижды, результаты обрабатывали статистически (методом нелинейной регрессии, Excel: XLSTAT Software). Значения EC_{50} определяли из сигмоидальных кривых (достоверными считали значения при $p < 0,05$).

Рост клеток и тест с микротрубочками, иммунофлуоресцентно меченными, изучали на той же линии клеток по методикам, описанным в работе [16]. Различие эффектов на сеть микротрубочек для контрольных и тестируемых веществ определяли визуально с помощью микроскопа Nikon Diaphot 300 (Nikon GmbH, Dusseldorf, Германия), оснащенного камерой SenSys (Photometrics, Munich, Германия).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-33-01121_мол_а; авторы благодарят немецкую организацию DAAD, German Academic Exchange Service за поддержку академического обмена в рамках соглашения о сотрудничестве между Московским и Ростовским университетами.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Kumar, R. Kumar, I. Skvortsova, V. Kumar, *Cur. Cancer Drug Targets*, **17**(4), 357–375 (2017).
2. R. A. Stanton, K. M. Gernert, J. H. Nettles, R. Aneja, *Med. Res. Rev.*, **31**(3), 443–481 (2011).
3. S. Wu, J. Fisher, J. Naci, et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **26**(12), 1840–1861 (2013).
4. Н. А. Зефилов, О. Н. Зефилова, *Ж. орган. химии*, **51**(9), 1231–1240 (2015).
5. K. Nepali, S. Sharma, M. Sharma, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **77**, 422–487 (2014).
6. E. C. Breen, J. J. Walsh, *Cur. Med. Chem.*, **17**, 609–639 (2010).
7. C. Vilanova, S. Dáaz-Oltra, J. Murga, et al., *J. Med. Chem.*, **57**(24), 10391–10403 (2014).
8. S. K. Kim, S. M. Cho, H. Kim, et al., *Exp. Mol. Med.*, **45**, E19 (2013).
9. P. Thomopoulou, J. Sachs, N. Teusch, et al., *ACS Med. Chem. Lett.*, **7**(2) 188–191 (2015).
10. O. N. Zefirova, H. Lemcke, M. Lantow, et al., *ChemBioChem.*, **14**(12), 1444–1449 (2013).
11. O. N. Zefirova, E. V. Nurieva, D. V. Shishov, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **19**(18), 5529–5538 (2011).
12. О. Н. Зефилова, Е. В. Нуриева, Я. С. Глазкова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **48**(6), 19–24 (2014); *Pharm. Chem. J.*, **48**(6), 373–378 (2014).
13. N. A. Zefirov, M. Hoppe, I. V. Kuznetsova, et al., *Mendeleev Commun.*, **28**(3), 225–344 (2018).
14. О. Н. Зефилова, Я. С. Глазкова, Е. В. Нуриева и др., *Изв. АН. Сер. хим.*, **5**, 1126–1129 (2014).
15. O. N. Zefirova, E. V. Nurieva, B. Wobith, et al., *Molec. Diversity*, **21**(3), 547–564 (2017).
16. Е. В. Нуриева, Н. А. Зефилов, А. В. Мамаева и др., *Известия Академии наук, Сер. хим.*, **4**, 688–693 (2018).

17. B. Coggiola, F. Pagliai, G. Allegrone, et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **15**(15), 3551 – 3554 (2005).
18. L. Lebeau, P. Ducray, C. Mioskowski, *Synth. Commun.*, **27**(2), 293 – 296 (1997).
19. J. D. Bagnato, A. L. Eilers, R. A. Horton, C. B. Grissom, *J. Org. Chem.*, **69**(26), 8987 (2004).
20. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **65**(1 – 2), 55 – 63 (1983).

Поступила 28.05.18

NEW TUBULOCLUSTIN ANALOGS: SYNTHESIS, ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY AND EFFECT ON MICROTUBULES OF CARCINOMA A549 CELLS

N. A. Zefirov¹, Yu. A. Evteeva¹, A. R. Fatkulin¹, S. Schulz³,
S. A. Kuznetsov³, and O. N. Zefirova^{1,2*}

¹ Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

² Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

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

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

Combretastatin -based mimetics of anticancer agent tubuloelustin [N-(7-adamant-2-yloxy-7-oxoheptanoyl)-N-deacetylcolchicine] were obtained by esterification of combretastatin with monoesters of pimelic or adipic acids with adamantan-2-ol or (adamantan-1-yl)methanol. These conjugates are stable, cytotoxic to human lung carcinoma cells A549 ($EC_{50} \approx 50 - 70$ nM), and cause depolymerization of microtubules and weak tubulin clustering. Tubuloelustin analogs with shortened linkers were obtained by amidation reaction of N-deacetylcolchicine and monoesters of pimelic or succinic acids with adamantin-1-ol or (adamantan-1-yl)methanol. One conjugate (IIIa) is more active ($EC_{50} \approx 4$ nM) than tubuloelustin and promotes strong tubulin clusterization. All synthesized compounds cause apoptosis of A549 cells. It is concluded that conjugate IIIa is promising for the following studies *in vivo* using experimental models of carcinoma A549.

Keywords: carcinoma A549; tubuloelustin; colchicine; combretastatin; adamantane.