

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

*Изер*

**Зефилов Николай Алексеевич**

**Биоизостерическая замена  
в дизайне и синтезе новых лигандов тубулина  
с противоопухолевой активностью**

02.00.16 – Медицинская химия

02.00.03 – Органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва 2018

Работа выполнена в лаборатории медицинской химии кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

**Научные руководители:** **Нуриева Евгения Владимировна**  
кандидат химических наук

**Зефирова Ольга Николаевна**  
доктор химических наук, доцент

**Официальные оппоненты:** **Лукашев Николай Вадимович**  
доктор химических наук, профессор,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет имени  
М.В.Ломоносова», профессор кафедры органической  
химии Химического факультета

**Балакин Константин Валерьевич**  
доктор химических наук,  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»,  
доцент кафедры медицинской химии

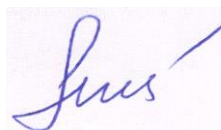
**Гудашева Татьяна Александровна**  
кандидат химических наук, доктор биологических наук,  
член-корреспондент РАН,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки «Научно-исследовательский институт  
фармакологии имени В.В. Закусова», заведующая  
отделом химии лекарственных средств

Защита диссертации состоится 21 февраля 2018 года в 12.00 на заседании диссертационного совета МГУ.02.01. при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:  
<https://istina.msu.ru/dissertations/91403701/>

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
МГУ.02.01. при МГУ имени М.В.Ломоносова  
доктор химических наук, профессор



Т.В. Магдесиева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Круг заболеваний, связанных с возникновением злокачественных опухолей, относится к числу социально значимых во всем мире. Неуклонный рост числа таких заболеваний вызывает постоянную необходимость в разработке новых эффективных противоопухолевых препаратов. Особенно важными и актуальными в этом направлении являются исследования по поиску веществ с относительно простой химической структурой с целью сделать противораковую терапию общедоступной.

Классической молекулярной мишенью для создания противоопухолевых веществ является клеточный белок тубулин, играющий ключевую роль в процессе деления клетки. В клинической практике используются препараты, действующие на указанную систему, однако их применение ограничивается либо высокой стоимостью, либо высокой общей токсичностью, что делает актуальной разработку новых структурных типов лигандов тубулина. Фундаментальные исследования по рациональному созданию таких структур включают в себя выбор определенной молекулярной мишени, выбор соединения-лидера (структурного прототипа разрабатываемого лекарства) и его оптимизацию.

Одним из базовых приемов, используемых в медицинской химии для оптимизации соединения-лидера, является изостерическая или биоизостерическая замена атомов или групп. Первая предполагает замену атомов или группировок в исходной структуре на похожие по размеру и валентности, и при «сохранении» биологического свойства называется биоизостерической, а соответствующие соединения – *биоизостерами* или *классическими изостерами*. Если атомы или группы соединения-лидера заменяются другими, сильно отличающимися по размеру, электронным и другим характеристикам, но с сохранением активности к заданной молекулярной мишени, то такая замена также называется биоизостерической, а соответствующие соединения – *неклассическими биоизостерами*. Многие эмпирические правила биоизостерической замены обоснованы с помощью физико-химических или топологических данных, но расширение ее вариантов по-прежнему является важной и актуальной задачей в области дизайна лекарственных веществ.

**Цель работы.** Основной задачей настоящей работы стал молекулярный дизайн, синтез и биотестирование новых веществ с противоопухолевой активностью, молекулярной мишенью которых (полностью или частично) является клеточный белок тубулин и построенные из него микротрубочки. Круг исходных структурных прототипов (соединений-лидеров) для создания новых веществ, способных связываться с определенной областью тубулина – колхициновым доменом, – определен на основании литературных данных и результатов работ, выполненных ранее в лаборатории медицинской химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. В работе проводили модификацию структур тубулокластина [*N*-(7-(адамант-2-илокси)-7-оксогептаноил)-*N*-дезацетилколхицина], подофиллотоксина, 2-метоксиэстрадиола и комбретастина А-4 или их близких аналогов – с использованием трех базовых типов классической и неклассической изостерической замены. 1. В соединениях, которые содержат «выраженные» (в заметной степени обособленные) структурные элементы, соединенные линкером, варьировался тип линкерной группировки, – либо непосредственно, либо в комбинации с заменой одного из связанных фрагментов. 2. Изучалась взаимозаменяемость каркасных и мостиковых группировок в структурах соединений-лидеров. 3. Разрабатывалась нестандартная замена полициклической системы в исходном соединении мостиковой группировкой.

Конкретные варианты структурных модификаций в рамках каждого из указанных типов были подобраны на основе результатов компьютерного молекулярного моделирования или анализа данных литературы по изучению соотношений структура – активность в рядах аналогов соединений-лидеров. Основным этапом работы стал синтез предложенных структур, позволивший получить не описанные ранее классы веществ, действующих на тубулиновую систему, а также внести теоретический вклад в химию мостиковых соединений. Для большинства синтезированных веществ проведено биотестирование, на основании результатов которого составлены корреляции *структура – активность*, выявлены серии биоизостерических соединений и определены кандидаты, перспективные для дальнейших исследований *in vivo*.

**Научная новизна.** Впервые синтезирована серия биоизостеров узлового аналога тубулокластина, полученных путем «сдвига» сложноэфирной группы линкера относительно колхицинового и адамантанового фрагментов. На основании данных *структура – активность* сделано

заклучение о незначительном влиянии позиции этой группы на цитотоксичность по отношению к клеткам карциномы A549 (очень высокой для изученных серий веществ).

С использованием метода молекулярного моделирования проведен дизайн структур аналогов тубулокластина, полученных с применением классической и неклассической изостерической замены адамантанового фрагмента и реализован синтез серии таких соединений. Факт биоизостеричности проведенных замен подтвердил гипотезу о том, что кластеризующий эффект является общим свойством определенным образом C<sup>7</sup>-замещенных производных колхицина.

Впервые синтезированы серии изостерических аналогов тубулокластина с заменой базового структурного фрагмента – колхицина – 2-метоксиэстрадиолом и продемонстрирована их способность оказывать необычное действие на сеть микротрубочек клеток карциномы легких человека A549. Обнаружена способность комбретастиновых аналогов тубулокластина (с модификацией по фенольному гидроксилу) вызывать тубулин-кластеризующий эффект, что подтвердило гипотезу об универсальном характере этого эффекта.

Разработаны и реализованы многостадийные схемы синтеза нестероидных миметиков 2-метоксиэстрадиола на основе производных бицикло[3.3.1]нонана с 2-метоксифенольной группировкой с использованием в качестве ключевых стадий реакций эпоксицирования по Кори – Чайковскому и внутримолекулярной циклизации. В ходе синтеза обнаружена необычная BF<sub>3</sub>-катализируемая реакция раскрытия оксиранового фрагмента с одновременной внутримолекулярной циклизацией и восстановлением.

Синтезирована серия новых производных подофиллотоксина с модификацией по гидроксильной группе при C<sup>4</sup> исходной молекулы с разнообразными замещенными и незамещенными каркасными и мостиковыми группировками; выявлены основные закономерности *структура – активность*. Для ряда соединений обнаружен необычный эффект на сеть микротрубочек клеток карциномы A549.

Получена серия сложных эфиров адамантануксусной и адамантанкарбоновой кислот с алкоксиарильными спиртами и впервые продемонстрирована способность одного из них ингибировать полимеризацию тубулина в опухолевых клетках.

**Практическая значимость работы.** В работе получено несколько серий лигандов тубулина, которые проявляют цитотоксичность по отношению к клеткам карциномы A549 в низком наномолярном интервале концентраций. Значение IC<sub>50</sub> в МТТ тесте N-[5-(1-адамантилметокси)-5-оксопентаноил]-N-дезацетилколхицина (5.9 нМ), N-[7-(3-ацетидамо-5,7-диметил-1-адамантилокси)-7-оксогептаноил]-N-дезацетилколхицина (6.0 нМ) и некоторых других веществ сравнима с таковой для клинически используемого тубулин-направленного противоопухолевого препарата – таксола. Это делает указанные вещества перспективными для дальнейших исследований противоопухолевой активности на моделях *in vivo*.

Синтезированные «конформационно жесткие» нестероидные аналоги 2-метоксиэстрадиола, а также мостиковые и каркасные производные подофиллотоксина представляют собой ценные структурные шаблоны для компьютерного молекулярного моделирования с целью уточнения особенностей взаимодействия исходных соединений с тубулином, уточнения фармакофорной модели лигандов колхицинового домена и последующего дизайна оптимизированных структур.

Полученный в работе 5-(гидроксиметил)-2-метоксифенил адамантил-1-ацетат – соединение, принадлежащее к новому, необычному для лигандов колхицинового домена тубулина структурному типу, – перспективно в качестве нового оригинального соединения-лидера для дальнейшей оптимизации.

**Положения, выносимые на защиту.** Производные N-(8-(адамант-1-илокси)-8-оксооктаноил)-N-дезацетилколхицина с различным расположением сложноэфирной группы линкера относительно колхицинового и адамантанового фрагментов молекулы проявляют цитотоксичность по отношению к клеткам эпителиальной легочной карциномы человека A549 в низком наномолярном интервале концентраций и вызывают образование выраженных или умеренных тубулиновых кластеров.

Методы синтеза серий изостерических аналогов тубулокластина N-(8-(адамант-2-илокси)-8-оксооктаноил)-N-дезацетилколхицина с заменой колхицина 2-метоксиэстрадиолом (с модификацией по положениям C<sup>6</sup> и гидроксилам при C<sup>17</sup> и C<sup>3</sup> стероида) и комбретастином А-4 (с модификацией по фенольному гидроксилу). Сложность проведения реакции восстановительного аминирования 2-метокси-6-оксо-17β-эстрадиола с адамант-2-ил-8-аминооктаноатом. Способность некоторых веществ

этих серий оказывать «закручивающее» или тубулин-кластеризующее действие на сеть микротрубочек.

Аналоги тубулокластина с заменой адамантанового фрагмента обладают очень высокой цитотоксичностью к опухолевым клеткам A549 (в наномолярном интервале концентраций) и способностью вызывать образование тубулиновых кластеров, как известной, так и необычной морфологии.

Дизайн структур оригинальных нестероидных миметиков 2-метоксиэстрадиола на основе производных бицикло[3.3.1]нонана с 2-метоксифенольной группировкой. Разработка и реализация эффективных многостадийных препаративных схем их синтеза, в том числе с использованием в качестве ключевых стадий реакций эпоксидирования по Кори – Чайковскому и внутримолекулярной циклизации. Обнаружение необычной  $\text{BF}_3$ -катализируемой реакции раскрытия оксиранового фрагмента с одновременной внутримолекулярной циклизацией и восстановлением.

Синтез серии  $\text{C}^4$ -производных подофиллотоксина с различными каркасными и мостиковыми группировками. Выявление зависимости цитотоксичности и эффекта на сеть микротрубочек клеток карциномы A549 от «конформационной подвижности» присоединяемого фрагмента, позиции его присоединения и типа образуемой связи. Выявление в данной серии соединений, обладающих цитотоксичностью к клеткам карциномы A549 в наномолярном интервале концентраций, а также соединений, вызывающих сильный «закручивающий» эффект на сеть микротрубочек клеток A549.

Молекулярный дизайн аналогов комбретастина A-4 на основе сложных эфиров адамантануксусной и адамантанкарбоновой кислот с алкоксиарильными спиртами. Обнаружение способности 5-(гидроксиметил)-2-метоксифенил адамантил-1-ацетата в концентрации 100  $\mu\text{M}$  вызывать полную деполимеризацию сети микротрубочек клеток A549.

**Личный вклад автора** состоит в подборе и анализе литературных данных, постановке локальных задач, проведении синтетических экспериментов и исследований методом компьютерного молекулярного моделирования, интерпретации и обобщении полученных результатов, подготовке материалов к публикации и представлении полученных данных на конференциях.

Автор выражает глубокую благодарность за помощь в работе сотрудникам лабораторий ЯМР и органического анализа химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, а также к.х.н. Я.С. Глазковой, к.х.н. Д.В.Шишову, д.х.н. К.А.Лысенко (ИНЭОС РАН) и д.х.н. С.А.Кузнецову (Institut für Zellbiologie und Biosystemtechnik Fachbereich Biowissenschaften, Германия).

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на международных и российских конференциях, в том числе: на Третьей Всероссийской конференции по медицинской химии (Казань, 2017); VII-й Молодежной конференции Института органической химии РАН (Москва, 2017); I Всероссийской молодежной школы-конференции «Успехи синтеза и комплексообразования» (Москва, 2016); XXIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, 2016); IX Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар–Москва, 2015); VI Международной конференции молодых ученых «Органическая химия сегодня» InterCYS-2014 (Санкт-Петербург, 2014); XXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2014), Всероссийской конференции «Современные достижения химии неопределенных соединений: алкинов, алкенов, аренов и гетероаренов» (Санкт-Петербург, 2014), VI Молодежной конференции ИОХ РАН (Москва, 2014), Первой Российской конференции по медицинской химии MedChemRussia-2013 (Москва, 2013).

**Публикации.** По результатам работы опубликовано 12 статей в российских и международных научных журналах (все статьи – в журналах, рекомендованных ВАК) и 9 тезисах докладов конференций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-03-00720, 13-03-12460, 15-03-04894), Отделения химии и наук о материалах Российской Академии наук (программа №9), гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ № ИШ-65546.2010.3 и при поддержке немецкой организацией DAAD, German Academic Exchange Service академического обмена в рамках соглашения о сотрудничестве между Московским и Ростовским университетами.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 196 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, четырех глав обсуждения результатов, экспериментальной

части, выводов и списка цитированной литературы, который включает в себя 243 ссылки. Работа содержит 26 схем, 59 рисунков и 8 таблиц.

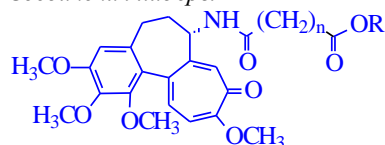
## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Для создания новых структурных классов противоопухолевых агентов, воздействующих на клеточный белок тубулин и построенные из него микротрубочки, в работе проводили модификацию структур известных лигандов тубулина – тубулокластина, подофиллотоксина, 2-метоксиэстрадиола и комбретастина А-4 или их близких аналогов – с использованием различных (в том числе необычных) типов классической и неклассической изостерической замены.

### 2.1. Структурные вариации тубулокластина и его производных.

Основным соединением-лидером для создания потенциальных противоопухолевых веществ послужили молекулы тубулокластина – [*N*-(7-(адамант-2-илокси)-7-оксогептаноил)-*N*-дезацетилколхицина] и его близких аналогов **1–3**, обладающие, высокой цитотоксичностью *in vitro* и *in vivo* и необычным тубулин кластеризующим эффектом. Корреляции кластеризующего эффекта с цитотоксичностью среди первого, изученного ранее круга ее аналогов сделали эту молекулу интересным соединением-лидером для дальнейшего изучения соотношения структура – активность и созданию на её основе новых типов лигандов тубулина как потенциальных противоопухолевых средств.

Соединения-лидеры

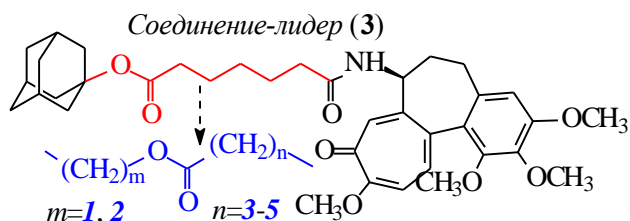


- 1** R=2-адамантил, n=5 (тубулокластин)  
**2** R=2-адамантил, n=6  
**3** R=1-адамантил, n=5

изученного ранее круга ее аналогов сделали эту молекулу интересным соединением-лидером для дальнейшего изучения соотношения структура – активность и созданию на её основе новых типов лигандов тубулина как потенциальных противоопухолевых средств.

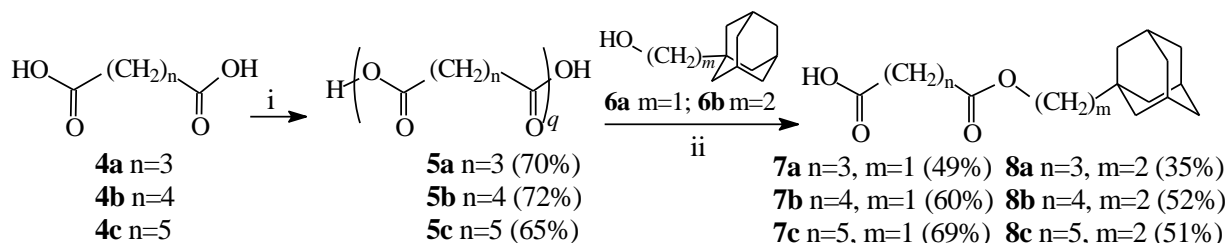
#### 2.1.1. Биоизостерическая замена линкерной группировки в аналоге тубулокластина

Для узлового аналога тубулокластина **3** мы применили необычную замену линкера близкими по структуре цепочками с различным расположением сложноэфирной группы относительно колхицинового и адамантанового фрагментов молекулы (рис. 1). Такая замена имела целью поиск оптимальной позиции этой группы для проявления соединением высокой антипролиферативной активности. Поскольку удлинение алкильной цепи в соединении **3** до семи метиленовых групп вызывает лишь небольшое уменьшение цитотоксичности, мы синтезировали серию соединений с общим числом метиленовых групп в линкере, равным 4–7, и полученных путем последовательного «сдвига» сложноэфирной группы по цепи (рис. 1).



**Рисунок 1.** Замена линкерной группировки в соединении **3**.

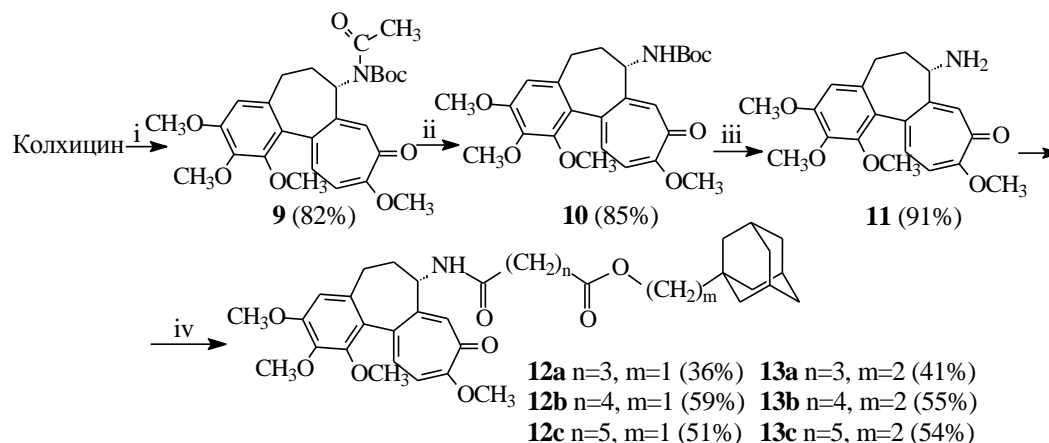
Целевые соединения были синтезированы по схемам 1 и 2. Изначально получали моноэфиры соответствующих двухосновных кислот с каркасными спиртами **7а–с** и **8а–с** (выходы составили 49–69%). Реакция амидирования моноэфиров **7а–с** и **8а–с** *N*-дезацетилколхицином (трехстадийный синтез которого был проведен предварительно) в присутствии *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина (EEDQ) привела к целевым конъюгатам **12а–с** и **13а–с** с выходами 36–59%.



**Схема 1.** Реагенты и условия: i)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $140^\circ\text{C}$ , 6 ч; ii) 4-DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $t_{\text{комн.}}$ , 24 ч

Биотестирование показало, что все полученные соединения **12а–с** и **13а–с** (см. табл. 1 и рис. 2 А–Г) проявляют очень высокую цитотоксичность в стандартном МТТ тесте, – в низком наномолярном интервале концентраций, лучшие значения  $\text{IC}_{50}$  (<10 нМ) наблюдаются для конъюгатов **12а** и **13а**. В концентрации 400 нМ все соединения вызывают полную деполимеризацию тубулина (рис. 2 С), а при

800 нМ все они вызывают образование выраженных или умеренных тубулиновых кластеров (табл. 1, рис. 2 Е, F). Результаты биотестирования демонстрируют, что замена линкерной группировки в соединении **3** со «сдвигом» сложноэфирной группы для всех изученных соединений является биоизостерической, а расположение этой группы относительно адамантанового и колхицинового фрагментов мало влияет на активность. Так, сравнение данных по активности конъюгатов с общим числом метиленовых групп в линкере, равным пяти (**12b**, **13a**, **3**), показывает, что и значения IC<sub>50</sub>, и интенсивность вызываемого кластеризующего эффекта для них очень близки (см. табл. 1). Аналогичные закономерности наблюдаются также в парах соединений с шестью (**12c** и **13b**) и семью (**13c** и **14a** – ранее полученный аналог соединения **3**) метиленовыми группами в линкере.



**Схема 2.** Реагенты и условия: i)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{NEt}_3$ , 4-DMAP,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $82^\circ\text{C}$ , 12 ч; ii) 1.  $\text{CH}_3\text{ONa}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $t_{\text{комн}}$ , 1 ч. 2.  $\text{H}_2\text{O}$ ; iii) 1.  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $t_{\text{комн}}$ , 1 ч; 2.  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ; iv) **7a–c** или **8a–c**, EEDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $t_{\text{комн}}$ , 12 ч

**Таблица 1.** Результаты биотестирования соединений **12a–c** и **13a–c**.

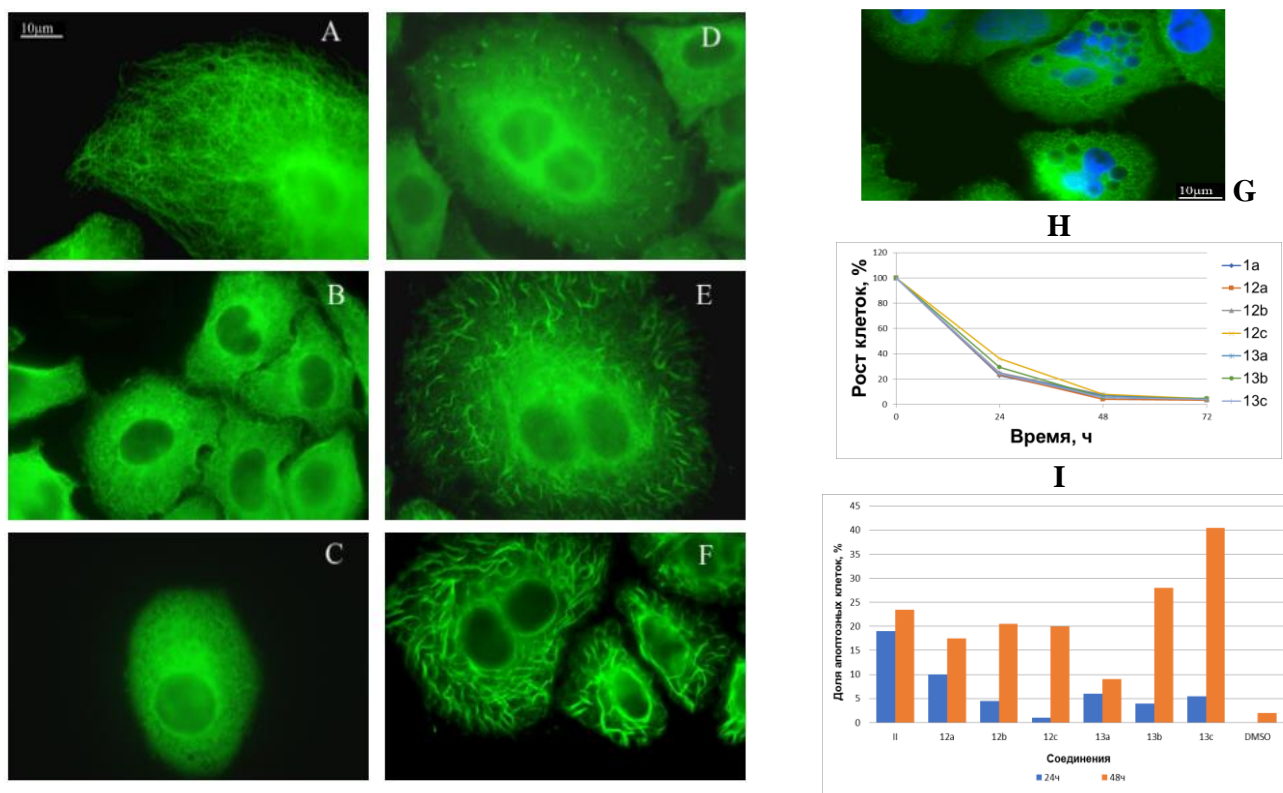
Вещество	Цитотоксичность <sup>1</sup> IC <sub>50</sub> (нМ)	Деполимеризация микротрубочек <sup>2</sup>		Кластеризация тубулина <sup>3</sup>	
		100нМ	200нМ	200нМ	800нМ
<b>12a</b>	5.9 ± 0.2	-	-	++	+++
<b>12b</b>	13 ± 1	+/-	+/-	+	+++
<b>12c</b>	11.5 ± 1.5	+	-	+	+++
<b>13a</b>	8.5 ± 1.5	+	-	++	+++
<b>13b</b>	12.5 ± 3	+	+/-	+	++
<b>13c</b>	16 ± 3	+	+/-	+	++
<b>3</b>	11 ± 1	н/о	-	+	+++
<b>14a</b> (структура аналогична <b>3</b> , где R=1-адамантил, n=7)	29 ± 1	н/о	+/-	н/о	++
<b>14b</b> (структура аналогична <b>3</b> , где R=1-адамантил, n=4)	7.5 ± 0.2	-	-	++	+++
Колхицин	30 ± 2	н/о	-	-	-

<sup>1</sup> среднее из трех независимых экспериментов; <sup>2</sup> деполимеризующий эффект на микротрубочки при указанной концентрации (“-“ – полная, “+/-“ – частичная деполимеризация, н/о – не определялось),

<sup>3</sup> относительная величина кластеризующего эффекта при указанной концентрации

Ранее на основании молекулярного моделирования нами была показана возможность образования водородной связи между атомами кислорода сложноэфирной группы линкера тубулокластина (**1**) или его аналога **3** и фенольным гидроксилем  $\alpha\text{Tyr}224$  в тубулине. Однако, по данным проведенного в настоящей работе компьютерного докинга, для соединений **13a–c** такая водородная связь не образуется. Поэтому обнаруженный нами факт близких значений активности для всех конъюгатов **12a–c** и **13a–c** является неожиданным, и может объясняться как невысоким вкладом рассматриваемого взаимодействия в связывание с белком, так и возможными отклонениями позиций адамантанового фрагмента соединений **3** и **13a–c** от предсказанных.

Интересным и важным является обнаруженный факт очень высокой активности соединения **12a** с четырьмя метиленовыми группами в линкере во всех изученных тестах, что стимулировало дополнительный синтез конъюгата **14b** с такой же общей длиной линкера (по схемам, аналогичным схемам 1 и 2). Оба соединения – **12a** и **14b** – вызывают полную деполимеризацию тубулина в концентрации 100 нМ (см. табл. 1), и проявляют наибольшую цитотоксичность к опухолевым клеткам из всех соединений изученной серии.



**Рисунок 2.** Сеть микротрубочек в клетках карциномы A549, обработанных соединениями **12a–c** и **13a–c** или контрольными веществами (ДМСО, **3**, **14a,b**). А – целые микротрубочки (0.5% ДМСО); В – частичная деполимеризация; С – полная деполимеризация; D – слабая кластеризация (+); Е – умеренная кластеризация (++); F – сильная кластеризация (+++); G – клетки в стадии апоптоза. Шкала 10  $\mu\text{m}$ . H – кривые ингибирования роста клеток; I – зависимости индекса апоптоза от времени.

Значение  $IC_{50}$  в МТТ тесте для конъюгата **12a** в пять раз ниже, чем для колхицина, и сравнима с таковой для тубулокластина и для одного из наиболее эффективных тубулин-направленных клинически используемых противоопухолевых препаратов – таксола. При этом соединение **12a** превосходит по цитотоксичности узловой аналог тубулокластина **3** (табл. 2), а по способности ингибировать клеточный рост превосходит и тубулокластин (рис. 2, H). В связи с этим, конъюгат **12a** представляет несомненный интерес для последующего изучения в тестах *in vivo*.

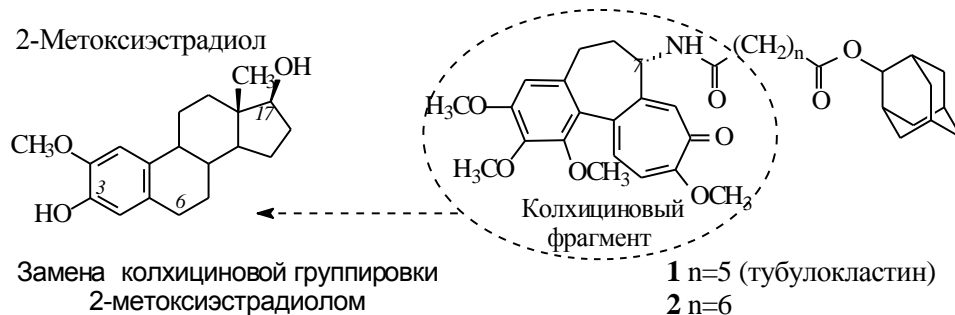
### 2.1.2. Замена колхицинового фрагмента тубулокластина 2-метоксиэстрадиолом.

Данные о высокой эффективности тубулокластина *in vivo* стимулировали работы по синтезу его аналогов с полной заменой колхицинового фрагмента другими лигандами колхицинового домена тубулина. Первые такие попытки не привели к соединениям с высокой активностью и были продолжены в настоящей работе. В качестве фрагмента, заменяющего колхицин, был выбран 2-метоксиэстрадиол (рис. 3), отличающийся своей низкой общей токсичностью. Наиболее удобной позицией в стероидном скелете для присоединения линкера с адамантаном является атом углерода при  $C^6$ , расположенный очень близко к амидной группировке колхицина (расстояние между ними составляет менее  $1\text{\AA}$ , рис. 4). Поэтому для синтеза были предложены структуры **15a** и **15b** с линкером такой же длины, как и в исходных соединениях **1** и **2** (рис. 4).

Синтез целевых веществ **15a,b** осуществляли по схеме 3 из  $C^6$ -кетопроизводного 2-метоксиэстрадиола **16** (получено в три стадии из 2-метоксиэстрадиола). После присоединения

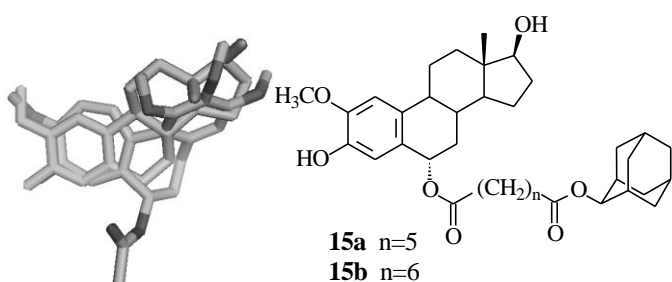


различных защитных групп [*tert*-бутилдиметилсилильной (TBDMS) или триэтилсилильной (TES)] соединения **17a** и **17c** стереоселективно восстановили боргидридом натрия в метаноле, получив спирты **18a,b**.



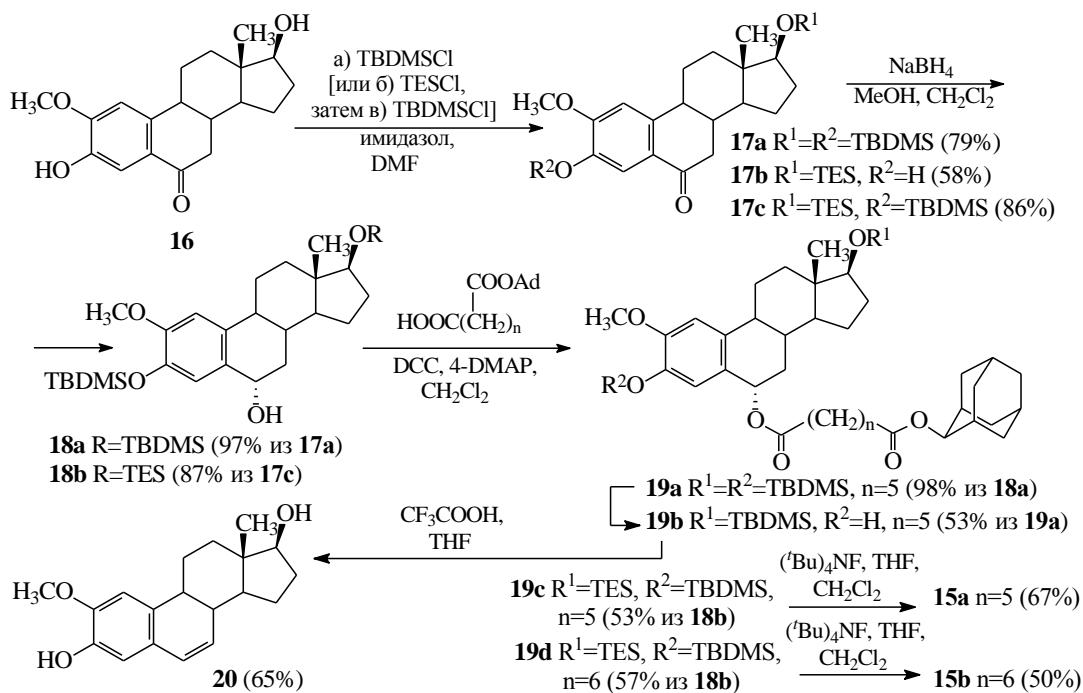
**Рисунок 3.** Изученные варианты замены в структуре тубулокластина **1** и его аналога **2**.

Реакции этих спиртов с предварительно синтезированными моноэфирами пимелиновой или субериновой кислот с 2-адамантанолом в присутствии DCC и 4-DMAP привели к требуемым конъюгатам **19a**, **19c** и **19d**. В ходе реакции **19a** с тетрабутиламмоний фторидом произошло



**Рисунок 4.** Слева: наложение молекул колхицина и 2-метоксиэстрадиола; справа: структуры конъюгатов **15a,b**.

соединения **15a** и **15b**, загрязненные, однако, небольшим количеством примеси продукта элиминирования (около 10% после трехкратного колоночного хроматографирования на силикагеле).

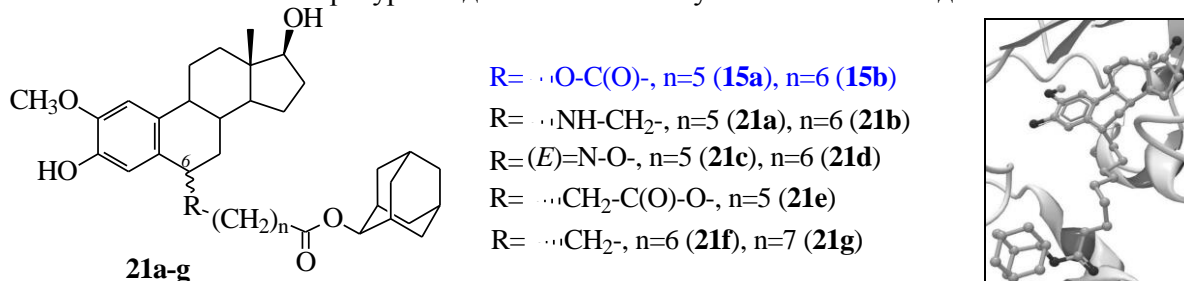


**Схема 3.**

Биотестирование на культуре клеток A549 в МТТ тесте показало падение цитотоксичности **15a** (IC<sub>50</sub>=47 μM) и **15b** (IC<sub>50</sub>>50 μM) по сравнению с соединениями-лидерами **1,2**, которое, однако, может быть вызвано не потерей способности веществ **15a** и **15b** к связыванию с тубулином, а их быстрым

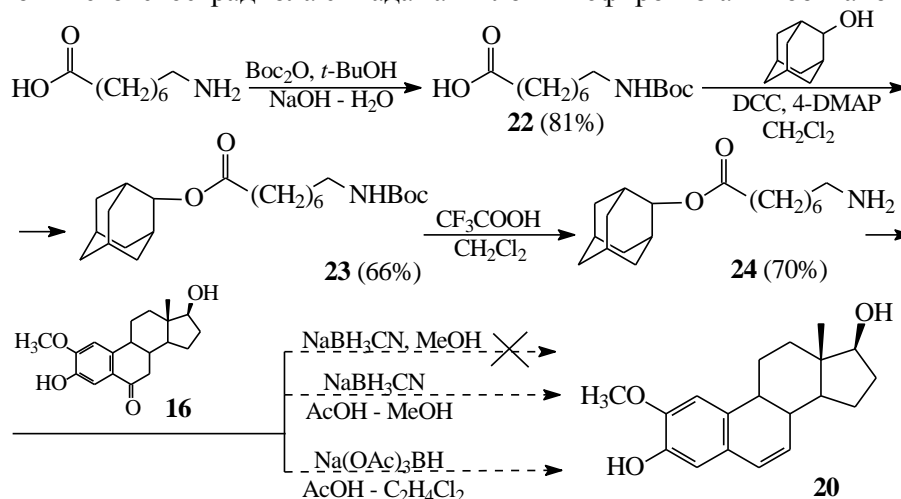
элиминированием по связи  $C^6-C^7$  в культуральной среде. Таким образом, хотя принципиальная возможность получения конъюгатов типа 2-метоксиэстрадиол- $C^6$ -линкер-адамantan показана нами в настоящей работе, точное изучение цитотоксичности соединений **15a,b** оказалось невозможным из-за их крайней нестабильности. Поэтому дальнейшие исследования были сосредоточены на поиске более стабильных аналогов конъюгатов **15a,b**.

Мы провели молекулярное моделирование структур **21a-h** (рис. 5), выбор которых обусловливался наличием литературных данных по синтезу аналогичных соединений.



**Рисунок 5.** Структуры, для которых проведен компьютерный молекулярный докинг в модель колхицинового домена тубулина и (справа) расположение структуры **21b** в  $\alpha,\beta$ -тубулиновом димере.

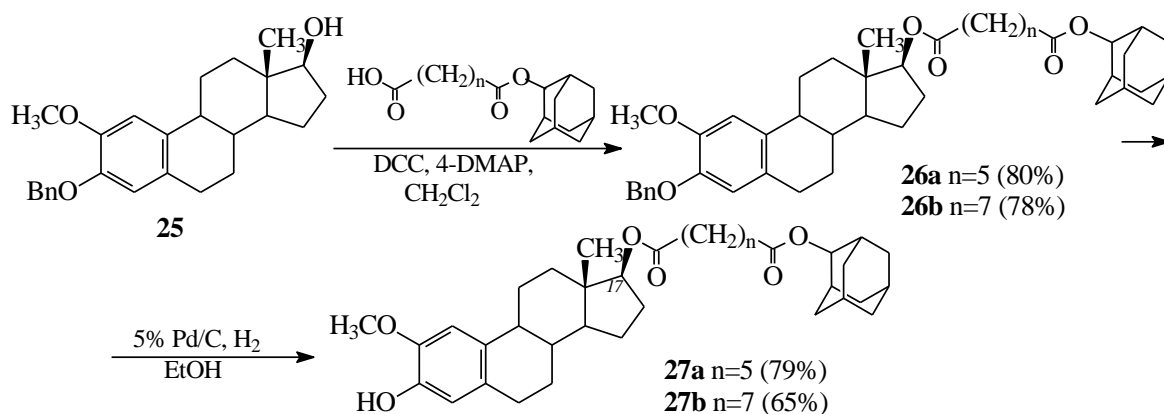
Результаты компьютерного докинга лигандов **21a-g** в модель области связывания колхицина с тубулином (PDB ID: 1SA0) показали, что наиболее близко к конъюгатам **15a,b**, а также **1**, **2** и 2-метоксиэстрадиолу в  $\alpha,\beta$ -тубулиновом димере располагаются аминопроизводные **21a,b** (рис. 5). Поэтому мы попытались получить соединение **21b** с помощью реакции восстановительного аминирования 6-кето-производного 2-метоксиэстрадиола с 2-адамантиловым эфиром 8-аминооктановой кислоты.



**Схема 4.**

На первой стадии 8-аминооктановую кислоту защитили *трет*-бутоксикарбонильной группой (схема 4), затем полученную кислоту **22** ввели в реакцию этерификации с адамantan-2-олом в системе DCC/4-DMAP с образованием сложного эфира **23**. Удаление защитной *трет*-бутоксикарбонильной группы в трифторуксусной кислоте привело к амину **24**. 2-Метокси-6-оксо-17 $\beta$ -эстрадиол (**16**) ввели в реакцию восстановительного аминирования с амином **24** и натрийцианоборгидридом в метаноле в нейтральной среде. Однако после 24 ч нагревания при 50 $^\circ$ C в атмосфере аргона из реакционной смеси были выделены только исходные вещества. Попытка проведения восстановительного аминирования в слабокислой среде с натрийцианоборгидридом в метаноле или с триацетоксиборгидридом натрия в дихлорэтане (схема 4) привела к выделению из реакционной смеси исходного аминоэфира **24** и упоминавшегося выше непредельного стероидного продукта **20**. Получение соединения **20** в ходе описанной реакции, вероятно, является следствием восстановления кетона **16** до соответствующего спирта с последующим элиминированием по связи  $C^6-C^7$ , что подтверждается данными литературы о способности натрийцианоборгидрида и триацетоксиборгидрида натрия восстанавливать кето-группу при pH 3–4. Таким образом, продемонстрированная в работе сложность проведения реакции восстановительного аминирования 2-метокси-6-оксо-17 $\beta$ -эстрадиола с аминоэфиром **24** требует подбора других условий или методик синтеза целевого конъюгата **21b**.

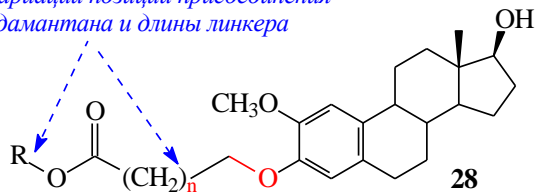
Далее нами была изучена замена колхицинового фрагмента соединений-лидеров **1** и **2** 2-метоксиэстрадиолом с присоединением замещенной адамантановой группировки к другим, отличным от C<sup>6</sup>, атомам в исходной стероидной структуре. Согласно литературным данным, существует принципиальная возможность введения объемных заместителей в положение при C<sup>17</sup> с сохранением цитотоксичности исходной молекулы и заметной способности ингибировать полимеризацию тубулина. Поэтому для синтеза были предложены аналоги тубулокластина (**1**) со сложноэфирными линкерами, присоединенными по гидроксильной группе при C<sup>17</sup> стероида. Для изучения зависимости биологической активности таких конъюгатов от длины линкера мы получали структуру **27a** с тем же числом метиленовых групп, как в **1**, и структуру **27a,b** с удлинённой цепью. Синтез целевых соединений осуществляли по схеме 5 из бензил-защищенного по фенольному гидроксилу производного 2-метоксиэстрадиола **25** (полученного в три стадии из эстрадиола). Соединение **25** ввели в реакцию этерификации с предварительно синтезированными 7-(2-адамантилокси)-7-оксогептановой или 9-(2-адамантилокси)-9-оксононановой кислотой в системе DCC/4-DMAP. Удаление бензильной защитной группы в эфирах **26a,b** гидрированием на 5% Pd/C привело к искомым конъюгатам **27a,b**.



Биотестирование соединений **27a,b** в МТТ тесте по отношению к культуре клеток А549 показало, что проведенная замена не является биоизостерической. Поэтому далее мы присоединяли указанную группировку по фенольному гидроксилу при C<sup>3</sup> стероидной структуры.

Принимая во внимание синтетическую доступность и стабильность соответствующих конъюгатов в клетках, мы предложили структуры общего типа **28** с достаточно стабильным оксиметиленовым фрагментом. Молекулярное моделирование показало, что позиция стероидной группировки в предложенных конъюгатах существенно отличается от такового для исходной молекулы, но адамантановое ядро, как при узловом, так и при не узловом присоединении, оказывается в области, хотя и близкой к занимаемой адамантаном в тубулокластине, но отличной от нее в плане заметного «сдвига» от α- к β-субъединице. Карбонильный атом кислорода молекул **28a-c** образует водородную связь с фенольным гидроксилом αТур224. Расчетные значения скоринг функции минимальны для соединений **28a-c** и по абсолютной величине близки к таковым для 2-метоксиэстрадиола, поэтому эти вещества были получены и протестированы.

*Вариации позиции присоединения адамантана и длины линкера*



**28a** n=5, R=2-адамантил; **28b** n=5, R=1-адамантил;  
**28c** n=6, R=2-адамантил

Синтез соединений **28a-c** осуществляли в две стадии из 7-бромгептановой (**29a**) и 8-бромоктановой кислот (**29b**) по схеме 6. На первой стадии по реакции этерификации в системе DCC/4-DMAP были синтезированы эфиры кислот **29a,b** с 1- или 2- адамантанолом (структуры **30a-c**). Целевые соединения **28a-c** получили из бромзамещенных моноэфиров **30a-c** реакцией с 2-метоксиэстрадиолом в присутствии K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Вещества серии **28a-c** обладают умеренной цитотоксичностью с IC<sub>50</sub> = 5–6 μM (не зависимо ни от длины линкерной цепи, ни от позиции ее присоединения к адамантану) и оказывают одинаковый и слабый эффект на микротрубочки, при очень высоких концентрациях – 100 μM. Этот эффект похож на кластеризующий эффект менее активных

производных тубулокластина, но не идентичен ему. Таким образом, конъюгаты **28a–c**, вероятно, обладают способностью с низкой аффинностью связываться с тубулином, но тип их связывания отличен от такового для 2-метоксиэстрадиола и базового соединения **1**. Это подтверждают и результаты компьютерного моделирования, а именно, наблюдаемый «сдвиг» позиций стероидной и адамантановой группировок в соединениях **28a–c** (см. выше).

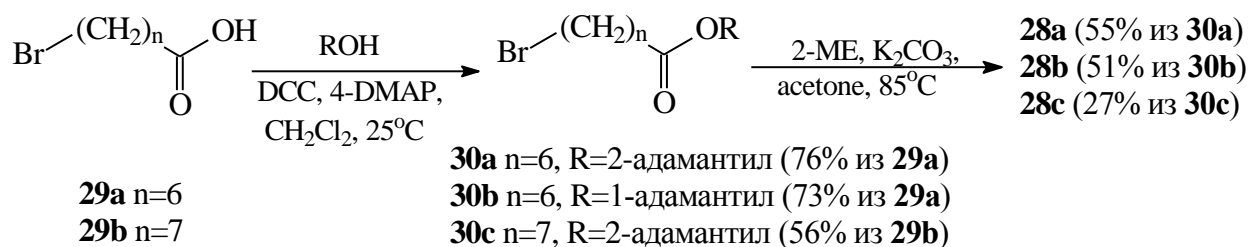


Схема 6.

Способность веществ **28a–c** оказывать слабый, подобный кластеризующему эффект на сеть микротрубочек вызвала интерес к изучению близких по структуре конъюгатов, присоединенных к фенольному гидроксилу 2-метоксиэстрадиола через конформационно менее «гибкую» сложноэфирную связь (см. структуры **31a–c**, рис. 6). Молекулярное моделирование показывает, что соединения **31a–c** не дают связь с фенольным гидроксильным αТуг224, поэтому для них можно было ожидать и несколько иного эффекта на сеть микротрубочек.

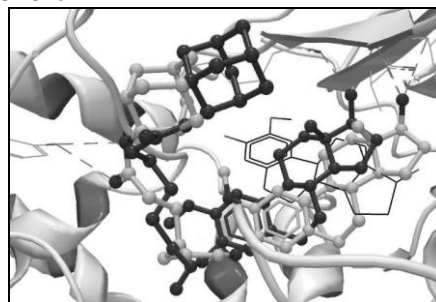
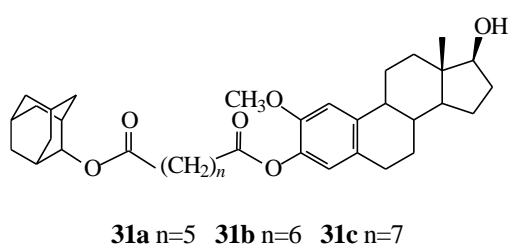


Рисунок 6. Конъюгаты 2-метоксиэстрадиола **31a–c** и расположение структуры **31a** (показана темным) в α,β-тубулиновом димере. Для демонстрации различий в позициях адамантановых ядер в молекулах серий **31** и **28** (показано светлым) расположение конъюгата **28a**.

Реакцией этерификации 2-метоксиэстрадиола с моноэфирами пимелиновой, субериновой и азелаиновой кислот с адамантан-2-олом в соотношении 1 : 1 были получены соединения **31a–c** (схема 7), загрязненные, однако, заметным количеством примеси 2-метоксиэстрадиола и моноэфиров дикарбоновых кислот, которые образовывались в результате гидролиза продуктов при хроматографировании на силикагеле (около 30%).

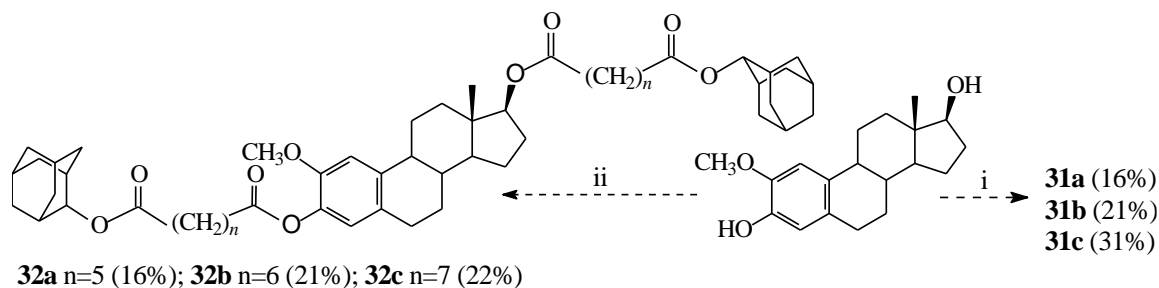
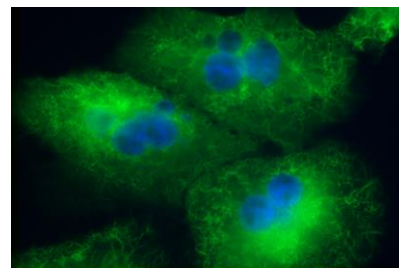


Схема 7. Реагенты и условия: i, ii) моноэфиры пимелиновой, субериновой и азелаиновой кислот с адамантан-2-олом; DCC, 4-DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t<sub>комн.</sub>; только i – прибавление по каплям раствора кислоты с DCC к раствору 2-МЕ с 4-DMAP. Выходы указаны на целевые вещества (см. пояснения в тексте).

Отметим, что вариация методики (см. схему 7) позволяет получить также конъюгаты **32a–c**, модифицированные по обеим гидроксильным группам исходного стероида, также нестабильным и содержащим около 15% примесей продуктов гидролиза. Из-за нестабильности «одинарных» **31a–c** и

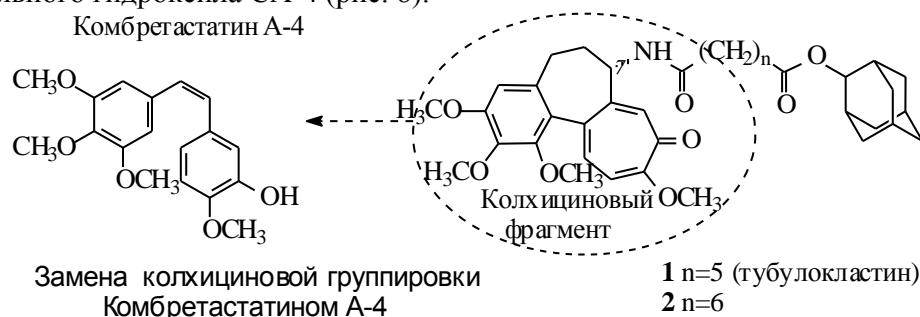
«двойных» конъюгатов **32a–c** их цитотоксичность нами не изучалась, а исследование методом иммуофлуоресцентной микроскопии было сразу проведено для очень высоких концентраций веществ – 100  $\mu\text{M}$  – для обеспечения присутствия в клетках достаточного числа негидролизованых (под действием неспецифических эстераз) молекул. Конъюгаты **32a–c** не оказывали влияния на микротрубочки, а соединения **31a–c** вызывали **необычный эффект** «закручивания» микротрубочек (рис. 7), не характерный ни для 2-метоксиэстрадиола, ни для тубулокластина, ни для соединений серии **28**. Таким образом, проведенная замена колхицинового фрагмента в тубулокластине 2-метоксиэстрадиолом с модификацией по фенольному гидроксилу стероида привела к получению веществ, интересных в плане оказываемого ими эффекта на сеть микротрубочек. Дальнейшим развитием данной работы стал синтез похожих аналогов тубулокластина с заменой колхициновой группировки комбретастином А-4.



**Рисунок 7.** «Закручивание» микротрубочек

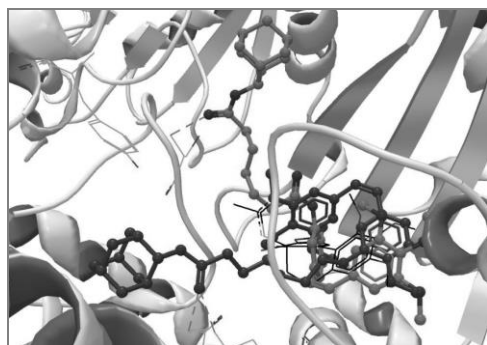
### 2.1.3. Вариант замены колхицинового фрагмента тубулокластина комбретастином А-4.

В данной работе была изучена возможность аналогичной замены, но с присоединением к атому кислорода фенольного гидроксила СА-4 (рис. 8).



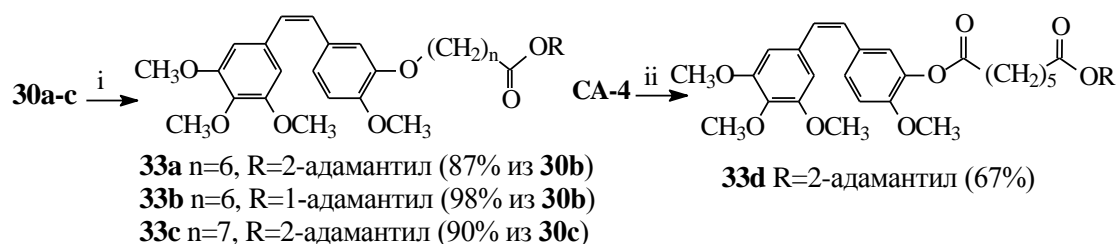
**Рисунок 8.** Вариант замены в структуре тубулокластина **1** и его аналога **2** (красным в молекуле комбретастина отмечена позиция его присоединения через линкер к адамантановой группировке).

По данным компьютерного моделирования для соединений **33a–d** (см. схему 8 и рис. 9)



**Рисунок 9.** Расположение структур **33a** (показана более темным) и **33d** в  $\alpha,\beta$ -тубулиновом димере.

адамантановое ядро конъюгатов **33a–c** располагается в области, близкой к аминокислотному остатку  $\alpha\text{Tyr}224$ , а для соединения **33d** (с присоединением линкерной группировки к комбретастину через сложноэфирную связь) его положение резко отличается (см. рис. 9). Поэтому для соединений **33a–c** ожидался кластеризующий эффект, а для **33d** – иной тип эффекта на сеть микротрубочек. Для проверки указанных гипотез конъюгаты **33a–c** были синтезированы реакцией адамантиловых эфиров  $\omega$ -бромкарбоновых кислот **30a–c** с комбретастином А-4 в присутствии карбоната калия (схема 8). Соединение **33d** получили по реакции этерификации комбретастина А-4 и моноэфира пимелиновой кислоты с адамантан-2-олом в системе DCC/4-DMAP.



**Схема 8.** Реагенты и условия: i) СА-4,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ацетон, 85 $^\circ\text{C}$ , Ar; ii) моноэфир пимелиновой кислоты с адамантан-2-олом, DCC, 4-DMAP, DMF,  $t_{\text{комн}}$ .

Результаты биотестирования серии **33a–c** на клетках A549 подтвердили сделанные предсказания. Хотя цитотоксичность полученных веществ оказалась существенно ниже, чем для исходных молекул (1–7  $\mu\text{M}$ ), все конъюгаты **33a–c** оказались способными в концентрациях 10  $\mu\text{M}$  (**33a**) или 50  $\mu\text{M}$  (**33b,c**) стимулировать не только деполимеризацию микротрубочек, но и вызывать слабый кластеризующий эффект. Эффект молекулы **33d** на сеть микротрубочек несколько отличен от такового для соединений **33a–c**.

Полученные результаты дополнительно подтверждают гипотезу о том, что кластеризующий эффект может иметь универсальный характер и проявляться соединениями, содержащими фрагменты различных лигандов колхицинового домена тубулина.

#### 2.1.4. Биоизостерические замены адамантановой группировки тубулокластина.

В работе был изучен ряд производных тубулокластина (**1**) и его узлового аналога (**3**), полученных путем классической и неклассической изостерической замены адамантанового фрагмента (рис. 10).

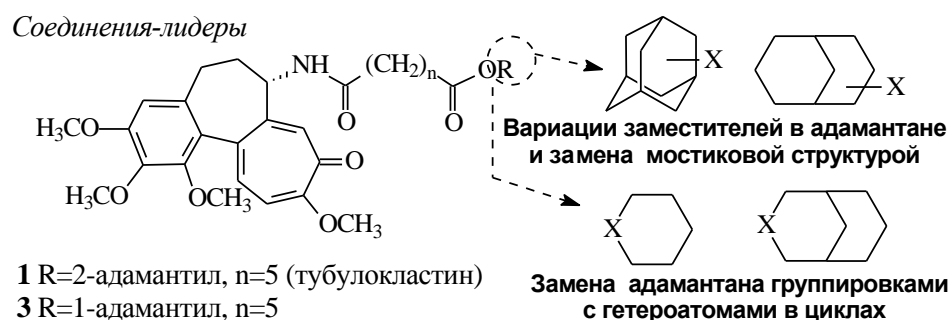


Рисунок 10. Вариации каркасного фрагмента в тубулокластине.

Для синтеза были предложены структуры **34a–j** (рис. 11), в которых адамантановое ядро содержит заместители, придающие молекуле большую гидрофильность (**34a,h**) или липофильность (**34d,e**), а также большой объем (**34f,g**). Соединения **34b** и **34c** представляют собой пару аналогов с одинаковыми заместителями, но различными каркасами: в **34b** присутствует конформационно более гибкий (по сравнению с адамантановым) бицикло[3.3.1]нонановый фрагмент. В паре веществ **34i**, **34j** содержатся гетероциклические группировки.

На основании докинга соединений **34a–j** максимальная активность предсказана для конъюгатов **34c** и **34f** с заместителями, образующими дополнительные водородные связи с белком (рис. 12).

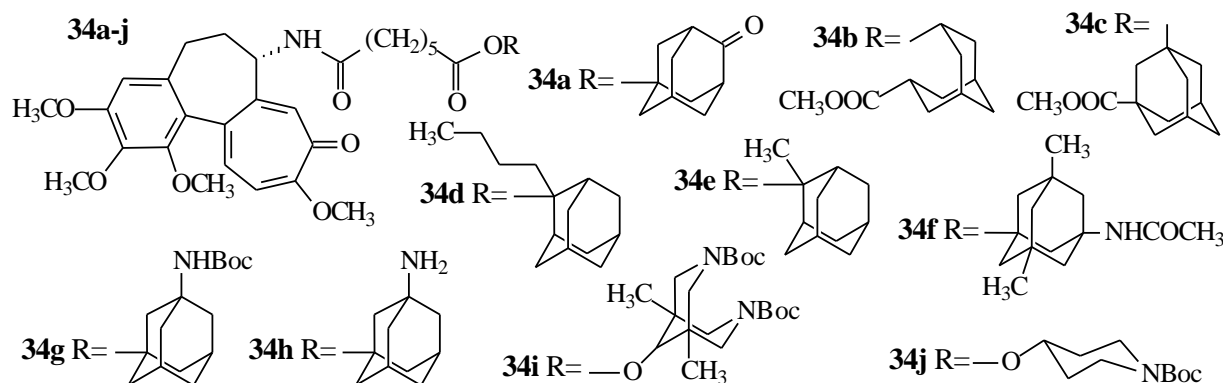


Рисунок 11. Синтезированные аналоги соединений-лидеров **1** и **3** с различными заместителями в адамантановом ядре, а также с мостиковой и гетероциклическими группировками.

Соединения **34a–g** были получены из соответствующих спиртов **35a–g** согласно схеме 9. Спирты получали по описанным методикам: 5-гидрокси-адамантан-2-он (**35a**) – окислением адамантанона азотной кислотой; метил 7-эндо-гидроксибицикло[3.3.1]нонан-3-экзо-карбоксилат (**35b**) – в две стадии из 2-оксагомоадамантан-3-она; метил 3-гидроксиадамантан-1 карбоксилат (**35c**) – из соответствующей кислоты по методике; 2-н-бутил-2-адамантанол (**35d**) и 2-метил-2-адамантанол (**35e**) – реакцией адамантанона с бутиллитием или метилмагнийбромидом соответственно; 1-ацетиламино-

3,5-диметиладамантанол (**35f**) – в две стадии из 1,3-диметиладамантана. Спирт **35g** получали путем стандартной защиты аминогруппы 1-аминоадамantan-3-ола с помощью  $\text{Boc}_2\text{O}$  в присутствии триэтиламина. Спирты **35a–g** вводили в реакцию этерификации с полиангидридом пимелиновой кислоты (**5c**) с образованием сложных эфиров **36a–g** (схема 9), взаимодействие которых с N-дезацетилколхицином в присутствии EEDQ дало целевые конъюгаты **34a–g**. Удаление *трет*-бутоксикарбонильной защитной группы в **34g** привело к конъюгату **34h**. Аналогичный подход использовали и для получения конъюгатов с гетероциклическими группировками **34i** и **34j** (схема 10). Исходный спирт **35i** синтезировали в две стадии из кетона **37** (схема 10а), а спирт **35j** – из пиперидин-4-ола или N-Boc-защищенного пиперидинона (схема 10б). Далее синтез выполняли по стандартной схеме: спирты **35i,j** вводили в реакцию с полиангидридом пимелиновой кислоты (**5c**) с образованием сложных эфиров **36i,j** (схема 10 а,б), взаимодействие которых с N-дезацетилколхицином в присутствии EEDQ привело к целевым конъюгатам **34i,j**.

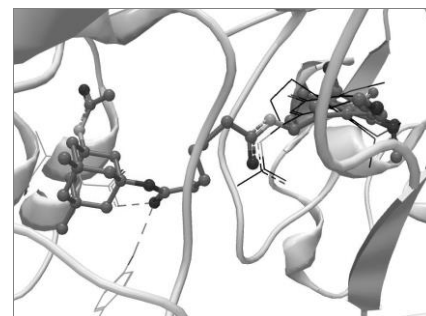
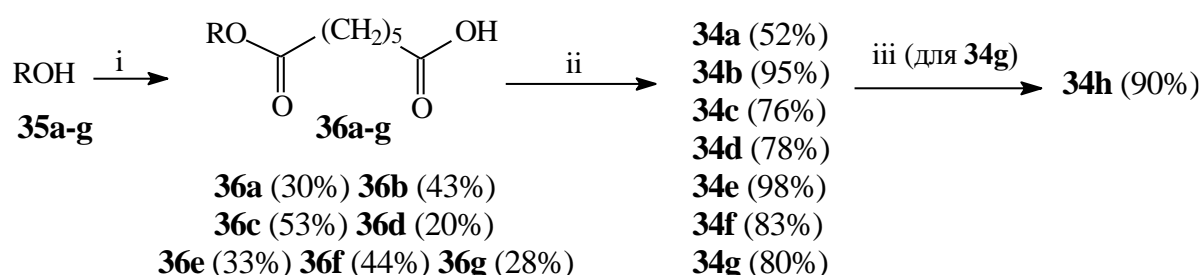
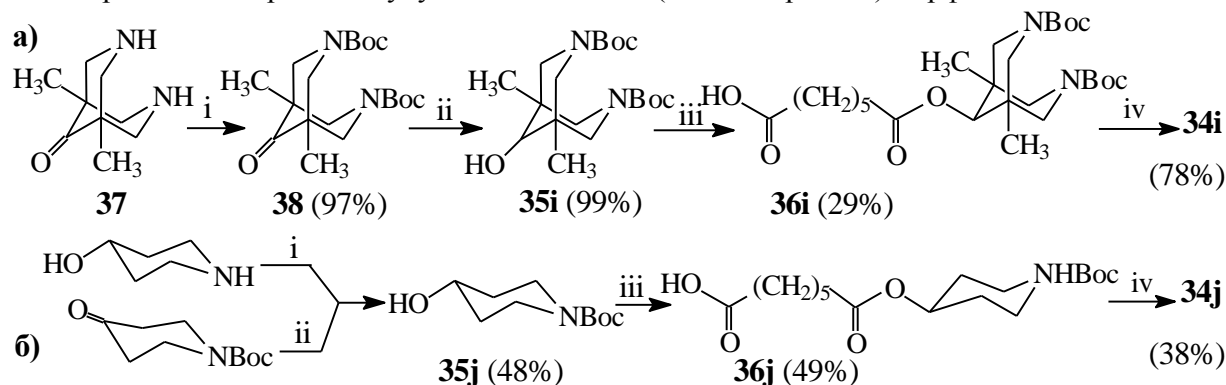


Рисунок 12. Структура **34f** в  $\alpha,\beta$ -тубулиновом димере.



**Схема 9.** Фрагменты R в сериях **35a–g** и **36a–g** идентичны таковым для серии **34a–g** (при совпадении буквенных обозначений) и изображены на рис. 23. Реагенты и условия: i) полиангидрид пимелиновой кислоты (**5c**), 4-DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $t_{\text{комн.}}$ , затем  $80^\circ\text{--}90^\circ\text{C}$ ; ii) N-дезацетилколхицин, EEDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $t_{\text{комн.}}$ ; iii) для **34g**: 1.  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $t_{\text{комн.}}$ ; 2.  $\text{NaHCO}_3$  aq.

Все полученные аналоги тубулокластина **34a–j** (см. табл. 2) проявили очень высокую цитотоксичность – в наномолярном интервале концентраций (многие из них оказались более активны, чем колхицин). Кроме того, все соединения серии вызывали фрагментацию ядер, типичную для клеток, претерпевающих апоптоз. Конъюгаты **34a–h** обладали не только способностью к деполимеризации микротрубочек, но и проявляли сильный или умеренный кластеризующий эффект. Соединения **34i,j** с гетероциклическими группировками и объемными *трет*-бутоксикарбонильными заместителями вызывали образование агрегатов тубулина необычной (стопкообразной) морфологии.



**Схема 10.** Реагенты и условия: i)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ;  $\text{HSO}_3\text{NH}_2$  (для **37**) или 4-DMAP (для пиперидин-4-ола), 24 ч,  $t_{\text{комн.}}$ ; ii)  $\text{NaNH}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 12 ч,  $t_{\text{комн.}}$ ; iii) полиангидрид пимелиновой кислоты (**5c**), 4-DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $t_{\text{комн.}}$ ; iv) N-дезацетилколхицин, EEDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $t_{\text{комн.}}$ .

Анализ соотношений структура – активность в серии веществ **34a–h** с тубулин-кластеризующим эффектом по типу тубулокластина показал, что гидрофобные и объемные заместители в адамантане, независимо от их расположения (структуры **34c–g**), мало влияют на величину

цитотоксичности, которая остается во всех случаях высокой. Максимальную цитотоксичность ( $IC_{50}=6$  нМ) проявляет соединение **34f** с тремя гидрофобными и объемными заместителями в различных положениях каркаса, что подтверждает прогноз активности, сделанный для этого соединения. В паре соединений с одинаковыми заместителями **34b** и **34c**, но с различными каркасами, конформационно более гибкое бицикло[3.3.1]нонановое производное только немного менее активно, чем его «жесткий» аналог **34c**. Конъюгаты с гидрофильными группировками в адамантане незначительно (**34a**) или заметно (**34h**) менее активны. Однако уменьшение активности производного аминоадамантана **34h**, по-видимому, связано с низкой способностью проникновения в клетку из-за высокой степени его ионизации при pH 7.4. Это косвенно подтверждается тем фактом, что соединения с ацилированной (**34f**) или Вос-защищенной аминогруппой – соединение **34g** (предшественник **34h** в синтетической схеме) обладают высокой цитотоксичностью.

**Таблица 2.** Результаты биотестирования соединений **34a–j**.

№	<b>34a</b>	<b>34b</b>	<b>34c</b>	<b>34d</b>	<b>34e</b>	<b>34f</b>	<b>34g</b>	<b>34h</b>	<b>34i</b>	<b>34j</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	Колхицин
Цитотоксичность $IC_{50}$ (нМ)	62±14	21±7	11±4	15±6	13±6	6±2	38±4	400±70	15±4	11±2	6	11	27
Кластеры (1μМ)	+++	++	+++	++	+++	+++	++	++	*	*	+++	+++	

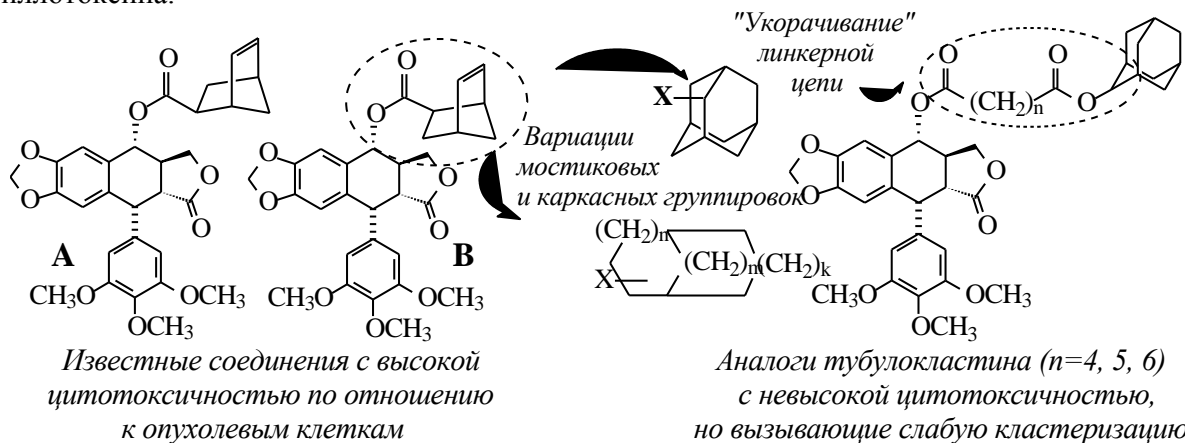
\*Необычная морфология кластеров

Особый интерес представляют данные о высокой цитотоксичности и сильной кластеризующей способности соединений **34c**, **34d**, **34f**, и **34g** с объемными группировками [ $C(O)OCH_3$ ,  $n$ -Bu,  $NHC(O)CH_3$ ,  $NHC(O)Bu^t$ ] в различных положениях каркаса. Это свидетельствует о том, что при связывании указанных соединений с белком адамантановый фрагмент оказывается внутри объемной полости, и косвенно подтверждает высказанное нами ранее предположение о её расположении в области на границе между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами тубулинового димера.

Полученные данные о биоизостеричности практически всех проведенных замен подтверждают гипотезу о том, что **кластеризующий эффект является общим свойством определенным образом C<sup>7</sup>-замещенных производных колхицина**. Важным является и факт большей цитотоксичности к клеткам карциномы A549 у соединения **34f** по сравнению с его структурным прототипом – узловым аналогом тубулокластина **3**. Это показывает принципиальную возможность как увеличения активности лигандов тубулина данного типа путем модификации фрагмента, взаимодействующего с  $\alpha$ -субъединицей белка, так и возможность предсказания их структур методами компьютерного моделирования. Цитотоксичность конъюгата **34f**, также как и описанного выше **12a**, **сравнима с таковой для клинически используемого противоопухолевого препарата таксола**.

## 2.2. Изостерические замены мостиковых группировок в аналогах подофиллотоксина

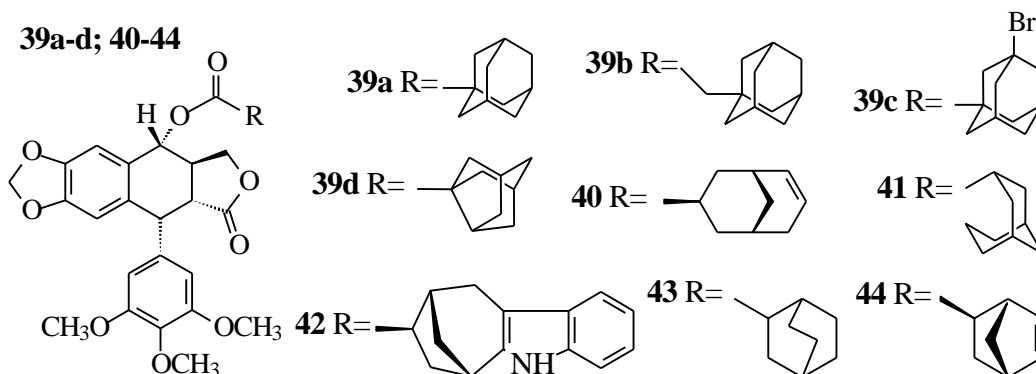
Один из изученных в настоящей работе структурных типов лигандов тубулина был получен в результате изостерической замены заместителей в положении при  $C^4$  в некоторых производных подофиллотоксина.



**Рисунок 13.** Предложенные варианты замены в структурах соединений-лидеров – производных подофиллотоксина с мостиковыми группировками в заместителях при  $C^4$ .

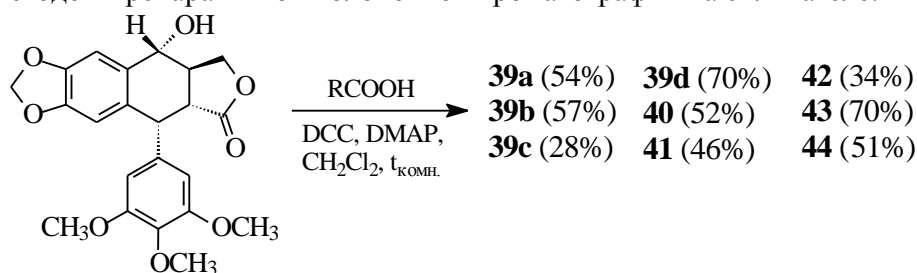


Литературный анализ показал, что таких соединений описано очень мало, но среди них есть соединения с очень высокой цитотоксичностью. Поэтому в настоящей работе мы расширили серию аналогов подофиллотоксина, предложив для синтеза структуры, содержащие разнообразные замещенные и незамещенные каркасные и мостиковые группировки (рис. 13). Нами изучалась взаимозаменяемость типа «мостик» – «каркас», а также варьировались длина и тип линкера, и объем вводимых фрагментов и заместителей в них. Конкретный выбор заместителей был обусловлен разнообразием их строения и синтетической или коммерческой доступностью реагентов. Изначально нами были синтезированы серии каркасных (**39a–d**) и мостиковых (**40–44**) производных подофиллотоксина (рис. 14).



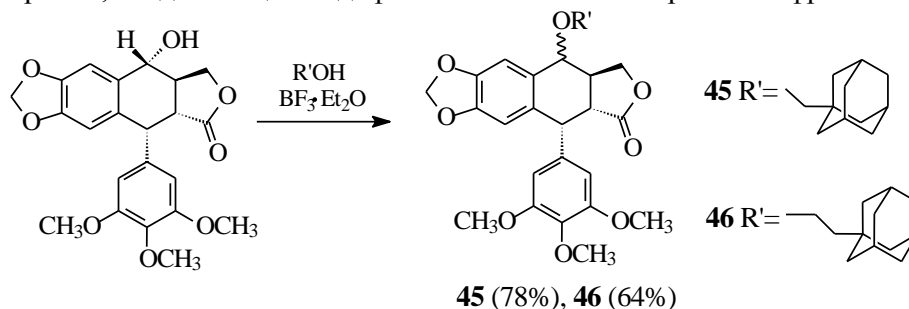
**Рисунок 14.** Производные подофиллотоксина (для соединений **40** и **42–44** указана относительная конфигурация мостиковых фрагментов, так как они были получены в виде диастереомерных смесей).

Целевые вещества **39a–d** и **40–44** синтезировали реакцией этерификации подофиллотоксина с соответствующими кислотами в системе DCC/4-DMAP (схема 11). Исходные кислоты были коммерчески доступны или получены по описанным методикам: *рац-экзо*-(индоло[2,3-*b*])бицикло[3.2.1]окт-2-ен-6-карбоновая кислота для синтеза соединения **42** получена ранее на кафедре органической химии химического факультета МГУ. *Рац*-бицикло[3.3.1]нонан-3-эндо-карбоновую кислоту получали в две стадии реакцией адамантанона с азидом натрия и последующим восстановлением образовавшейся неопределенной кислоты. Выходы целевых продуктов **39a–d** и **40–44** реакции этерификации подофиллотоксина каркасными и мостиковыми кислотами (после хроматографической очистки) составили 28–70%. Соединения **40**, **42–44** получены в виде смесей диастереомеров, которые не разделяются методом препаративной колоночной хроматографии на силикагеле.



**Схема 11.** Обозначения R в кислотах на данной схеме те же, что и на рисунке 14.

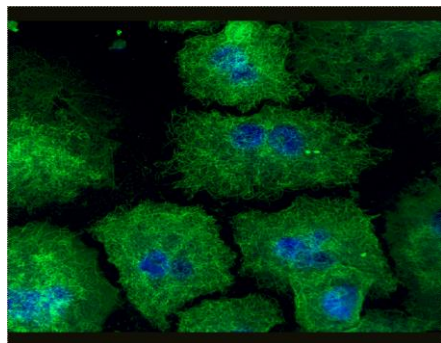
Мы синтезировали также два адамантановых производных подофиллотоксина **45** и **46** с другим типом линкерной группировки, соединяющей подофиллотоксиновый и каркасный фрагменты (схема 12).



**Схема 12.**

Целевые простые эфиры получали взаимодействием природной молекулы с (адамантан-1-ил)метанолом или с 2-(адамантан-1-ил)этанолом в присутствии эфирата трифторида бора. Отметим, что при попытке проведения данной реакции с адамантан-1-олом целевой продукт не был выделен (по всей вероятности, из-за сильных стерических затруднений в обоих субстратах), а получен только продукт C<sup>3</sup>-C<sup>4</sup> элиминирования.

Данные биотестирования на клетках карциномы A549 (см. табл. 3) показывают, что цитотоксичность синтезированных веществ варьируется от заметной для **40**, **42**, **44** (IC<sub>50</sub> в наномолярном интервале концентраций) до умеренной для **39a,b,d**; **41**, **43**, **46** (IC<sub>50</sub> в микромолярном интервале концентраций), а соединения **39c** и **45** (и α и β изомеры) нецитотоксичны.



При 100μM вещества **39c**, **40**, **42–44** и **46** вызывают типичную для действия подофиллотоксина полную (или практически полную) деполимеризацию сети микротрубочек. Каркасные производные подофиллотоксина **39a,b,d**; **46** и мостиковое соединение **41** оказывают необычный эффект на сеть микротрубочек, вызывая их укорачивание и слабое или сильное «закручивание» (см. рис. 15). Этот эффект близок описанному выше для аналогов тубулокластина с заменой колхицинового фрагмента 2-метоксиэстрадиолом **31a,b**, но для веществ **39a,b** проявляется гораздо более интенсивно. Для производных норадамантана **39d** и адамантана **46** (α+β) в клетках A549 наблюдался также известный эффект образования звездообразных структур отделенными центросомами. В концентрации 10 μM все полученные соединения, за исключением изомерной пары **45**, обладали способностью вызывать апоптоз опухолевых клеток A 549.

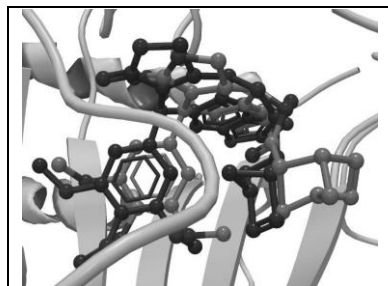
Анализ соотношений структура – активность выявляет ряд интересных закономерностей. Так, заметно отсутствие прямой зависимости цитотоксичности и эффекта на сеть микротрубочек от общего объема присоединенного фрагмента (ср., например, пары **42** – **41** и **40** – **39d**). Однако, тенденция к уменьшению активности при «расширении» циклов в каркасной или мостиковой группировке все-таки наблюдается. Это показывает уменьшение цитотоксичности в парах **44**→**43** и **39d**→**39a**.

**Таблица 3.** Результаты биотестирования соединений **39a–d**, **40a–f**, **45** и **46**

Вещество	Цитотоксичность, IC <sub>50</sub> (μM) <sup>1</sup>	Эффект на сеть микротрубочек (МТ) (10 μM, 24 ч или указано дополнительно)
<b>39a</b>	17.2±0.9	100 μM (48 ч): «закручивание» МТ
<b>39b</b>	6.2±0.1	10 μM (48 ч): сильное «закручивание» МТ
<b>39c</b>	>50000	10 μM (48 ч) полная деполимеризация МТ
<b>39d</b>	12.2±0.2	100 μM (48 ч): укорачивание и слабое «закручивание» МТ, «звездочки»
<b>40</b>	0.42±0.09	Практически полная деполимеризация МТ
<b>41</b>	2.59±0.02	Укорачивание и слабое «закручивание» МТ
<b>42</b>	0.71±0.09	Практически полная деполимеризация МТ
<b>43</b>	1.41±0.07	Практически полная деполимеризация МТ
<b>44</b>	0.19±0.03	Полная деполимеризация микротрубочек
<b>45</b> (α)	>50000	100 μM (48 ч): нет эффекта на МТ (нет апоптоза)
<b>45</b> (β)	>50000	нет эффекта на МТ (нет апоптоза, нет митоза)
<b>46</b>	7.3±0.5	Слабое «закручивание» МТ, «звездочки»; при 100μM (24 ч): полная деполимеризация МТ
<b>A</b>	0.004	Не определялся
<b>B</b>	0.004	Не определялся
<b>Подофиллотоксин</b>	0.014 ± 0.002	Полная деполимеризация МТ

<sup>1</sup> результаты 3 – 6 экспериментов; 100% ингибирование роста клеток наблюдалось при 10 μM (48 ч) для **39b**, **39c**, **40–44**, и при 100 μM (48 ч) – для **39a** и **39d** (все соединения, кроме **45**, вызывали апоптоз).

Важную роль играет конфигурация атома алициклического фрагмента, присоединенного к подофиллотоксину. Это демонстрирует заметное уменьшение активности при замене экзо-бицикло[3.3.1]ноненового фрагмента в диастереомерной паре **40** эндо-бицикло[3.3.1]нонаном в соединении **41**. Резкое падение цитотоксичности наблюдается и для диастереомерной смеси **44** по сравнению с такими же по объему и липофильности соединениями **A** и **B**. По данным компьютерного докинга (рис. 16), молекула **A** и ее экзо-аналог (*1S,2R,4S*)-**44** имеют различное расположение и подофиллотоксинового фрагмента, и мостиковых группировок в колхициновом домене тубулина.

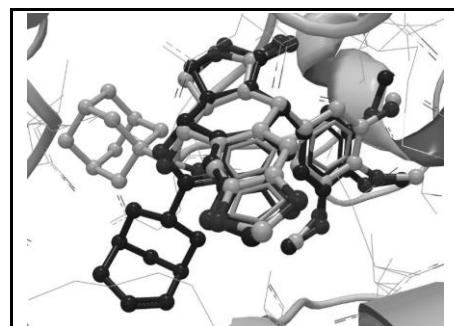


**Рисунок 16.**

Расположение структур **A** и (*1S,2R,4S*)-**44** (показана более темным) в  $\alpha,\beta$ -тубулиновом димере.

В структурно близких парах **40** – **39d** и **40** – **39a** увеличение конформационной «жесткости» заместителя приводит к резкому снижению и цитотоксичности, и эффективности тубулин-деполимеризующего действия на сеть микротрубочек. По данным компьютерного моделирования, позиции каркасной и мостиковой группировок соединений **39a** и (*1S,3R,5R*)-изомера **40** имеют очень существенные различия (см. рис. 17). Изменение длины и типа линкера между фрагментом подофиллотоксина и алициклической группировкой также оказывает заметное влияние на активность.

Сравнение полученных нами моделей лиганд – тубулин для каждого соединения рассматриваемой серии, представленного в таблице 5, показывает, что у большинства веществ каркасные (мостиковые)

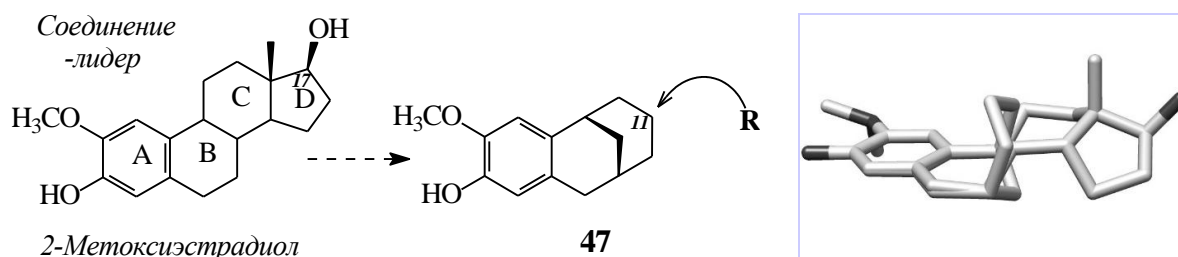


**Рисунок 17.** Расположение структур **39a** (показана серым) и (*1S,3R,5R*)-**40** в  $\alpha,\beta$ -тубулиновом димере.

группировки экспонированы в пограничную область между  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединицами белка и не образуют явных выгодных гидрофобных контактов, более того, возможны стерические препятствия для расположения объемных группировок в этой области. Это позволяет уточнить высказывавшуюся в литературе гипотезу о том, что высокая цитотоксичность соединений **A** и **B** обусловлена не их повышенной (по сравнению с природной молекулой) липофильностью, а дополнительными гидрофобными взаимодействиями с тубулином. Согласно полученным нами данным структура – активность и результатам молекулярного моделирования активность каркасных (мостиковых) производных по атому кислорода при  $C^4$  подофиллотоксина, определяется, в основном, наличием или отсутствием стерических затруднений, создаваемых структурными элементами алициклов в области связывания с белком (и сохранением или искажением позиции подофиллотоксинового фрагмента в тубулине при рассматриваемой модификации).

### 2.3. Необычная замена полициклического скелета 2-метоксиэстрадиола

Замена стероидного скелета 2-метоксиэстрадиола другими фрагментами представлена в литературе единичными примерами. В данной работе нами была предложена необычная, неклассическая изостерическая замена пары колец В–С 2-метоксиэстрадиола бицикло[3.3.1]нонанным фрагментом, содержащим два шестичленных цикла с мостиком минимального размера (рис. 18, общий тип **47**).



**Рисунок 18.** Идея изостерической замены в молекуле 2-метоксиэстрадиола (слева); справа – компьютерное наложение молекул соединения-лидера и структурного шаблона **47**.

Компьютерное наложение молекулы 2-метоксиэстрадиола и структурного шаблона **47** в наиболее стабильной конформации *кресло* – *кресло* демонстрирует, что они хорошо совмещаются между собой, но для большего соответствия молекуле **47** желательно введение дополнительного заместителя в положение C<sup>11</sup> мостиковой группировки **47** (рис. 18). Мы изучили возможность синтеза структурного шаблона **47**, используя ретросинтетический путь, представленный на схеме 13 и включающий в себя промежуточный синтез кетонов общей формулы **48**. Целевое вещество **48** было получено по разработанной шестистадийной схеме (схема 14) из 1-(бензилокси)-4-бром-2-метоксибензола **49** (синтезированного в две стадии из гваякола). Катализируемая солями меди реакция присоединения арилмагнийбромидов, полученного из **49**, к 2-циклогексенону привела к продукту **50**. Кетон **50** ввели в реакцию эпексидирования по Кори – Чайковскому с метилидом диметилсульфоксония, генерируемого *in situ* из триметилсульфоксонийиодида в присутствии гидрида натрия. В результате с высоким выходом был получен оксидан **51** в виде индивидуального диастереомера. Продукту была приписана *транс*-конфигурация на основании литературных данных.

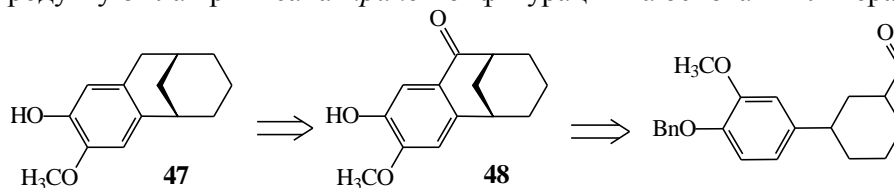


Схема 13. Ретросинтетическая схема получения структур общей формулы **47**.

Раскрытие эпоксида в соединении **51** в присутствии эфира трифторида бора привело к *цис*-изомеру альдегида **52**. Последующее окисление соединения **52** до соответствующей кислоты встретило некоторые сложности. Попытка применить окислительный агент Oxone (KHSO<sub>5</sub>·0.5KHSO<sub>4</sub>·0.5K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) оказалась неудачной, в то время как использование свежеприготовленного Ag<sub>2</sub>O привело к получению кислоты **53** с очень низким выходом (11%). Только обработка альдегида **52** перманганатом калия при нейтральном pH привела к карбоновой кислоте **53** с приемлемым выходом 31%.

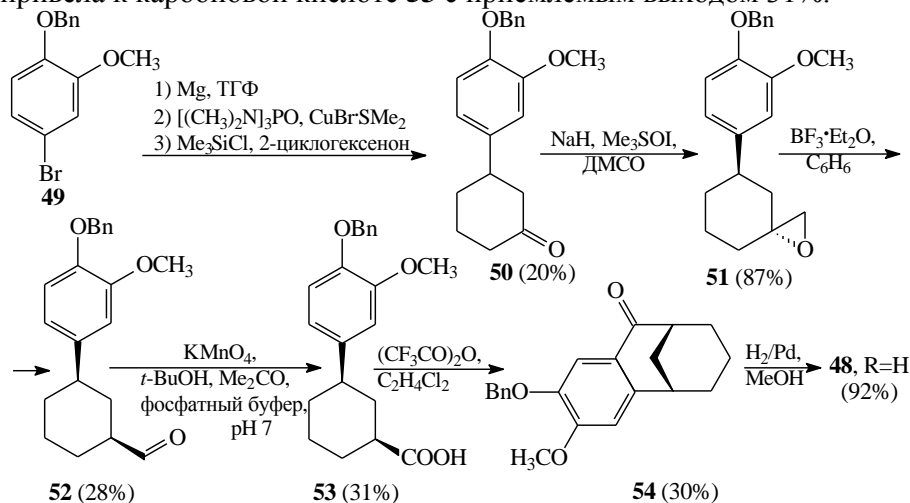


Схема 14. Реализованный путь получения соединения **48** (указаны относительные конфигурации, так как вещества представляют собой рацемические смеси).

Реакция внутримолекулярной циклизации для кислоты **53** привела к соединению **54**, структура которого была доказана методом РСА. Согласно данным РСА и результатам расчетов по программе RICON, шестичленный цикл C(1)-C(13)-C(9)-C(10)-C(11)-C(12) мостиковой группировки имеет параметры складчатости Зефирова – Палюлина (ZP) и Кремера – Попла (CP): S<sub>2</sub>=0.085, θ=4.2°, ψ<sub>2</sub>=22.0°, σ=0.33 (ZP) и Q=0.587, θ=8.6°, φ<sub>2</sub>=21.4° (CP), что соответствует слегка искаженной конформации *кресло*. Цикл C(1)-C(2)-C(7)-C(8)-C(9)-C(13) сильно уплощен (ZP: S<sub>2</sub>=0.501, θ=38.8°, ψ<sub>2</sub>=3.7°, σ=0.79; CP: Q=0.534, θ=54.1°, φ<sub>2</sub>=3.3°) и принимает конформацию слегка искаженного *конверта*. Кетон **54**

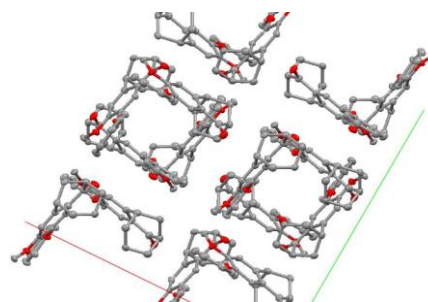
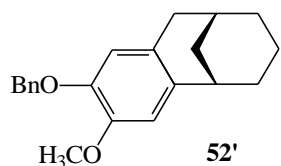


Рисунок 19. Упаковка молекул соединения **54** в кристалле.

кристаллизуется в высоко симметричной молекулярной упаковке (рис. 19).

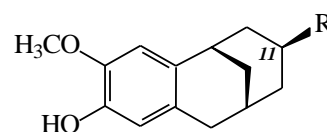
Отщепление защитной группы в соединении **54** привело к целевому соединению **48** (выход 92 %). В ходе разработки этого синтеза нами было обнаружено, что стадия раскрытия эпоксида в соединении **51**



в присутствии эфира трифторида бора приводит к образованию не только альдегида **52**, но и побочных продуктов, один из которых был выделен и идентифицирован как соединение **52'** – продукт необычной комбинации реакции внутримолекулярной циклизации с одновременным восстановлением. Благодаря обнаруженной реакции, которая сразу приводит к веществам общей формулы **47**, разработанная синтетическая схема оказывается весьма удобной в

препаративном отношении. Поэтому именно этот путь был использован далее для получения нестероидных аналогов 2-метоксиэстрадиола.

Для синтеза нами были предложены соединения **55a** с *n*-бутильным и **55b** с гидроксиэтильным заместителями, моделирующими часть кольца D исходного стероида [как видно из рисунка 18, *экзо*-конфигурация (относительная конфигурация) заместителя при C<sup>11</sup> является предпочтительной]. Синтез соединений **55a** и **55b** проводили на основе разработанной стратегии превращений по схемам 15 и 16. Катализируемая солями меди реакция присоединения арилмагнийбромида, полученного из 1-(бензилокси)-4-бром-2-метоксибензола **49** к *рац*-5-бутилциклогекс-2-ен-1-ону (**56**) привела к кетону **58a**. Попытка получить аналогичным образом кетон **58b** не увенчалась успехом из-за образования трудноразделимой смеси продуктов, поэтому он был синтезирован по реакции 1,4-присоединения 4-(бензилокси)-3-метоксифенил-борной кислоты к *рац*-5-(бензилокси-этил)циклогексенону **57**. Соединения **58a** и **58b** были получены в виде индивидуальных *транс*-диастереомеров. Данные по эффекту Оверхаузера для обоих соединений показали, что подавление сигнала протона HC<sup>3</sup> не приводит к отклику у сигнала протона HC<sup>5</sup>, но приводит к увеличению интенсивности пиков протонов метиленовой группы в заместителе при C<sup>5</sup> (см. рис. 20).



**55a** R=(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>

**55b** R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH

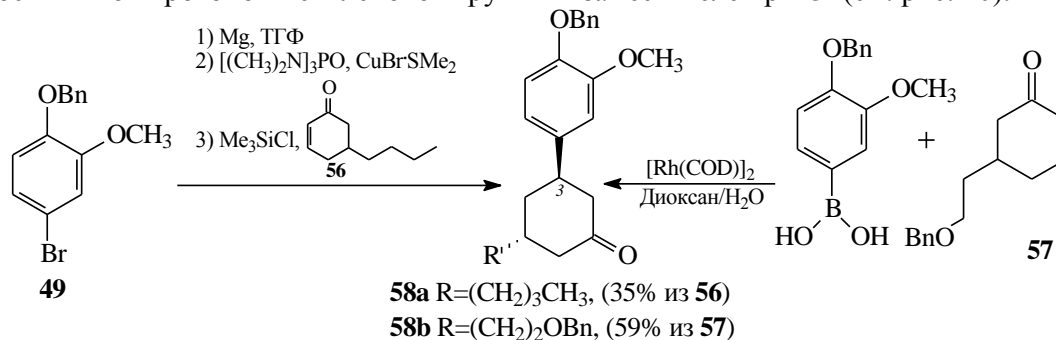


Схема 15. На схеме указаны относительные конфигурации соединений **58a,b**.

Реакция эпоксицирования кетонов **58a** и **58b** по Кори–Чайковскому привела к оксиранам **59a** и **59b** в виде индивидуальных диастереомеров (схема 16). *Транс*-конфигурация арильного и эпоксидного фрагментов в **59a** подтверждена данными эффекта Оверхаузера, а именно откликом сигналов H<sup>4eq</sup> и H<sup>8eq</sup> при подавлении сигналов оксирановых протонов. *Транс*-конфигурация заместителей при C<sup>5</sup> и C<sup>7</sup> также подтверждается проявлением в спектре оксирана **59a** эффекта Оверхаузера, аналогичного таковому для исходного кетона **58a**. Как и для упоминавшегося выше модельного соединения **51**, раскрытие эпоксида в оксиране **59a** привело к альдегиду **60a** и продукту внутримолекулярной циклизации **61a**. Соединение **60a** было получено в виде смеси C<sup>1</sup> изомеров в соотношении 2:1.

В ходе аналогичного раскрытия эпоксида в соединении **59b** методом тонкослойной хроматографии была подтверждена последовательность протекания рассматриваемого процесса, а именно изначальное образование альдегида и его последующее превращение в продукт циклизации. Увеличение времени проведения реакции до двух часов позволило получить, главным образом,

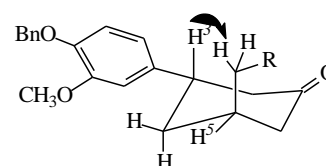
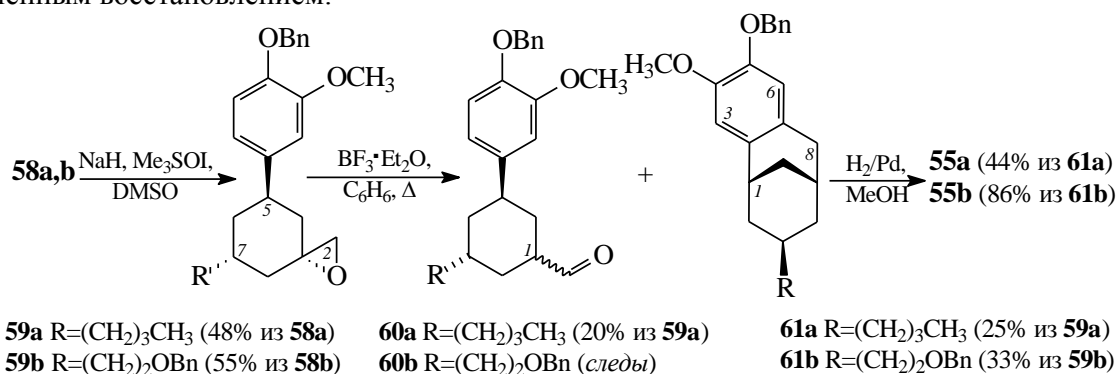


Рисунок 20. Схематическое изображение H–H взаимодействия в кетонах **58a,b** по данным NOESY

продукт циклизации **61b**. Таким образом, также как и для модельного соединения **51**, в ходе реализации схемы 16 нами была проведена необычная реакция внутримолекулярной циклизации с одновременным восстановлением.



**Схема 16.** На схеме указаны относительные конфигурации соединений **59–61** (так как они представляют собой рацемические смеси).

В литературе описаны процессы раскрытия эпоксида под действием эфира трифторида бора, сопровождающиеся внутримолекулярной циклизацией, в том числе, с последующим элиминированием. Очевидно, превращение эпоксидов **59a,b** в соответствующий альдегид в присутствии кислоты Льюиса (в нашем случае BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O) происходит с участием карбокатионных частиц. Далее атака бензольного кольца (активированного заместителями –OR) карбокатионом R–CH<sup>+</sup>–OBF<sub>3</sub> приводит к ароматическому замещению и образованию бицикло [3.3.1]нонанового фрагмента с группой –OBF<sub>3</sub> при C<sup>8</sup>. Поэтому в описанных в литературе процессах конечными продуктами являются спирты или продукты их элиминирования – алкены. Однако, в аналогичной реакции для оксиранов **59a** и **59b** промежуточный спирт не был обнаружен, а образование двойной связи в мостиковом фрагменте невозможно, так как с одной стороны он аннелирован с ароматической системой, а образование кратной связи у узлового атома углерода запрещено правилом Бредта. Это означает, что соединения **61a,b** образуются в ходе элиминирования группы –OBF<sub>3</sub> и гидридного переноса к соответствующему карбокатиону. Такая способность описана для мостиковых и каркасных систем в различных процессах (например, адамантан-1-ол превращается в адамантан в присутствии BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O в ТГФ при 160°C). Основной проблемой понимания механизма данных реакций является источник гидрид-иона, в качестве которого обычно указывается растворитель или «реакционная среда». В нашем случае некоторое количество любого исходного компонента реакции может играть роль источника гидрид-иона, однако дополнительные исследования с использованием изотопных меток необходимы для прояснения деталей механизма протекания обнаруженного процесса.

Поскольку внутримолекулярная циклизация альдегидов **60a** и **60b** возможна только в случае *цис*-конфигурации арильного и альдегидного фрагментов, соединения **61a,b** должны получаться в виде индивидуальных диастереомеров, что и наблюдалось в действительности. Поскольку конфигурация *n*-бутильного и 2-бензилоксиэтильного заместителей в кетонах **58a** и **58b** остается неизменной в последующих реакциях, этим заместителям была приписана *экзо*-конфигурация в продуктах **61a,b**. Отщепление защитной группы в соединениях **61a,b** привело к целевым соединениям **55a,b**.

В ходе настоящего исследования мы получили еще два нестероидных аналога 2-метоксиэстрадиола с заменой бицикло[3.3.1]нонаном системы колец C–D исходного стероида. Для синтеза были предложены легко доступные эфиры **62** и **63**, конформационно более гибкие, чем **55a,b** для обеспечения возможности мостиковому фрагменту принять оптимальное расположение в белке-мишени (близкое к таковому для системы колец C–D исходной молекулы). Соединения **62** и **63** были получены из *эндо*-7-гидроксибицикло[3.3.1]нонан-*экзо*-3-карбоновой кислоты с помощью реакции этерификации кислоты **64** со спиртом **65** или спирта **67** с кислотой **68** (схема 17). Удаление защитных групп в соединениях **66** и **69** привело к целевым эфирам **62** и **63**.

Первичное биотестирование веществ **55a**, **55b**, **62** и **63** на клетках карциномы A549 показало, что два из них – **55a** и **63** обладают заметной цитотоксичностью – в субмикромольном интервале концентраций (EC<sub>50</sub> = 4-6 μM, EC<sub>50</sub> для 2-метоксиэстрадиола = 0.2 μM). Полученные нестероидные аналоги 2-метоксиэстрадиола проявили заметную цитотоксичность по отношению к клеткам

карциномы A549 и представляют интерес для дальнейшего изучения механизма их цитотоксической активности и последующей структурной оптимизации.

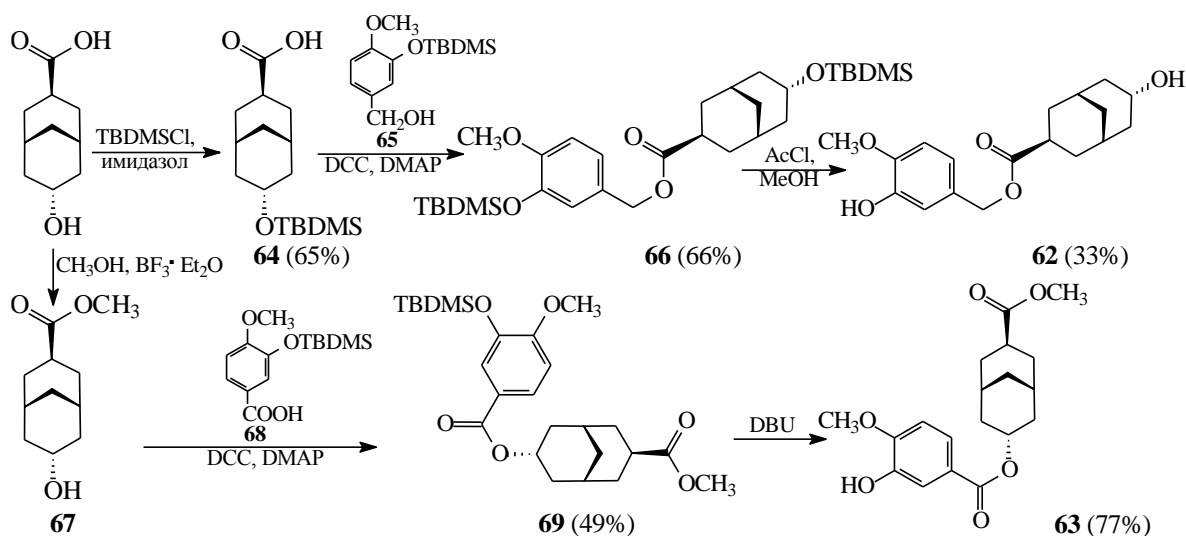


Схема 17.

#### 2.4. Изостерическая замена в аналогах комбретастина А-4

Заключительная серия исследований включала в себя несколько попыток использования разнообразных видов изостерической замены для создания новых структурных классов аналогов комбретастина А-4. В рамках совместных работ с сотрудниками лаборатории биологически активных органических соединений кафедры органической химии и лаборатории органического синтеза кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова нами изучались аналоги комбретастина А-4, в которых ароматические группировки соединены удлинненным по сравнению с исходной молекулой линкером (рис. 21).

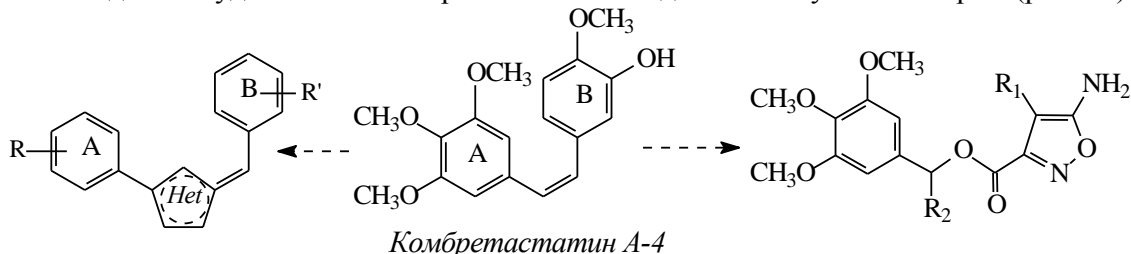


Рисунок 21. Схематическое изображение изостерических замен в структуре комбретастина А-4.

Однако проведенные замены оказались не биоизостерическими, а полученные 2-арил-4-арилметилиден-имидазолы и аминоксазолы, хотя и проявили умеренную цитотоксичность по отношению к клеткам карциномы А549, не обладали способностью ингибировать деполимеризацию микротрубочек. Поэтому мы изучили другой тип аналогов исходной молекулы с удлинненным линкером. Мы опирались на известные данные о высокой антитубулиновой активности производного винилога комбретастина К и соединения N (рис. 22), в котором кольцо В исходной молекулы заменено незамещенным нафталиновым ядром. Это привело к идее создания новых структур путем комбинирования алкоксиарильных группировок с липофильным фрагментом, в качестве которого был выбран адамантан (см. рис. 22).

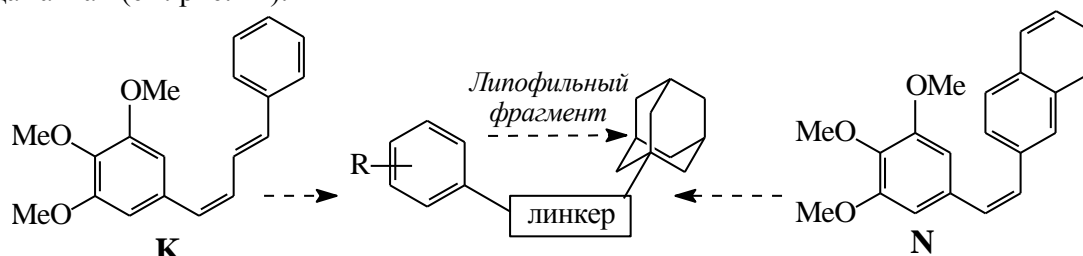
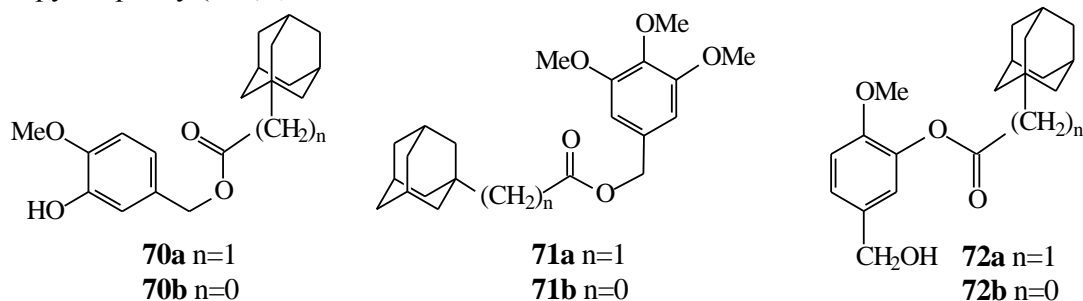


Рисунок 22. Идея создания новых структурных аналогов комбретастина А-4.

Чтобы проверить, могут ли в принципе подобные вещества ингибировать полимеризацию тубулина, мы предложили для синтеза и биотестирования серию из шести легко доступных сложных эфиров **70a,b–72a,b**. В этих соединениях алкоксиарильные группы присоединены к адамантану через гибкий линкер, длина которого равна или близка к таковой в молекуле **К** (см. рис. 22). В качестве ароматических фрагментов мы выбрали присутствующие в молекуле комбретастина триметоксифенильную (**70a,b**) и 2-метоксифенольную группы (**71a,b**), а также 5-(гидроксиметил)-2-метоксифенильную группировку (**72a,b**).



Синтез целевых веществ осуществляли однотипным методом (схема 18) – реакцией этерификации адамантануксусной (**73a**) и адамантанкарбоновой (**73b**) кислот защищенным спиртом **74** или (3,4,5-триметоксифенил)метанолом, или 5-(гидроксиметил)-2-метоксифенолом в системе DCC/4–DMAP.

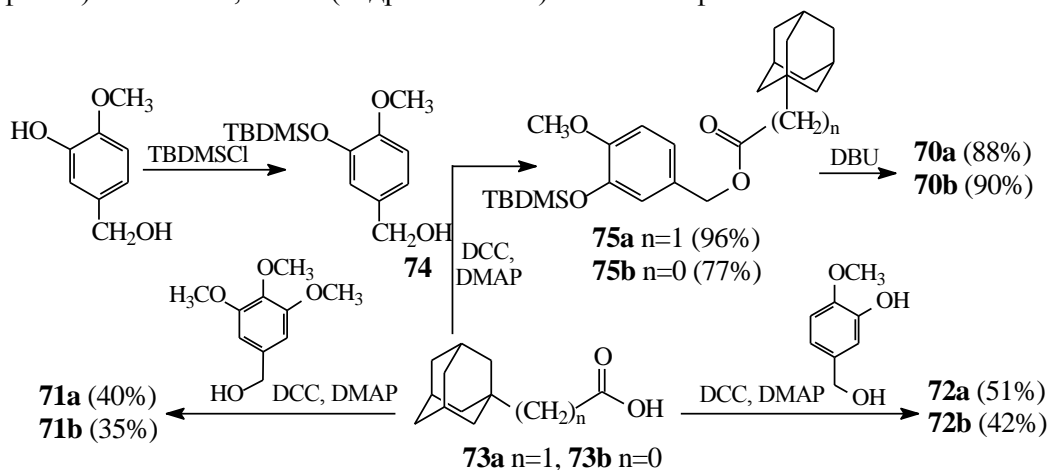


Схема 18.

Биотестирование полученной серии соединений на клетках карциномы A549 показало, что три вещества проявили заметную цитотоксичность в субмикромольном интервале концентраций – **70b** ( $EC_{50}=4.9 \mu M$ ), **72a** ( $EC_{50}=4.3 \mu M$ ) и **72b** ( $EC_{50}=6.6 \mu M$ ), хотя и меньшую, чем CA-4 ( $EC_{50}=0.01 \mu M$ ). При  $100 \mu M$  все полученные вещества сильно изменяют морфологию клеток, вызывая округление и потерю адгезии, а также сокращение поверхности, но при этом эфиры **70a,b**, **71a,b** и **72b** не оказывают влияния на сеть микротрубочек. Соединение **72a**, однако, проявляет выраженную способность вызывать полную деполимеризацию микротрубочек и вызывает заметную фрагментацию ядер клеток A549, характерную для апоптоза. Отметим, что при  $100 \mu M$  продукты гидролиза сложного эфира **72a** – 5-(гидроксиметил)-2-метоксифенол и адамантануксусная кислота (а также ее метиловый эфир) не оказывали никакого эффекта на микротрубочки. То есть соединение **72a** оказывает достоверный цитотоксический эффект на клетки карциномы A549 путем воздействия на сеть микротрубочек. 5-(Гидроксиметил)-2-метоксифенил адамантил-1-ацетат является представителем нового структурного типа ингибиторов полимеризации тубулина и перспективен в качестве оригинального соединения-лидера для дальнейшей оптимизации.

## ВЫВОДЫ

1. Реализованы многостадийные схемы синтеза серии производных узлового аналога тубулокластина [*N*-(7-(адамант-1-илокси)-7-оксогептаноил)-*N*-дезацетилколхицина] с различным расположением сложноэфирной группы линкера относительно колхицинового и адамантанового



фрагментов молекулы. Показано, что подобная замена во всех изученных случаях является биоизостерической и сделано заключение о незначительном влиянии позиции сложноэфирной группы в линкерной цепи соединения-лидера на активность. Противоопухолевая активность некоторых соединений к клеткам карциномы A549 сравнима с таковой для клинически используемого препарата – таксола.

2. Реализованы многостадийные схемы синтеза серии изостерических аналогов тубулокластина с заменой базового структурного фрагмента – колхицина – 2-метоксиэстрадиолом и комбретастатином А-4. В ходе синтеза продемонстрирована сложность проведения реакции восстановительного аминирования 2-метокси-6-оксо-17 $\beta$ -эстрадиола с адамант-2-ил-8-аминооктаноатом. Для некоторых соединений обнаружена способность оказывать как кластеризующее, так и необычное действие на сеть микротрубочек опухолевых клеток. Подтверждена гипотеза о том, что кластеризующий эффект может проявляться соединениями, содержащими фрагменты различных лигандов колхицинового домена тубулина.

3. С использованием метода молекулярного моделирования проведен дизайн структур аналогов тубулокластина с классической и неклассической изостерической заменой адамантанового фрагмента. Реализован синтез серии таких соединений и для всех из них продемонстрирована очень высокая цитотоксичность к опухолевым клеткам A549 (в наномолярном интервале концентраций), а также способность вызывать образование тубулиновых кластеров, как известной, так и необычной морфологии. Факт биоизостеричности проведенных замен подтверждает гипотезу о том, что кластеризующий эффект является общим свойством определенным образом C<sup>7</sup>-замещенных производных колхицина.

4. Предложены структуры оригинальных нестероидных миметиков 2-метоксиэстрадиола на основе производных бицикло[3.3.1]нонана с 2-метоксифенольной группировкой. Разработаны и реализованы многостадийные схемы синтеза некоторых из целевых веществ с использованием в качестве ключевых стадий реакций эпоксидирования по Кори – Чайковскому и внутримолекулярной циклизации. В ходе синтеза обнаружена необычная ВF<sub>3</sub>-катализируемая реакция раскрытия оксиранового фрагмента с одновременной внутримолекулярной циклизацией и восстановлением.

5. Синтезирована серия производных подофиллотоксина с модификацией по C<sup>4</sup>, содержащих разнообразные замещенные и незамещенные каркасные и мостиковые группировки. Анализ соотношений структура – активность выявил чувствительность цитотоксичности к размеру, конформационной «жесткости» алициклического фрагмента, типа линкера и позиции его присоединения. Предложены объяснения указанным закономерностям с помощью метода компьютерного молекулярного моделирования. Некоторые соединения серии проявили цитотоксичность к клеткам карциномы A549 в наномолярном интервале концентраций. Для ряда соединений обнаружен необычный эффект на сеть микротрубочек.

6. Проведен молекулярный дизайн аналогов комбретастина А-4 с использованием различных видов биоизостерической замены. Синтезирована серия сложных эфиров адамантануксусной и адамантанкарбоновой кислот с алкоксиарильными спиртами. Для 5-(гидроксиметил)-2-метоксифенил адамантил-1-ацетата продемонстрирована способность при 100  $\mu$ M вызывать полную деполимеризацию сети микротрубочек клеток A549. Это соединение принадлежит к новому, необычному для лигандов колхицинового домена тубулина структурному типу и является интересным соединением-лидером в дизайне веществ с противоопухолевой активностью.

Основное содержание диссертации отражено в следующих публикациях (все журналы индексируются в системах Web of Science, Scopus и РИНЦ):

1. **Н.А. Зефирова**, Е.В. Нуриева, Ю.А. Пикулина, А.В. Огоньков, Б. Вобит, С.А. Кузнецов, О.Н. Зефирова. Сложные эфиры адамантановых кислот с алкоксиарильными спиртами: синтез, антипролиферативная активность и влияние на сеть микротрубочек опухолевых клеток. *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2017, № 8, 1503–1509.
2. E.V. Nurieva, **N.A. Zefirov**, A.V. Mamaeva, Y.K. Grishin, S.A. Kuznetsov, O.N. Zefirova. Synthesis of non-steroidal 2-methoxyestradiol mimetics based on the bicyclo[3.3.1]nonane structural motif. *Mendeleev Communications*, 2017, 27 (3), 240–242.

- O.N. Zefirova, E.V. Nurieva, B. Wobith, V.V. Gogol, **N.A. Zefirov**, A.V. Ogonkov, D.V. Shishov, N.S. Zefirov, S.A. Kuznetsov. Novel antimetabolic agents related to tubuloclastin: synthesis and biological evaluation. *Molecular Diversity*, 2017, 21 (3), 547–564.
- D.A. Vasilenko, E.B. Averina, **N.A. Zefirov**, B. Wobith, Y.K. Grishin, V.B. Rybakov, O.N. Zefirova, T.S. Kuznetsova, S.A. Kuznetsov, N.S. Zefirov. Synthesis and antimetabolic activity of novel 5-aminoisoxazoles bearing alkoxyaryl moieties. *Mendeleev Communications*, 2017, 27 (3), 228–230.
- A.A. Beloglazkina, B. Wobith, E.S. Barskaia, **N.A. Zefirov**, A.G. Majouga, E.K. Beloglazkina, N.V. Zyk, S.A. Kuznetsov, O.N. Zefirova. Synthesis and biological testing of (5Z)-2-aryl-5-arylmethylidene-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-ones as antimetabolic agents. *Medicinal Chemistry Research*, 2016, 25, 1239–1249.
- Н.А. Зефир**ов, О.Н. Зефирова. 2-Метоксиэстрадиол и его аналоги: синтез и соотношения «структура – антипролиферативная активность». *Журнал органической химии*, 2015, 51 (9), 1231–1240.
- Е.В. Нуриева, **Н.А. Зефир**ов, Н.С. Зефиров, С.А. Кузнецов, О.Н. Зефирова. Синтез и антипролиферативная активность производных комбретастина с адамантановым фрагментом. *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2015, № 9, 2248–2252.
- Н.А. Зефир**ов, Я.С. Глазкова, И.В. Кузнецова, Е.В. Нуриева, О.Н. Зефирова. Молекулярный дизайн и попытка синтеза конъюгата 2-метоксиэстрадиола с адамантаном. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, 2015, 56 (2), 85–90.
- Е.С. Барская, А.А. Белоглазкина, Б. Вобит, **Н.А. Зефир**ов, А.Г. Мажуга, Е.К. Белоглазкина, Н.В. Зык, С.А. Кузнецов, О.Н. Зефирова. Синтез и биотестирование 2-арил-5-арилметилдензамещенных 1,3-оксазол-5(4H)-онов и N-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов в качестве аналогов комбретастина А-4. *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2015, № 7, 1560–1563.
- О.Н. Зефирова, Е.В. Нуриева, Я.С. Глазкова, **Н.А. Зефир**ов, А.В. Мамаева, Б. Вобит, В.И. Романенко, Н.А. Лесная, Е.М. Трещалина, С.А. Кузнецов. Антипролиферативная активность тубулокластина и его стероидных аналогов. *Химико-фармацевтический журнал*, 2014, 48 (6), 19–24.
- О.Н. Зефирова, Я.С. Глазкова, Е.В. Нуриева, **Н.А. Зефир**ов, А.В. Мамаева, Б. Вобит, Н.С. Зефиров, С.А. Кузнецов. Синтез и биотестирование аналогов тубулокластина с алициклическими группировками и 2-метоксиэстрадиолом. *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2014, №5, 1126–1129.
- D.V. Shishov, E.V. Nurieva, **N.A. Zefirov**, A.V. Mamaeva, O.N. Zefirova. Synthesis of 5-hydroxy-4-methoxytricyclo[7.3.1.0<sup>2,7</sup>]trideca-2,4,6-trien-8-one – precursor of putative bioisosteric colchicine analogues. *Mendeleev Communications*, 2014, 24 (6), 370–371.

#### Тезисы докладов на конференциях

- N.A. Zefirov**, E.V. Nurieva, A.V. Mamaeva, S.A. Kuznetsov, O.N. Zefirova. Tubuloclastin, its derivatives and analogues: structure – activity relationships. 3<sup>rd</sup> Russian Conference on Medicinal Chemistry. Kazan, September 28 – October 03, 2017. Abstract book. Kazan: Kazan Federal University, 2017, 280 pp. P. 26.
- Н.А. Зефир**ов, А.В. Мамаева, Е.В. Нуриева, Ю.К. Гришин, О.Н. Зефирова. Необычная реакция в ходе синтеза нестероидных миметиков 2-метоксиэстрадиола. VII Молодежная конференция ИОХ РАН: 17–18 мая 2017 г., Москва. Сборник тезисов докладов. М.: МАКС Пресс, 2017, С. 86.
- Н.А. Зефир**ов, И.В. Кузнецова, А.В. Мамаева, Е.В. Нуриева, О.Н. Зефирова. Синтез аналогов 2-метоксиэстрадиола на основе производных бицикло[3.3.1]нонана, аннелированного с гваяколом. Успехи синтеза и комплексообразования: тезисы докладов I Всероссийской молодежной школы-конференции, Москва, РУДН, 25–28 апреля 2016. С. 116.
- Н.А. Зефир**ов, Г.А. Шипунов, Ю.А. Пикулина, Е.В. Нуриева, О.Н. Зефирова. Синтез и тестирование аналогов тубулокластина с вариациями линкера и адамантановой группировки. Сборник материалов XXIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 11–14 апреля 2016). Тезисы докладов. Москва, Видокс, 2016, С. 177.

5. **Н.А. Зефир**ов, И.В. Кузнецова, А.А. Алексеев, Е.В. Нуриева, О.Н. Зефирова. Дизайн, синтез и биотестирование мостиковых и каркасных аналогов колхицина и 2-метоксиэстрадиола. Химия и технология растительных веществ: Тезисы докладов IX Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых (Москва, 28–30 сентября). Сыктывкар–Москва, 2015, Институт химии Коми НЦ УрО РАН, С. 64.
6. **N.A. Zefirov**, I.V. Kuznetsova, R.G. Safronova, T.P. Trofimova, A.V. Mamaeva, E.V. Nurieva, O.N. Zefirova. Examples of bridged fragments application in the structural design of tubulin ligands and nitric oxide synthase inhibitors. VI Международная конференция молодых ученых «Органическая химия сегодня» InterCYS-2014, Спб.: Издательство «ЛЕМА», 2014, С 106.
7. **Н.А. Зефир**ов, Д.В. Шишов, А.В. Мамаева, Е.В. Нуриева, О.Н. Зефирова. Синтез 5-гидрокси-4-метокситрицикло[7.3.1.0<sup>2,7</sup>]тридека-2,4,6-триен-8-она и кристаллическая структура его бензилированного производного. Всероссийская конференция «Современные достижения химии неопределенных соединений: алкинов, алкенов, аренов и гетероаренов». Санкт-Петербург. 26–28 марта 2014 г. СПб, Изд-во Политехнического университета. С 79.
8. **Н.А. Зефир**ов, Д.В. Шишов, А.В. Мамаева, Е.В. Нуриева, О.Н. Зефирова. Подходы к синтезу новых аналогов винбластина и колхицина. VI Молодежная конференция ИОХ РАН: 16–17 апреля 2014. Москва: Сборник тезисов докладов. М.: МАКС Пресс, 2014, С. 142–143.
9. **Н.А. Зефир**ов, Е.В. Нуриева, А.В. Мамаева, С.А. Кузнецов, О.Н. Зефирова. Цитотоксичные вещества с необычным эффектом на микротубулярную сеть. Сборник тезисов Первой Российской конференции по медицинской химии (MedChemRussia-2013, 8–12 сентября 2013 г.). Москва, 2013, С. 65.

Другие публикации по теме диссертации:

1. **N.A. Zefirov**, O.N. Zefirova. Heterocycles as classical and non-classical isosteric replacements of ring B in Combretastatin A-4. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2017, 53 (3), 273–280.
2. **Н.А. Зефир**ов, И.В. Кузнецова, А.А. Алексеев, Г.А.Шипунов, Ю.А.Пикулина, Е.В. Нуриева, О.Н.Зефирова. Аналоги N-(7-адамант-2-илокси-7-оксооктаноил)-N-дезацетилколхицина (тубулокластина) с вариациями линкера и каркасной группировки, *Российский биотерапевтический журнал*, 2016, 15 (1), 41–42.
3. И.В. Кузнецова, Г.А. Шипунов, Ю.А. Пикулина, **Н.А. Зефир**ов. Интерпретация соотношений «структура – цитотоксичность» для аналогов тубулокластина методом компьютерного моделирования. *Фармация*, 2016, 106–108.