



УДК 581.19+547.944.6.066:57.017

## С10-АМИНОПРОИЗВОДНЫЕ КОЛХИЦИНА: СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 1996 г. Н. А. Айтхожина<sup>#</sup>, Е. О. Есболаев, Т. А. Зубенко,  
К. А. Тойбаева, Л. А. Александрова\*

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина НАН РК, Алма-Ата

\* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117984, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 04.07.95 г.

Введение в молекулу колхицина аминных и аминокислотных заместителей вместо С10-метоксигруппы приводит к значительному снижению его токсичности при незначительном уменьшении тубулинсвязывающей активности, что открывает возможность получения слаботоксичных аналогов колхицина. Показана высокая биологическая активность N-колхицидилглицина и N-колхицидил-β-аланина.

*Ключевые слова:* тубулин; колхицин, аналоги.

Колхицин по механизму действия относится к митозным ядам, нарушающим расхождение хромосом [1, 2]. В результате связывания с субъединицами тубулина он ингибирует процесс образования микротрубочек [3–7]. Антимитотическое действие, результатом которого является нарушение пролиферации клеток, лежит в основе химиотерапии опухолей. Однако использование колхицина ограничено его высокой токсичностью. Поэтому получение его новых производных и изучение их свойств является актуальной проблемой и составляет важный этап для решения научно-практических задач. Рядом исследователей были осуществлены различные модификации молекулы колхицина, главным образом путем замены метоксигрупп кольца А и С10-метоксигруппы кольца С [8–11]. Нами ранее был синтезирован ряд С10-дезметокси-С10-аминокислотных производных колхицина [12]. Данные о биологических свойствах таких производных крайне ограничены.

Целью данного исследования является синтез amino- и аминокислотных производных колхицина и определение их биологической активности.

Для модификации была выбрана С10-метоксигруппа кольца С – наиболее реакционноспособный участок молекулы алкалоида.

Путем нуклеофильного замещения С10-метоксигруппы на аминогруппу и остатки этилендиамина, глицина, β-аланина, ε-аминокапроновой кислоты (схема) были получены следующие соединения: аминоколхицид (II) [13, 14], N-(β-аминоэтил)аминоколхицид (III), N-колхицидилгли-

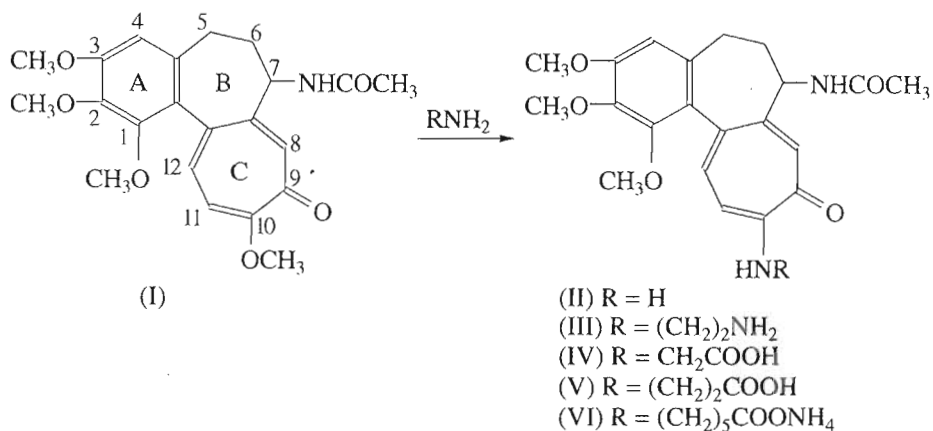
цин (IV), N-колхицидил-β-аланин (V), N-колхицидил-ε-аминокапроновая кислота (VI).

Аминоколхицид (II) получали при взаимодействии колхицина с метанольным раствором аммиака по методу, аналогичному описанному ранее [14]. Реакцию нуклеофильного замещения при получении N-колхицидиламинокислот (IV)–(VI) проводили в этаноле с 10-кратным избытком нуклеофильного компонента в присутствии избытка гидроксида натрия по методу [14] с некоторыми модификациями [12].

В основе молекулярного механизма действия колхицина лежит его способность к аффинному связыванию с тубулином. Нами был использован тубулин, выделенный из мозга крупного рогатого скота по модифицированному методу [15]. Аффинную специфичность колхицина и его производных изучали по связыванию с тубулином по методу [16]. Как видно из таблицы, препарат тубулина проявляет достаточную активность для изучения аффинной специфичности производных колхицина (связывание с колхицином составляет 91%). Наблюдаемая высокая степень связывания аминоколхицида (II) с тубулином из мозга крупного рогатого скота (85%) подтверждается данными работы [8] для тубулина, выделенного из мозга крыс. Как видно из таблицы, увеличение длины углеводородной цепи у С10-заместителя снижает степень связывания аминопроводных колхицина.

Цитотоксическую активность производных колхицина определяли по методу [17] на культуре клеток мышинной миеломы по включению [<sup>3</sup>H]тимидина (рисунок). Синтетические аналоги колхицина, кроме соединений (III), (V) и (VI), имели достаточно высокую активность в исследуемом

<sup>#</sup> Автор для переписки.



## Схема.

интервале концентраций. Для производных колхицина с карбоксильной группой наблюдается зависимость их цитотоксичности от длины C10-заместителя: увеличение углеводородной цепи приводило к снижению цитотоксичности (кривые 3, 4, 6).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При выполнении экспериментов использовали [<sup>3</sup>H]колхицин (5 Ки/ммоль, Amersham), [<sup>3</sup>H]тимидин (64 Ки/ммоль, отечественное производство), колхицин (Merck), Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, трис, EDTA, трансферрин и среду RPMI (Sigma), глицин, β-аланин (Reanal), дауэкс 50 WX 8 (Serva). Ход реакции и индивидуальность полученных соединений контролировали ТСХ на пластинках Alugram (Macherey-Nagel) в системах растворителей *n*-бутанол–уксусная кислота–вода, 4 : 1 : 1 (А) и хлороформ–этанол–25% водный аммиак, 90 : 9 : 1 (Б). Сыворотка новорожденного ягненка получена из КазНИВИ (Алма-Ата).

УФ-спектры регистрировали в этаноле на спектрофотометре Spesord M-40, спектры ядерного магнитного резонанса – на приборе Varian XL-100 в CD<sub>3</sub>OD с использованием гексаметилдисулфата

на в качестве внутреннего стандарта. Электрофорез осуществляли на бумаге Whatman 1 (Англия) в буферах с рН 2.5 и 7.5 (800 В; 22 В/см).

**Выделение тубулина из мозга крупного рогатого скота** проводили по методу [15, 16]. Белок разбавляли 10 мМ Na-фосфатным буфером (рН 7.0) до концентрации 20–25 мг/мл, определяемой по методу Бредфорда [18]. Препарат сохранял свою активность при –20°C в течение 2 нед. Гомогенность проверялась SDS-электрофорезом по Лэммли [19].

**Аминоколхицид (II).** К раствору 800 мг (2 ммоль) колхицина в 1 мл метанола прибавляли 2 мл насыщенного раствора аммиака в метаноле. Смесь кипятили в запаянной ампуле в течение 30 мин и оставляли при 37°C на 48 ч. Затем ампулу вскрывали, метанол отгоняли под вакуумом. Сухой остаток растворяли в 1 мл хлороформа и наносили на колонку (2.5 × 7 см) с нейтральной Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Reanal, Венгрия), колхицин элюировали хлороформом, продукт реакции (II) элюировали смесью хлороформ–этанол, 9 : 1. Растворитель упаривали, остаток растирали в сухом эфире, отфильтровывали и сушили в вакууме при 40°C. Получили 654 мг (85%) аминоколхицида (II) в виде светло-

Цитотоксичность, токсичность *in vivo* и тубулинсвязывающая активность колхицина и его C10-аминопроизводных

Соединение	ID <sub>50</sub> , М*	Связывание с тубулином, %	Токсичность, LD <sub>50</sub> , мг/кг**
(I) Колхицин	1.8 × 10 <sup>-8</sup>	91	3 [9]
(II) Аминоколхицид	0.9 × 10 <sup>-7</sup>	85	40 [15]
(III) N-(β-Аминоэтил)аминоколхицид	2.2 × 10 <sup>-6</sup>	68	265
(IV) N-Колхицидилглицин	0.6 × 10 <sup>-7</sup>	82	75
(V) N-Колхицидил-β-аланин	0.58 × 10 <sup>-6</sup>	77	200
(VI) N-Колхицидил-ε-аминокапроновая кислота	2.3 × 10 <sup>-5</sup>	61	240

\* ID<sub>50</sub> – концентрация испытуемого препарата, которая вызывает 50% ингибирование пролиферации клеток в системе *in vitro*.

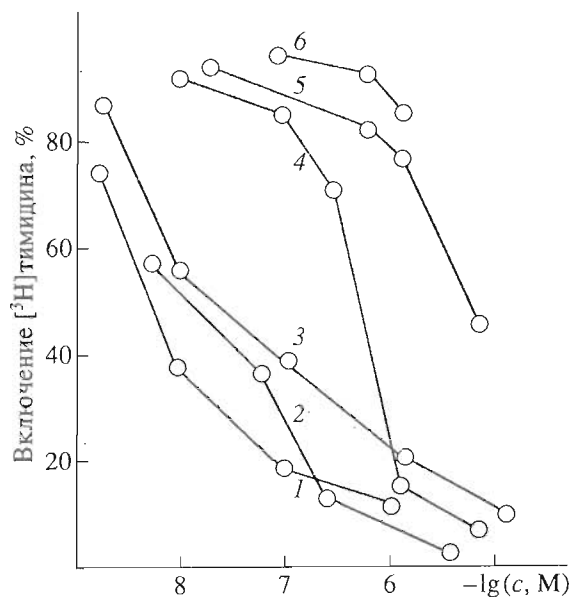
\*\* LD<sub>50</sub> – доза препарата, которая вызывает 50% гибель животных.

желтого порошка.  $R_f$  0.38 (Б). УФ-спектр,  $\lambda_{\max}$  (lg $\epsilon$ ) (MeOH, pH 7): 251 (4.51), 354 (4.29) и 409 нм (4.09).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 2.16с (3H, Ac), 2.34м (2H, H-6), 2.63м (2H, H-5), 3.71с (3H, 1-OCH<sub>3</sub>), 4.02с (3H, 2-OCH<sub>3</sub>), 4.04с (3H, 3-OCH<sub>3</sub>), 4.64м (1H, H-7), 6.73–7.59м (4H, H-4, H-8, H-11, H-12).

**N-( $\beta$ -Аминоэтил)аминоколхицид (III).** К раствору 800 мг (2 ммоль) колхицина в 3 мл этанола прибавляли 650 мкл (10 ммоль) свежеперегнанного этилендиамина. Смесь нагревали в запаянной ампуле при 100°C в течение 20 мин и оставляли при комнатной температуре на 18 ч. Затем ампулу вскрывали, этанол отгоняли под вакуумом. Сухой остаток растворяли в 1 мл хлороформа и наносили на колонку (1.6  $\times$  20 см) с силикагелем L40/100 (Chemapol), колхицин элюировали хлороформом, продукт реакции (III) элюировали смесью хлороформ–этанол, 9 : 1. Растворитель упаривали, остаток растирали в сухом эфире, отфильтровывали и сушили в вакууме при 40°C. Получили 317 мг (37%) **N-( $\beta$ -аминоэтил)аминоколхицида (III)** в виде светло-желтого порошка.  $R_f$  0.1 (Б). УФ-спектр  $\lambda_{\max}$  (lg $\epsilon$ ) (MeOH, pH 7): 252 (4.51), 355 (4.38) и 409 нм (4.17).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 2.16с (3H, Ac), 2.34м (2H, H-6), 2.63м (2H, H-5), 3.15м (2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.80м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.71с (3H, 1-OCH<sub>3</sub>), 4.02с (3H, 2-OCH<sub>3</sub>), 4.04с (3H, 3-OCH<sub>3</sub>), 4.63м (1H, H-7), 6.75–7.57м (4H, H-4, H-8, H-11, H-12). Электрофоретическая подвижность (pH 2.5) относительно пикриновой кислоты  $E_{\text{pic}} = -0.52$ .

**N-Колхицидилглицин (IV).** К раствору 800 мг (2 ммоль) колхицина в 1 мл этанола прибавляли 1.5 г (20.0 ммоль) глицина в 2 мл 10 М раствора NaOH. Реакционную смесь кипятили в течение 5 ч, затем оставляли на 16 ч при 20°C. Ход реакции контролировали по ТСХ в системе А. Растворители упаривали, к остатку прибавляли 2 мл воды и колхицин экстрагировали хлороформом (3  $\times$  1 мл). Водную фазу подкисляли прибавлением 1 М HCl до появления желтого смолистого осадка (pH 6.5) и экстрагировали хлороформом (5  $\times$  3 мл) до исчезновения желтой окраски водной фазы. Хлороформный экстракт промывали водой (3  $\times$  2 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток растирали в сухом эфире, отфильтровывали и сушили в вакууме. Получили 620 мг (69%) **N-колхицидилглицина (IV)** в виде желтого аморфного вещества.  $R_f$  0.61 (А) и 0.05 (Б). УФ-спектр,  $\lambda_{\max}$  (lg $\epsilon$ ): 250 (4.53), 354 (4.36) и 409 нм (4.19).  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\delta$ , м. д.): 2.16с (3H, Ac), 2.34м (2H, H-6), 2.67м (2H, H-5), 3.71с (3H, 1-OCH<sub>3</sub>), 4.02с (3H, 2-OCH<sub>3</sub>), 4.04с (3H, 3-OCH<sub>3</sub>), 4.31с (2H, CH<sub>2</sub>COOH), 4.67м (1H, H-7), 6.70–7.52м (4H, H-4, H-8, H-11, H-12).  $E_{\text{pic}} +0.53$  (pH 7.5).

**N-Колхицидил- $\beta$ -аланин (V)** был получен по методу, описанному выше для соединения (IV). Выход 64%.  $R_f$  0.68 (А) и 0.05 (Б). УФ-спектр,  $\lambda_{\max}$



Цитотоксичность колхицина и его C10-аминопроизводных при испытаниях на клетках мышьяковой миеломы X63A8-653: 1 – колхицин (I), 2 – аминоколхицид (II), 3 – N-колхицидилглицин (IV), 4 – N-колхицидил- $\beta$ -аланин (V), 5 – N-( $\beta$ -аминоэтил)аминоколхицид (III), 6 – N-колхицидил- $\epsilon$ -аминокапроновая кислота (VI).

(lg $\epsilon$ ): 251 (4.43), 355 (4.24) и 409 нм (4.12).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 2.17м (3H, Ac), 2.29м (2H, CH<sub>2</sub>COOH), 2.35м (2H, H-6), 2.64м (2H, H-5), 3.71с (3H, 1-OCH<sub>3</sub>), 3.75м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.02с (3H, 2-OCH<sub>3</sub>), 4.04с (3H, 3-OCH<sub>3</sub>), 4.63м (1H, H-7), 6.78–7.54м (4H, H-4, H-8, H-11, H-12).  $E_{\text{pic}} +0.51$  (pH 7.5).

**N-Колхицидил- $\epsilon$ -аминокапроновая кислота, аммониевая соль (VI).** К раствору 2 г (5 ммоль) колхицина в 5 мл этанола прибавляли 2.6 г (19.85 ммоль)  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты, растворенной в 20 мл воды. К реакционной смеси при перемешивании прибавляли 1.4 мл 4 М NaOH и продолжали перемешивание при 20°C в течение 24 ч. Продукт (VI) очищали ионообменной хроматографией на колонке (1  $\times$  4 см) с дауэксом (OH<sup>-</sup>). Избыток колхицина удаляли 10% водным раствором этанола. Продукт реакции элюировали 0.2 М бикарбонатом аммония в 50% водном этаноле. Фракции, содержащие продукт (VI), упаривали, соупаривали с водой и спиртом. Получили 1.73 г (67%) **N-колхицидил- $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты, аммониевой соли (VI)** в виде светло-желтого аморфного вещества.  $R_f$  0.80 (А) и 0.03 (Б). УФ-спектр,  $\lambda_{\max}$  (lg $\epsilon$ ): 252 (4.45), 355 (4.28) и 409 нм (4.03).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 1.15–1.61м (6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 2.16м (3H, Ac), 2.29м (2H, CH<sub>2</sub>COOH), 2.33м (2H, H-6), 2.66м (2H, H-5), 3.75м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.71с (3H, 1-OCH<sub>3</sub>), 4.02с (3H, 2-OCH<sub>3</sub>), 4.04с (3H, 3-OCH<sub>3</sub>), 4.62м (1H, H-7), 6.79–7.56м (4H, H-4, H-8, H-11, H-12).  $E_{\text{pic}} +0.49$  (pH 7.5).



Тубулинсвязывающая активность соединений (I)–(VI) определялась по методу [16].

Цитотоксическую активность [17] исследовали на клетках мышинной миеломы, полученных из НПО "Вектор" (пос. Кольцово Новосибирской обл.).

**Определение цитотоксичности C10-производных колхицина (II)–(VI).** Клетки мышинной миеломы X63A8-653 культивировали в среде RPMI 1641 (Sigma) с добавлением 10% сыворотки новорожденных ягнят при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Суспензию клеток с плотностью 100000 кл/мл рассевали в 96-луночные стерильные планшеты (Limbro, Англия) по 200 мкл в лунку. Растворы исследуемых соединений объемом не более 50 мкл вносили в конечных концентрациях, указанных на рисунке. Инкубирование вели 3 сут при тех же условиях. За 4 ч до окончания культивирования в тест-культуру вносили по 0.01 мл раствора [<sup>3</sup>H]тимидина с общей активностью 1 мкКи на лунку. По окончании времени инкубации суспензию клеток переносили на фильтры GF/C (Whatman) и после промывки 5% трихлоруксусной кислотой и этанолом определяли радиоактивность.

Для определения токсичности *in vivo* были использованы 18-граммовые мыши. Токсичность (LD<sub>50</sub>) вычисляли по формуле

$$LD_{50} = \frac{\sum [(a+b)(m-n)]}{200},$$

где *a* и *b* – величины смежных доз, *m* и *n* – соответствующие этим дозам частоты смертельных исходов в процентах [20]. Для вычисления LD<sub>50</sub> в одном эксперименте использовано 6 мышей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller B.M., Adler I.C. // *Mutagenesis*. 1989. V. 4. P. 200–215.
2. Hashemi A., Estila A., Waines J.G. // *Genome*. 1989. V. 32. P. 1100–1104.
3. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рефф М., Робертс К., Уотсон Д. // Молекулярная биология клетки. Т. 2. М.: Мир, 1994. С. 254–337.
4. Andreu J.M., Timasheff S. // *Biochemistry*. 1982. V. 21. P. 534–543.
5. Andreu J.M., Timasheff S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. P. 6753–6756.
6. Serrano L., Avila J., Maccioni R. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 6607–6611.
7. Fernando D.L., Jose A.M. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 2890–2896.
8. Capraro H.G., Brossi A. // *The Alkaloids*. V. 23 / Ed. A. Brossi. N.Y.: Acad. Press. Inc., 1984. P. 1–70.
9. Киселев В.В. // *Химия природ. соединений*. 1977. С. 3–13.
10. Dumont R., Brossi A., Chignell C.F., Quinn F.R. // *J. Med. Chem.* 1987. V. 30. P. 732–735.
11. Kerekes P., Sharma P.N., Brossi A., Chignell C.F., Quinn F.R. // *J. Med. Chem.* 1985. V. 28. P. 1204–1208.
12. Есболаев Е.О., Айтхожина Н.А., Александрова Л.А. // *Химия природ. соединений*. 1989. С. 91–95.
13. Киселев В.В. // *Журн. общ. химии*. 1960. Т. 30. С. 3721–3725.
14. Киселев В.В. // *Журн. общ. химии*. 1961. Т. 31. С. 334–336.
15. Lacey E., Snowdon K.L. // *J. Chromatogr.* 1990. V. 525. P. 71–84.
16. Zweig M.H., Chignell C.F. // *Biochem. Pharmacol.* 1973. V. 22. P. 2141–2150.
17. Friscker S.P., Mudy G.R. // *Biochem. Soc. Trans.* 1986. V. 14. P. 693–694.
18. Bredford M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
19. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
20. Кудрин А.Н., Пономарева Г.Т. *Применение математики в экспериментальной и клинической медицине*. М.: Медицина, 1967.

## 10-Amino Analogs of Colchicine: Synthesis, Structure, and Biological Activity

N. A. Aitkhozhina\*,<sup>1</sup> E. O. Esbolaev\*, T. A. Zubenko\*,  
K. A. Toibaeva\*, and L. A. Aleksandrova\*\*

\* Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry,  
National Academy of Sciences of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan

\*\* Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,  
ul. Vavilova 32, Moscow, GSP-1, 117984 Russia

**Abstract**—Replacement of the 10-methoxy group of colchicine by amino and amino acid substituents sharply decreased its toxicity and only slightly decreased its tubulin-binding activity, and thus, gave rise to a number of weakly toxic colchicine analogs. In particular, highly active 10-(*N*-glycino)-10-demethoxycolchicine and 10-[*N*-(β-alanino)]-10-demethoxycolchicine were prepared.

*Key words:* tubulin; colchicine, analogs.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.