



УДК 577.182.4'17 + 615.33.012.1

ПРОИЗВОДНЫЕ ДАУНОРУБИЦИНА, СОДЕРЖАЩИЕ
ФРАГМЕНТ ИНОЗИНА

Олсуфьева Е. Н., Тодорова Н. П., Ярцева И. В.*,
Розынов В. В.**, Шепелевцева Н. Г., Преображенская М. Н.

Всесоюзный научно-исследовательский институт по изысканию
новых антибиотиков Академии медицинских наук СССР, Москва;

*Всесоюзный онкологический научный центр Академии медицинских
наук СССР, Москва;

**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук
СССР, Москва

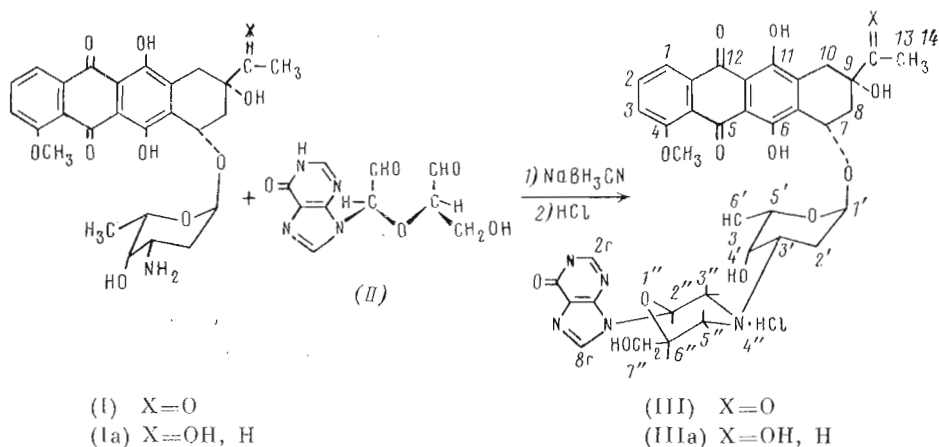
Конденсацией даунорубидина или его (13*R*, *S*)-дигидропроизводного с инозин-диальдегидом в присутствии цианборгидрида натрия получены новые производные антрациклиновых антибиотиков, содержащие фрагмент инозина: 3'-дезамино-3'-[(2''*R*)-(гипоксантил-9)-(6''*S*)-гидроксиметилморфолино-N^{4''}]-даунорубидин и (13*R*, *S*)-дигидро-3'-дезамино-[(2''*R*)-(гипоксантил-9)-(6''*S*)-гидроксиметилморфолино-N^{4''}]-даунорубидин. Соединения неактивны в отношении бактерии *Bacillus mycoides* и обнаруживают снижение цитостатической активности *in vitro* и острой токсичности *in vivo* по сравнению с исходными антибиотиками.

В литературе описаны производные противоопухолевого антибиотика даунорубидина (I) (синонимы — рубомицин, дауномицин) и его аналогов, которые содержат вместо аминокетильной группы в кольце даунозамина цикл морфолина. Эти соединения получены восстановительным алкилированием аминокетильной группы углеводного остатка антибиотиков соответствующими кислотородсодержащими диальдегидами, при этом атом азота даунозамина включается в морфолиновое кольцо [1]. Некоторые морфолинсодержащие производные антрациклиновых антибиотиков (особенно с CN-группой в положении 3'') обладают высокой противоопухолевой активностью, при этом активны в гораздо более низких концентрациях и менее кардиотоксичны.

В настоящей работе мы изучили такие морфолинсодержащие аналоги даунорубидина и его 13-дигидропроизводного, которые содержат фрагмент нуклеозида, рассчитывая на существенные изменения их фармакологических свойств. Важно отметить, что многие 13-дигидропроизводные антрациклиновых антибиотиков проявляют высокую противоопухолевую активность. В частности, 13-дигидродаунорубидин (Ia) (дуборимицин) испытывался в клинике [2].

Для построения морфолинового кольца нами был использован инозин-диальдегид (II) [3]. При взаимодействии последнего с даунорубидином (I) в присутствии цианборгидрида натрия был получен 3'-дезамино-3'-[(2''*R*)-(гипоксантил-9)-(6''*S*)-гидроксиметилморфолино-N^{4''}]-даунорубидин (III) с выходом 50%. Побочной реакцией является восстановление 13-СО-группы в агликоне, причем (13*R*, *S*)-дигидро-3'-дезамино-3'-[(2''*R*)-(гипоксантил-9)-(6''*S*)-гидроксиметилморфолино-N^{4''}]-даунорубидин (IIIa) образуется с выходом 19%. Из (13*R*, *S*)-дигидродаунорубидина (Ia) [4] соединение (IIIa) может быть приготовлено в тех же условиях с выходом 61%.

Заключение о нестереоспецифичности восстановления 13-СО-группы было сделано на основании спектров ¹H-ЯМР (уширение сигналов за счет наложения спектров двух эпимеров). Спектры ¹H-ЯМР соединений (III) и (IIIa) содержат все элементы предполагаемой для них структуры. Введение морфолинового цикла в положение 3'-даунозамина при образовании соединений (III) и (IIIa) практически не влияет на положение и форму



сигналов протонов, соответствующих остатку антибиотика, а следовательно, не влияет на конформационные свойства агликона и углеводного остатка. Возникающий морфolinoвый цикл имеет кресловидную конформацию (0C_N), при которой протон H-2'' занимает аксиальное положение ($J_{2''3''} 10,4$ Гц). А поскольку из инозина получен индивидуальный замещенный морфolinoдаунорубицин (III), центру 2'' можно приписать R-, а центру 6''—S-конфигурацию.

В масс-спектрах исследованных соединений (II) и (IIIa) присутствуют пики ионов $(M + H)^+$ с m/z 762 и 764 и ионов $(M + 3H)^+$ с m/z 764 и 766 соответственно. Появление ионов восстановленных соединений (m/z 764 и 766), по-видимому, обусловлено образованием соответствующих гидрохинонов в условиях вторично-эмиссионной масс-спектрометрии с применением жидкого матрикса [5].

Производные (III) и (IIIa) в виде гидрохлоридов хорошо растворимы в воде и более устойчивы при кислых значениях pH (0,1 н. HCl, 40° С, 24 ч) в сравнении с исходными антибиотиками.

Биологическую активность гидрохлоридов (III) и (IIIa) исследовали в нескольких тест-системах. Введение заместителей приводит к потере антибактериальной активности (*Bacillus mycoides*), снижению цитостатической активности (первичная суспензия опухолевых клеток NK/Ly) на 2 порядка (4—5 мкг/мл при 0,05 мкг/мл для (I)) и уменьшению токсичности при внутривенном введении мышам (LD₅₀ для (III), (IIIa), (I) — >0,2; >1,0; 0,02 г/кг соответственно).

В литературе имеются данные о биологической активности близкого аналога — 3'-дезамино-3'-(2''-метокси-6''-гидроксиметилморфolino-N⁴'')-даунорубидина, отличающегося от соединения (III) тем, что у него вместо экваториальной группировки гипоксантина находится аксиальная метоксигруппа. Этот аналог подавляет рост опухолевых клеток в культуре HeLa и проявляет токсический эффект в концентрациях, близких соответствующим величинам для даунорубидина [6].

Дальнейшие исследования производных антрациклиновых антибиотиков с различными нуклеозиддиальдегидами помогут ответить на вопрос, какое влияние имеет характер заместителя и конфигурация центров 2'' и 6'' на биологическую активность замещенных морфolinoантрациклинов.

Экспериментальная часть

Для изучения полученных веществ методом ТСХ использовали готовые пластинки с кизельгелем G-60 фирмы Merck (толщина слоя 0,2 мм) в смесях растворителей: хлороформ — метанол — вода, 60 : 15 : 10 (А) и хлороформ — бензол — метанол, 10 : 1 : 1 (Б). После нанесения вещества пластинку выдерживали в парах аммиака 10 с. Оптическое вращение образцов изучали на поляриметре Perkin—Elmer-241 (Швеция). Спектры УФ и видимой области получены на приборе фирмы Beckman (Австрия).

ИК-спектры снимали в таблетке КВг на спектрофотометре (Pye-Unicam, Великобритания), масс-спектры — на приборе MS-50TC (Kratos, Великобритания) методом бомбардировки помещенных в глицериновую матрицу веществ пучками ускоренных атомов Хе с энергией 8 кэВ. ^1H -ЯМР-спектры получали на спектрометре (Bruker WH-360) с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта в режиме квадратурного фазового детектирования. Для отнесения сигналов использовали методику двойного гомоядерного резонанса. Объем использованной памяти составляет 32 К-точек, время сбора данных в одном скане 4,096 с.

3'-Дезамино-3'-[(2''R)-(гипоксантил-9)-(6''S)-гидроксиметилморфолино- $N^{4''}$]даунорубицин, гидрохлорид (III). К раствору 0,14 г (0,30 ммоль) гидрохлорида даунорубина (I) в смеси 30 мл ацетонитрил — вода (1 : 1) прибавляли при перемешивании 1,30 г (5,20 ммоль) инозиндиальдегида (II), 0,04 г (0,65 ммоль) цианборгидрида натрия и раствор перемешивали 3 ч при 20° С. Затем прибавляли раствор бикарбоната натрия. Из раствора удаляли агликоны экстракцией хлороформом. Осадок, выпавший на разделе фаз, отделяли и хроматографировали на колонке с кизельгелем G-60 Merck (300—400 меш) в системе хлороформ — метанол — вода (13 : 6 : 1). Фракции, содержащие целевое соединение (III), упаривали досуха; выход 0,13 г (50%), т. пл. 174—176° С (разл.), $R_f = 0,68$ (А), 0,42 (Б). $[\alpha]_D^{22} + 100^\circ$ (с 0,05, вода), спектр УФ и видимой области (H_2O), $\lambda_{\text{макс}}$, (ε): 234 (34 300), 242 (7100), 492 (8214). ИК-спектр, см^{-1} : 1705 широкая (COCH_3 , гипоксантин), 1620 и 1590 (СО хинов). ^1H -ЯМР-спектр ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}-d_5$), δ, м. д. (J , Гц): 8,39 (1H, с, H_T-2); 8,38 (1H, с, H_T-8); 8,02 (1H, д, J 7,8, H-1); 7,72 (1H, т, J 7,8, H-2); 7,42 (1H, д, J 7,8, H-3); 6,18 (1H, дд, J_{aa} 10,4, J_{ae} 2,5, H-2''); 5,88 (1H, с, H-1'); 5,44 (1H, м, H-7); 4,66 (1H, м, J_1 6,2, J_2 1,6, H-5'); 4,25 (1H, м, H-6''); 4,11 (1H, м, H-4'); 3,96 (3H, с, OCH_3); 3,91 (1H, м, H-7''); 3,85 (1H, м, H-7''); 3,59 (1H, м, J_1 10,4, J_2 1,0, H-3''); 3,56 (1H, д, $J_{\text{гем}}$ 18,0, H-10_e); 3,47 (1H, д, $J_{\text{гем}}$ 11,9, H-5''); 3,40 (1H, д, $J_{\text{гем}}$ 18,0, H-10_a); 3,19 (1H, д, J_{aa} 12,5, H-3'); 3,03 (1H, т, J 10,4, H-3''); 2,83 (1H, дд, $J_{\text{гем}}$ 14,7, J_2 1,5, H-8_e); 2,62 (1H, м, H-5''); 2,53 (3H, с, COCH_3); 2,53 (1H, м, H-2''); 2,45 (1H, дд, $J_{\text{гем}}$ 14,7, J_2 4,1, H-8_a); 2,23 (1H, дд, $J_{\text{гем}}$ 12,5, H-2''); 1,57 (3H, д, J 6,5, H-3-6'). Найдено, %: N 7,62; Cl 3,76. $\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{13} \cdot \text{HCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: N 7,88; Cl 3,88.

(13R, S)-Дигидро-3'-дезамино-3'-[(2''R)-(гипоксантил-9)-(6''S)-гидроксиметилморфолино- $N^{4''}$]даунорубицин, гидрохлорид (IIIa). а. Получали как побочную фракцию при очистке хроматографированием на колонке соединения (III), выход 19%, т. пл. 155—160° С (разл.), R_f 0,61 (А), 0,33 (Б). $[\alpha]_D^{22} + 26^\circ$ (с 0,05, вода). Спектр УФ- и видимой области (H_2O), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ε): 235 (31 820), 244 (26 700), 286 (6900), 491 (7570). ИК-спектр, см^{-1} (КВг): 1705 широкая (гипоксантин), 1620 и 1590 (СО хинов). ^1H -ЯМР-спектр ($\text{DMSO}-d_6$), δ, м. д. (J , Гц): 14,02 (1H, с) и 13,21 (1H, с) — 6-ОН и 11-ОН; 12,49 (1H, с, HNCO -гипоксантина); 8,24 (1H, с, H_T-2); 8,08 (1H, с, H_T-8); 7,88 (1H, т, J 7,8, H-2); 7,85 (1H, д, J 7,8, H-3); 7,61 (1H, д, J 7,8, H-4); 6,13 (1H, м, H-2''); 5,43 (1H, с, H-1'); 4,99 (1H, м, H-7); 4,15 (1H, кв, H-5'); 3,97 (3H, с, OCH_3), 3,95—3,00 (H_2O); 2,6—2,4 (DMSO); 2,22 (1H, дд, H-8_e); 2,07 (1H, м, 2-H''); 2,00 (1H, дд, H-8_a); 1,87 (1H, м, H-2''); 1,17 (6H, 2д, J 6,5, H-3-6' и H-3-14). Найдено, %: N 7,86; Cl 3,86. $\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_{13} \cdot \text{HCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: N 7,87; Cl 3,98.

б. К раствору 1,00 г (1,80 ммоль) гидрохлорида (13-*R, S*)-дигидродаунорубина (Ia) в 100 мл смеси ацетонитрил — вода (1 : 1) прибавляли при перемешивании 5,00 г (20,00 ммоль) инозиндиальдегида (II), 0,20 г (3,28 ммоль) цианборгидрида натрия, раствор перемешивали 16 ч, затем прибавляли 100 мл воды и образующиеся агликоны отделяли экстракцией хлороформом. Водный слой экстрагировали *n*-бутанолом. Органические слои объединяли, избыток инозиндиальдегида (II) удаляли многократной экстракцией насыщенным раствором Na_2SO_4 . Бутанольный раствор сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали досуха. Остаток раст-

воряли в 50 мл воды, подкисляли 0,5 н. HCl и целевое соединение (IIIa) осаждали добавлением 300 мл ацетона. Осадок фильтровали, промывали ацетоном и еще раз переосаждали из воды ацетоном; выход 0,96 г (61%), т. пл. 153—159° С (разл.), R_f 0,61 (А), 0,33 (Б).

Цитостатическое действие производных было изучено на первичных суспендированных культурах опухолевых клеток НК/Лу по методике [7]. Результаты получены сотрудником ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР О. В. Леонтьевой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mosher C. W., Wu H. Y., Fujiwara A. N., Acton E. M. // J. Med. Chem. 1982. V. 25. P. 18—24.
2. Jolles G., Maral R., Messer M. // Abstr. 9th Intern. Congr. on Chemoterapy. L., 1975. P. 65.
3. Брусенцов И. А., Бухман В. М., Белицкий Г. А., Славина Е. Г., Лейпунская И. Л., Кикоть Б. С., Преображенская М. Н. // Хим.-фармацевт. журн. 1980. № 3. С. 5—14.
4. Олсуфьева Е. П., Поваров Л. С., Потапова И. П. // Антибиотики. 1982. Т. 27. С. 488—492.
5. Dass C., Seshadri R., Israel M., Desiderio D. M. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1988. V. 17. P. 37—45.
6. Патент ФРГ, 3609052 А1.
7. Иваницкая Л. П., Макухо Л. В. // Вопр. онкологии. 1973. Т. 19. № 5. С. 656—662.

Поступила в редакцию
20.I.1989

После доработки
16.III.1989

DAUNORUBICIN DERIVATIVES CONTAINING INOSINE RESIDUE

OLSUFYEVA E. N., TODORGVA N. P., YARTSEVA I. V.*, ROZINOV B. V.**,
SHEPELEVTEVA N. G., PREOBRAZHENSKAYA M. N.

*Institute of New Antibiotics, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow:*

* *All-Union Cancer Research Centre, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow:*

** *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Condensation of daunorubicin or its (13 *R*, *S*)-dihydroderivative with inosinedialdehyde in the presence of NaBH₃CN yielded novel derivatives of anthracycline antibiotics with incorporated inosine residue: 3'-deamino-3'-[(2''*R*)-(hypoxantyl-9)-(6''*S*)-hydroxymethylmorpholino-N^{1''}]-daunorubicin and (13 *R*, *S*)-dihydro-3'-deamino-3'-[(2''*R*)-(hypoxantyl-9)-(6''*S*)-hydroxymethylmorpholino-N^{4''}]-daunorubicin. The compounds did not inhibit growth of *Bacillus mycoides* and were less cytotoxic in vitro and less toxic in vivo than the parent antibiotics.