



УДК 577.182.4'

14-О-ГЕМИЭФИРЫ И 13-ГИДРАЗОНЫ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ РЯДА ДАУНОРУБИЦИНА. СИНТЕЗ И ЦИТОСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИЛИ УСТОЙЧИВЫХ К ДОКСОРУБИЦИНУ

© 1995 г. Л. С. Поваров, О. В. Леонтьева, Р. Дж. Бернаки*,
Е. Н. Олсуфьева, Е. И. Салимова, П. Пера*, М. Н. Преображенская#

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков РАМН,
119867, Москва, Б. Пироговская, 11;

* Центр раковых лекарств Грейс. Онкологический институт Росвелла Парка

Поступила в редакцию 28.02.95 г.

Исходя из 14-бромпроизводных даунорубицина и карминомицина и моносодовых солей адипиновой и пимелиновой кислот получены 14-О-гемиадипинаты и 14-О-гемипимелаты доксорубицина и 14-гидроксикарминомицина, а на их основе соответствующие N-трифторацетилированные соединения. Получены 13-(4-метилпиперазин-1-ил)аминопроизводные антрациклиновых антибиотиков. Исследована цитостатическая активность соединений на панели линий опухолевых клеток человека и животных, чувствительных или резистентных к доксорубицину. 14-О-Гемиадипинаты и 14-О-гемипимелаты доксорубицина и 14-гидроксикарминомицина продемонстрировали высокую активность в отношении опухолевых клеток, резистентных к доксорубицину. N-Трифторацетилирование антибиотиков привело к снижению цитостатической активности. Водорастворимые 13-(4-метилпиперазин-1-ил)аминопроизводные близки по активности соответствующим исходным антибиотикам.

Ключевые слова: антрациклиновые антибиотики, множественная лекарственная устойчивость.

Антрациклиновые антибиотики – даунорубицин (I), доксорубицин (адриамицин) (II) и карминомицин (III) – эффективные противоопухолевые препараты, широко применяемые в современной химиотерапии рака. Их клиническое применение, однако, ограничено из-за побочных токсических эффектов и “врожденной” или приобретенной опухолевыми клетками множественной лекарственной устойчивости (MDR – multidrug resistance) [1]. Некоторые опухоли, например карцинома кишечника, простаты и немелкоклеточный рак легкого, изначально нечувствительны к лечению антрациклиновыми антибиотиками [2]. MDR характеризуется развитием устойчивости не только к используемому препарату, но и к большому ряду структурно различных противоопухолевых веществ [3]. MDR опухолевых клеток определяется присутствием в них транспортного белка, называемого Р-гликопротеином, или Р170, который кодируется у человека геном MDR1 [2]. Этот белок-переносчик использует энергию АТФ для выведе-

ния из клетки различных веществ [4]. Известны два подхода к преодолению множественной лекарственной устойчивости. Один из них основан на использовании веществ – модуляторов MDR, вызывающих снижение эффективности системы вывода веществ из клетки и тем самым способствующих накоплению препаратов в резистентных опухолевых клетках [5]. Другой подход основан на использовании таких производных противоопухолевых препаратов, которые не являются субстратами для Р170 и сохраняют активность в отношении клеток с фенотипом MDR. В настоящее время известно несколько антрациклиновых производных, активных в отношении резистентных клеток и опухолей в эксперименте [6, 7]. Некоторые из них проходят клинические испытания [8, 9].

В нашей программе поиска антрациклиновых препаратов нового поколения, преодолевающих MDR, исследованы новые 14-О-, 13- и 3'-N-производные антрациклиновых антибиотиков даунорубицина (I), доксорубицина (II), карминомицина (III)

Автор для переписки.

Таблица 1. Физико-химические свойства и выходы полученных соединений

Соединение	Т. пл., °С	Выход, %	$[\alpha]_D^{20}$, град	Эмпирическая формула*, M_r	ИК-спектр, ν , см^{-1}	R_f (система)
(VII)	198 - 200	53	+215 (с 0.05; 0.02 н. HCl в MeOH)	$\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{NO}_{14} \cdot 3\text{H}_2\text{O}^{2*}$, 725.7	3850, 1740, 1630, 1590	
(IX)	—	48	+140 (с 0.05; 0.02 н. HCl в DMSO)	$\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{NO}_{14}^{3*}$, 657.6	3450, 1740, 1610	
(XII)	119 - 120	80	+225 (с 0.05; MeOH)	$\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{NO}_{14} \cdot \text{HCl}$, 722.1	3450, 1740, 1630, 1580	0.53 (А)
(XIV)	144 - 146	75		$\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{NO}_{14} \cdot \text{HCl}$, 707.5	3460, 1730, 1680, 1610	0.49 (А)
(XVII)	153 - 155	44	+245 (с 0.05; MeOH)	$\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{NO}_{15}\text{F}_3$, 753.6	3450, 1725, 1680, 1610	0.41 (Б)
(XVIII)	143 - 145	65		$\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{NO}_{15}\text{F}_3$, 767.0		0.47 (Б)
(XX)	146 - 147	72	+167 (с 0.1; EtOH)	$\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{NO}_{11}\text{F}_3$, 609.5	3500, 1725, 1610	0.51 (Б)
(XXI)	87 - 89	65	+183 (с 0.1; MeOH)	$\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{F}_3 \cdot \text{HCl}$, 757.2	3450, 1720, 1640 (пл.), 1620, 1580	0.34 (А)
(XXII)	108 - 110	56	+126 (с 0.05; MeOH)	$\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{F}_3 \cdot \text{HCl}$, 743.2	3480, 1720, 1660 (пл.), 1610	0.38 (А)

* Для всех соединений получены данные микроанализа на С, Н, N, F, Cl, которые отличались от вычисленных не более чем на 0.4%.

2* FABMS (m/z): 672 [M]⁺, 673 [$M + H$]⁺, 674 [$M + 2H$]⁺.

3* FABMS (m/z): 657 [M]⁺, 658 [$M + H$]⁺, 659 [$M + 2H$]⁺.

при трансформации 3-формилрифамицина SV в рифампицин [15]. Мы получили N-трифторацетилпроизводные даунорубицина, доксорубицина и карминомицина (XIX), (XXIII) и (XX). Трифторацетильные производные (XIX) и (XX) взаимодействуют с 1-амино-4-метилпиперазином превратили в соответствующие 13-(4-метилпиперазин-1-ил)иминопроизводные (XXI) и (XXII), выделенные в виде растворимых в воде хлоргидратов (схема 2). Вследствие низкой растворимости 14-гидроксикарминомицина (IV) его N-трифторацетилирование не удалось провести.

Ингибирование роста опухолевых клеток полученными соединениями изучалось в сравнении с исходными антибиотиками (I) - (IV) на панели линий опухолевых клеток человека и животных, включавшей следующие культуры клеток: рака молочной железы человека MCF7/S и ее резистентной сублинии MCF7/Dox; рака толстого кишечника человека HT29; аденокарциномы легкого человека A549; карциномы яичника человека A121; лимфоцитарного лейкоза мышей P388/S и резистентной к доксорубину сублинии P388/Dox. Резистентные линии MCF7/Dox и P388/Dox обладали фенотипом MDR, поскольку проявляли устойчивость к противоопухолевым веществам различного химического строения, например к винкристину и колхицину (данные не показаны), и, по результатам проточной цитометрии, оказались Р-гликопротеинположительными [16].

В табл. 2 приведены данные биологической оценки *in vitro* полученных соединений. Наиболее чувствительной к этим соединениям оказалась клеточная линия A121, за ней следовали P388 и

A549. Менее чувствительной была карцинома толстого кишечника человека HT29. Как и следовало ожидать, MCF7/Dox и P388/Dox проявили наибольшую устойчивость ко всем исследованным препаратам. Карминомицин (III) и 14-гидроксикарминомицин (IV) и их производные были в несколько раз более активны, чем даунорубин (I) и доксорубин (II) и их производные. N-Трифторацетилирование привело к снижению цитостатической активности; исключением являлись N-трифторацетилированные доксорубин и карминомицин (XIX) и (XX), которые были более активны, чем исходные антибиотики в отношении резистентных опухолей. Превращение N-трифторацетилированных даунорубицина и карминомицина в модифицированные 13-гидразоны (XXI), (XXII) существенно не повлияло на активность препаратов в отношении чувствительных к доксорубину клеточных линий. Это позволяет считать такие гидразоны перспективной депозитной формой водонерастворимых антибиотиков.

Следует отметить высокую чувствительность резистентных клеточных линий MCF7/Dox и P388/Dox к полученным хлоргидратам 14-О-гемиэфиров антрациклиновых антибиотиков (XI) - (XIV). В табл. 2 приведены значения индексов резистентности R/S_{50} для этих соединений. Чем сильнее уменьшается активность препарата при переходе от чувствительных клеток к резистентным, тем выше величина R/S_{50} . Так, доксорубин (II) в 168 раз менее активен в отношении резистентных клеток MCF7/Dox, чем в отношении чувствительной линии MCF7. Индекс резистентности для доксорубицина на паре клеточных

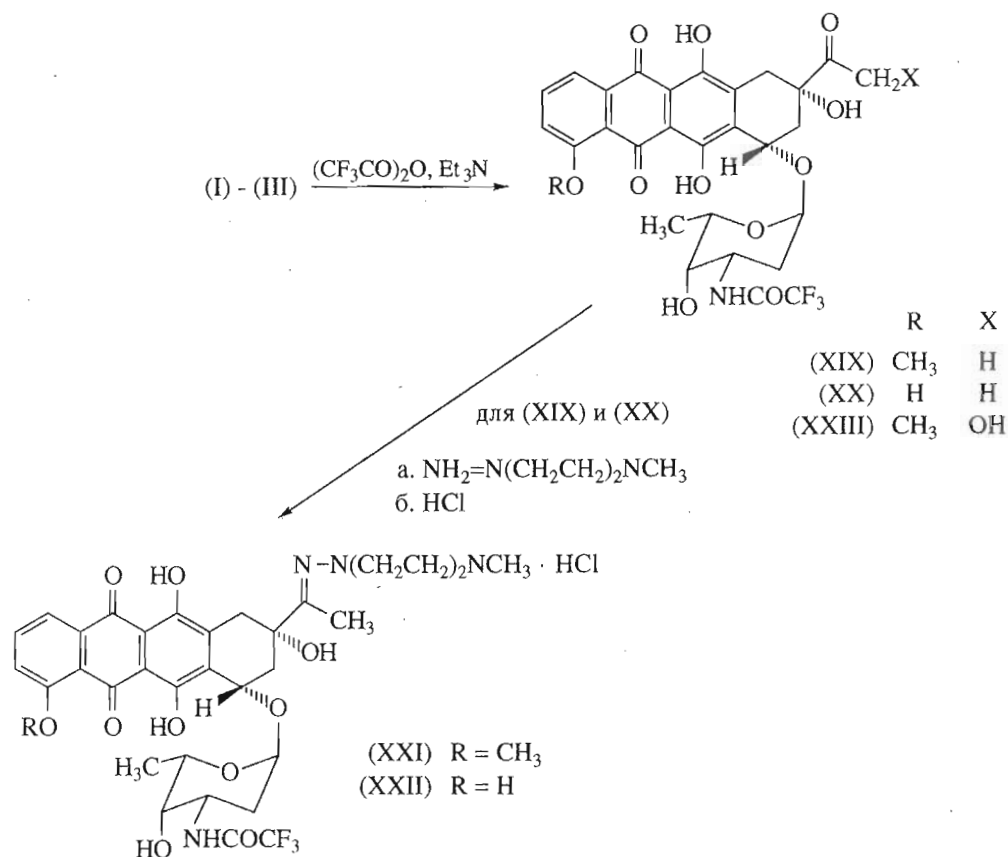


Схема 2.

линий P388/S – P388/Dox еще выше – 382. Как видно из табл. 2, индексы резистентности хлоргидратов 14-О-гемиадицинатов и 14-О-гемипимелатов (XI) - (XIV) и N-трифторацетильных производных (XVI) - (XVIII) значительно ниже. В то время как производные доксорубицина (XI) и (XII) близки по активности доксорубину (II) на чувствительных клетках, они на порядок более активны, чем исходный антибиотик, в отношении резистентных клеток. Для производных гидроксикарминомицина (XIII) и (XIV) это различие несколько менее выражено, поскольку сам гидроксикарминомицин (IV) значительно активнее, чем доксорубин (II), в отношении резистентных линий. Низкие индексы резистентности характерны также для N-трифторацетилпроизводных (XIX) и (XX).

Для большинства препаратов, являющихся субстратами Р-гликопротеина, характерны гидрофобность и наличие положительного заряда при нейтральных значениях pH [17]. Недавно было показано [18], что фибробласты человека, продуцирующие Р-гликопротеин, активно выводят гидрофобные ацетоксиметилловые эфиры флуоресцентных индикаторов, но не их свободные кислотные формы, которые могут образовываться в клетке из ацетоксиметилловых эфиров

под действием эстераз. Фибробласты, продуцирующие Р-гликопротеин, накапливают ацетоксиметилловые эфиры индикаторов только в присутствии модулятора MDR верапамила, однако после удаления верапамила и индикаторов из инкубационной среды резистентные фибробласты хорошо удерживают накопленные индикаторы.

По мнению авторов работы [18], это свидетельствует о том, что удаление гидрофобных соединений из опухолевых MDR-клеток происходит до их попадания в цитоплазму, где они могут подвергнуться гидролизу. Свободные флуоресцентные индикаторы-кислоты не являются субстратами белка Р-170 и поэтому не выводятся из клеток. Следовательно, гидрофобные молекулы эфирных форм индикаторов взаимодействуют с Р-гликопротеином в мембране до их попадания в цитозоль. Полученные нами гемиэфиры, как и вышеописанные индикаторы, обладают свободной карбоксильной группой и, поскольку адипиновая и пимелиновая кислоты являются сильными кислотами, при физиологических значениях pH ионизированы. В ряде исследований по взаимосвязи структуры и активности в отношении резистентных клеток была отмечена корреляция между снижением основности и способностью соединений преодолевать MDR опухолевых клеток [19].

Таблица 2. Цитостатическая активность антрациклиновых антибиотиков (I) - (IV) и их производных in vitro*

Соединение	Введенный заместитель	IC ₅₀ , мкМ					R/S ₅₀ MCF7	IC ₅₀ , мкМ		R/S ₅₀ P388
		A121	A549	HT29	MCF7	MCF7/Dox		P388	P388/Dox	
Доксорубин (II) и его производные										
(II)	—	0.027	0.035	0.168	0.03	5.05	168	0.02	7.65	382
(XXIII)	3'-N-COCF ₃	0.25	0.55	0.42	0.18	9.9	55	0.11	12.53	114
(XI)	14-OCO(CH ₂) ₄ COOH	0.018	0.118	0.151	0.035	0.21	6	0.097	1.51	15
(XII)	14-OCO(CH ₂) ₅ COOH	0.068	0.295	0.092	0.04	1.71	43	0.04	2.19	55
(XVI)	3'-N-COCF ₃ ; 14-OCO(CH ₂) ₅ COOH	0.42	1.08	0.958	0.2	8.8	44	0.21	14.03	67
14-Гидроксикарминомицин (IV) и его производные										
(IV)	—	0.005	0.006	0.027	0.012	0.154	13	0.004	0.9	225
(XIII)	14-OCO(CH ₂) ₄ COOH	0.003	0.007	0.024	0.005	0.11	22	0.012	0.73	61
(XIV)	14-OCO(CH ₂) ₅ COOH	0.011	0.025	0.066	0.007	0.268	38	0.026	0.521	20
(XVII)	3'-N-COCF ₃ ; 14-OCO(CH ₂) ₄ COOH	0.014	0.042	0.145	0.08	0.49	6	0.031	1.945	63
(XVIII)	3'-N-COCF ₃ ; 14-OCO(CH ₂) ₅ COOH	0.04	0.1	0.242	0.03	1.49	50	0.063	2.23	35
Даунорубин (I) его производные										
(I)	—	0.019	0.034	0.113	0.03	1.85	64	0.02	3.2	160
(XIX)	3'-N-COCF ₃	0.076	0.055	0.173	0.25	1.22	5	0.15	1.58	10
(XXI)	3'-N-COCF ₃ ; 13=NN(CH ₂ CH ₂) ₂ NCH ₃	0.048	0.057	0.156	0.1	1.38	14	0.08	1.67	21
Карминомицин (III) и его производные										
(III)	—	0.005	0.005	0.018	0.007	0.073	10	0.004	0.25	62
(XX)	3'-N-COCF ₃	0.007	0.6	0.031	0.031	0.061	2	0.009	0.041	4
(XXII)	3'-N-COCF ₃ ; 13=NN(CH ₂ CH ₂) ₂ NCH ₃	0.043	0.033	0.098	0.082	0.325	4	0.031	0.962	31

* IC₅₀ – концентрация препаратов, подавляющая рост клеток на 50%; R/S₅₀ – индекс резистентности (вычисляется как отношение IC₅₀ для резистентных клеток к IC₅₀ для чувствительных).

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты можно объяснить тем, что гемиэфиры (XI) - (XIV) являются худшими субстратами для Р-гликопротеина, чем исходные антибиотики, поскольку они более полярны и менее основны. Не исключено, что после интернализации они гидролизуются до исходных антибиотиков в цитозоле. Следует, однако, отметить, что неизвестно, являются ли гемиэфиры субстратами неспецифических эстераз в клетке; полученные предварительные данные свидетельствуют о том, что они таковыми не являются. Исследования методом проточной цитометрии показали, что повышенная активность 14-О-гемиадипината доксорубина (XI) коррелирует с увеличением (по сравнению с доксорубицином) его внутриклеточного накопления в доксорубинрезистентных клетках. По данным лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, соединение (XI) накапливается в ядрах устойчивых клеток, в то время

как доксорубин в них практически не обнаруживается [20]. Активность N-трифторацетильных производных (XIX) и (XX) также, по-видимому, связана с отсутствием основного заместителя в углеводном остатке.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы даунорубин (I), доксорубин (II) и карминомицин (III), полученные на опытной установке НИИНА РАМН. 14-Гидроксикарминомицин (IV) синтезирован по методу [10]. Мононатриевые соли адипиновой и пимелиновой кислот получали прибавлением 1 экв. NaOH к соответствующей кислоте в метаноле и последующим упариванием метанола в вакууме. Для аналитической ТСХ использовали пластинки с силикагелем на алюминиевой фольге Silufol (Kavalier, Чехо-Словакия) в системах хлороформ-метанол-вода, 13 : 6 : 1 (А), хлороформ-бензол-метанол,

10 : 1 : 1 (Б). Для препаративной хроматографии использовали стеклянные пластинки (20 × 20 см), покрытые 2-мм слоем силикагеля Kieselgel 60 Н (Merck) в тех же системах. ¹H-ЯМР-спектры изучены на приборе VXR-400 (Varian, США) с рабочей частотой 400 МГц и ¹⁹F-ЯМР-спектры – при 360 МГц (внутренний стандарт – CFCl₃). Масс-спектры с бомбардировкой быстрыми атомами (FAB-MS) сняты на приборе MS-50TC Kratos (США) с использованием глицериновой матрицы. ИК-спектры снимали в таблетках с KBr на приборе SP-1110 (Pye Unicam). Оптическое вращение определяли на спектрополяриметре Perkin-Elmer 241. Температуры плавления (не исправлены) измеряли на приборе Buchi SMP-20. Растворители упаривали при уменьшенном давлении на ротонном испарителе при температуре ниже 40°C.

Внутренняя соль (VII) и гидрохлорид 14-О-гемиадипината доксорубина (XI). К раствору 120 мг (0,2 ммоль) гидрохлорида 14-бромдаунорубина (V) [11] в 10 мл метанола прибавляли раствор моносодиевой соли адипиновой кислоты (270 мг, 1,6 ммоль) в 10 мл метанола и реакционную смесь нагревали 4 ч при 60°C, а затем оставляли на 24 ч при 20°C. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (30 мл), метанолом (30 мл) и смесью хлороформ–метанол (3 : 1; 150 мл). Получали 67 мг внутренней соли (VII). Эту соль растворяли в смеси метанола (около 10 мл) и 1,8 н. метанольного HCl (0,5 мл) и гидрохлорид (XI) выделяли осаждением эфиром (30 мл). Т. пл. 155–156°C, R_f 0,49 (А). ИК-спектр: 3400, 1740, 1620, 1580 см⁻¹.

Внутренняя соль (VIII) и гидрохлорид 14-О-гемипимелата доксорубина (XII). Гидрохлорид 14-бромдаунорубина (V) (600 мг, 0,9 ммоль) и моносодиевую соль пимелиновой кислоты (1800 мг, 11,4 ммоль) растворяли в 75 мл метанола, отфильтровывали нерастворившиеся соли и фильтрат перемешивали 2 сут при 20°C. Образовавшийся осадок обрабатывали так, как описано выше, и получали 480 мг внутренней соли (VIII), не растворимой в воде, DMSO и спиртах. Т. пл. 204–205°C. Гидрохлорид (XII) был получен из соли (VIII) так, как описано в предыдущем эксперименте. Спектр ¹H-ЯМР (CD₃OD): 5,17 (2H, д, J_{ab} 17,8 Гц, 14-CH₂O), 2,40 (2H, м, пимелиновый ОСОСН₂), 2,22 (2H, м, пимелиновый ОСОСН₂), 1,65 (4H, м), 1,38 м. д. (2H, м).

Внутренняя соль (IX) и гидрохлорид 14-О-гемиадипината 14-гидроксикарминомицина (XIII). Раствор 14-бромкарминомицина (VI) [10] (500 мг, 0,83 ммоль) в метаноле (30 мл) приливали к раствору моносодиевой соли адипиновой кислоты (1700 мг, 10 ммоль) в метаноле (200 мл) и полученную смесь перемешивали 3 ч при 60°C и затем 20 ч при 20°C. Выпавший осадок очищали так,

как описано выше, и получали 200 мг внутренней соли (IX). Гидрохлорид (XIII) получали из соли (IX) аналогично гидрохлориду (XII) в виде темно-красного порошка. R_f 0,52 (А). ИК-спектр: 3450, 1740, 1610 см⁻¹.

Внутренняя соль (X) и гидрохлорид 14-О-гемипимелата 14-гидроксикарминомицина (XIV). Раствор 14-бромкарминомицина (VI) (300 мг, 0,45 ммоль) и моносодиевой соли пимелиновой кислоты (900 мг, 5,7 ммоль) в 40 мл метанола выдерживали 2 сут. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали последовательно водой, метанолом и хлороформом, как описано выше, и полученную соль (X) обрабатывали метанолом (50 мл), содержащим 1 мл 1,8 н. HCl. Нерастворившуюся часть отделяли, фильтрат упаривали до объема 10 мл и гидрохлорид (XIV) осаждали эфиром (50 мл). Получали 240 мг соли (XIV). ¹H-ЯМР-спектр (CD₃OD): 5,34 (1H, д, J_{ab} 17,8 Гц, 14-CH₂O), 5,12 (1H, д, J_{ab} 17,8 Гц, 14-CH₂O), 2,49 (2H, м), 2,32 (2H, м), 1,68 (4H, м), 1,45 м. д. (2H, м).

N-Трифторацетилкарминомицин (XX). К суспензии 200 мг (0,36 ммоль) гидрохлорида карминомицина (III) в 20 мл сухого хлороформа прибавляли 1 мл триэтиламина и затем, после охлаждения до 0°C, 0,2 мл (1 ммоль) (CF₃CO)₂O. Через 10 мин смесь становилась гомогенной и исходный карминомицин (III) не обнаруживался в реакционной смеси (по данным ТСХ, R_f карминомицина (III) 0,45 (А)). Реакционную смесь разбавляли хлороформом, промывали 10 мл 0,1 н. HCl, затем водой (25 мл × 4), сушили над Na₂SO₄ и упаривали до объема 10 мл, продукт реакции осаждали добавлением смеси эфир–гексан (50 мл, 1 : 1) и получали 145 мг трифторацетамида (XX). Аналитически чистый образец получен препаративной хроматографией в системе Б. ¹⁹F-ЯМР-спектр (CDCl₃ – CD₃OD): 73,98 м. д. (с).

13-(4-Метилпиперазин-1-ил)имино-N-трифторацетилдаунорубин (XXI). К раствору 270 мг (0,43 ммоль) трифторацетамида (XIX) в 40 мл смеси хлороформ–метанол (1 : 1) прибавляли уксусную кислоту (1 мл) и затем 1-амино-4-метилпиперазин (500 мг, 4,3 ммоль). Ход реакции контролировали ТСХ в системе Б (для исходного (XIX) R_f 0,54). Через 3 сут при 20°C исходный (XIX) исчезал из реакционной смеси. Смолообразный продукт реакции осаждали добавлением 100 мл смеси гексан–эфир (1 : 1) с последующим декантированием надосадочной жидкости. Остаток растворяли в хлороформе (30 мл), подкисляли добавлением 1 мл 1,8 н. HCl в метаноле и вновь осаждали 100 мл смеси гексан–эфир (1 : 1). Некристаллический продукт отделяли декантацией, растворяли в смеси метанола (30 мл) и изопропанола (40 мл), раствор упаривали в вакууме до объема

40 мл и получали после охлаждения 211 мг кристаллического производного (XXI). ^1H -ЯМР-спектр (CD_3OD): 3.21 (4H, м, $\text{CH}_2\text{N}-\text{N}$), 2.72 (4H, м, CH_2N), 2.86 м. д. (3H, с, $\text{N}-\text{CH}_3$). ^{19}F -ЯМР-спектр: 70.58 м. д. (с).

13-(4-Метилпиперазин-1-ил)имино-N-трифторацетилкарминоцидин (XXII). В результате взаимодействия N-трифторацетилкарминоцидина (XX) (110 мг, 0.18 ммоль) и 1-амино-4-метилпиперазина (500 мг, 4, 3 ммоль) в описанных выше условиях было получено 72 мг пиперазинового производного (XX). ^1H -ЯМР-спектр (CD_3OD): 3.21 (4H, м, $\text{CH}_2\text{N}-\text{N}$), 2.71 (4H, м, CH_2N), 2.80 м. д. (3H, с, $\text{N}-\text{CH}_3$). ^{19}F -ЯМР-спектр: 70.68 м. д. (с).

14-О-Гемиадипинат N-трифторацетилдоксорубицина (XV). К суспензии 250 мг (0.37 ммоль) хлоргидрата (XI) в 25 мл сухого хлороформа прибавляли 1 мл Et_3N , смесь охлаждали и прибавляли раствор 0.5 мл (2.5 ммоль) трифторуксусного ангидрида в сухом хлороформе (5 мл). Через 5 мин исходный (XI) полностью исчезал из реакционной смеси (по данным ТСХ в системе Б). Реакционную смесь промывали 0.1 н. HCl (10 мл) и водой (до pH 7). Раствор сушили над Na_2SO_4 , упаривали до 10 мл и добавляли 50 мл гексана. Выделившийся продукт реакции растворяли в минимальном объеме хлороформа, добавляли 40 мл изопропанола и упаривали до объема 20 мл. Прибавляли 50 мл гексана и получали после фильтрации 120 мг трифторацетамида (XV). Фильтрат упаривали, к остатку прибавляли 5 мл хлороформа и 20 мл гексана и получали дополнительно 52 мг продукта (XV); т. пл. 138 - 141°C (данные [11]: 135 - 140°C). Вещество идентично, по данным ЯМР, 14-О-гемиадипинату N-трифторацетилдоксорубицина [11].

14-О-Гемипимелат N-трифторацетилдоксорубицина (XVI) получали аналогично трифторацетамиду (XV) из хлоргидрата (XII). Т. пл. 142 - 145°C (данные [11]: 140 - 145°C). Вещество, по данным ЯМР, идентично 14-О-гемипимелату N-трифторацетилдоксорубицина [11].

14-О-Гемиадипинат N-трифторацетил-14-гидроксикарминоцидина (XVII) получали аналогично гемиадипинату (XV) из 250 мг хлоргидрата (XIII). Выход 125 мг в виде порошка красного цвета. ^1H -ЯМР-спектр ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): 5.32 (1H, д, J_{ab} 18.1 Гц, 14- CH_2O), 5.10 (1H, д, J_{ab} 18.1 Гц, 14- CH_2O), 2.45 (2H, м), 2.37 (2H, м), 1.78 (2H, м), 1.61 м. д. (2H, м). ^{19}F -ЯМР: 69.98 м. д.

14-О-Гемипимелат N-трифторацетил-14-гидроксикарминоцидина (XVIII) (140 мг) получали, используя тот же метод и исходя из 200 мг хлоргидрата (XIV).

Исследование цитостатической активности антрациклинов. Панель линий опухолевых клеток человека и животных, использованная для оценки цитостатической активности антрациклиновых производных, включала в себя следующие культуры клеток: рака молочной железы человека MCF7/S и ее резистентной сублинии MCF7/Dox; рака толстого кишечника человека HT29; аденокарциномы легкого человека A549; карциномы яичника человека A121; лимфоцитарного лейкоза мышей P388/S и резистентной к доксорубину сублинии P388/Dox. MCF7, HT29, A549, P388 и P388/Dox были получены из Национального института рака (США). Линия A121 была любезно предоставлена д-ром К. Crickard (Buffalo General Hospital, USA), а культура MCF7/Dox – д-ром Y. Rustum (Roswell Park Cancer Institute, USA). Каждый препарат испытывали в широком диапазоне концентраций (от 10^{-9} до 10^{-4} М) в лунках (каждая концентрация в пяти повторностях) 96-луночных планшетов, содержащих культуры клеток (600 - 1200 клеток на лунку) в ростовой среде RPMI 1640, дополненной 5% фетальной бычьей сывороткой и 5% сывороткой Nu IV. В случае монослойных культур опухолевые клетки помещали в лунки 96-луночных планшетов за 18 - 20 ч до прибавления разведений препаратов. Клеточные культуры инкубировали с препаратами в течение 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Подавление клеточного роста определяли калориметрическим методом, основанным на окрашивании клеточных белков сульфородаминем В (SRB), как описано ранее [21]. В случае суспензионных культур (чувствительные и резистентные P388-клетки) растворы препаратов добавляли сразу после помещения клеток в 24-луночные планшеты (50000 клеток на лунку) и инкубировали 48 ч при тех же условиях. Подавление роста определяли путем прямого подсчета клеток на счетчике Coulter Counter. Данные in vitro оценки цитостатической активности антрациклиновых производных в виде значений IC_{50} (концентраций препаратов, вызывающих подавление роста клеток на 50%) показаны в табл. 2. Представленные результаты являются средними значениями 2 - 5 независимых экспериментов, коэффициенты вариации для всех изученных соединений < 10%.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 94-04-11385а) (для НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН) и по гранту U.S.P.H.S. CA 13038 (для Grace Cancer Drug Center, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, USA).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kessel D.H. // Anthracyclines and Anthracenedione-based Anticancer Agents / Ed. J.W. Lown. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier, 1988. P. 599 - 627.

2. Gottesman M., Pastan I. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 12163 - 12166.
3. Pastan I., Gottesman M. // N. Engl. J. Med. 1987. V. 316. P. 1388 - 1393.
4. Juliano R.L., Ling V. // Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 455. P. 152 - 162.
5. Beck W.T. // Eur. J. Cancer. 1990. V. 26. P. 513 - 515.
6. Coley H.M., Twentyman P.R., Workman P. // Eur. J. Cancer. 1990. V. 6. P. 665 - 667.
7. Horichi N., Tapiero H., Sugimoto Y., Bungo M., Nishiyama M., Fourcade A., Lampidis T.J., Kasahara K., Sasaki Y., Takahashi T., Saijo N. // Cancer Res. 1990. V. 50. P. 4698 - 4701.
8. Ogawa M., Tabata M., Horikoshi N., Inoue K., Mukaiyama T., Fukutani H., Hirano A., Nizunuma N., Itami S. // Proc. Am. Soc. Clin. Onc. 1989. V. 8. P. 62.
9. Mross K., Langenbuch T., Burk K., Kaplan E., Hossfeld D. // Proc. Am. Soc. Clin. Onc. 1989. V. 8. P. 78.
10. Поваров Л.С., Бажанов В.С., Васенкина В.Ф. // Антибиотики. 1977. Т. 8. С. 693 - 695.
11. Israel M., Potti G.P., Seshadri R. // J. Med. Chem. 1985. V. 28. P. 1223 - 1228.
12. Braslawsky G.R., Edson M.A., Pearce W., Kaneko T., Greenfield R.S. // Cancer Res. 1990. V. 50. P. 6608 - 6614.
13. Greenfield R.S., Kaneko T., Daues A., Edson M.A., Fitzgerald K.A., Olech L.J., Spitalny G.L., Braslawsky G.R. // Cancer Res. 1990. V. 50. P. 6600 - 6607.
14. Naff B.M., Plowman J., Narayanan V.L. // Anthracyclines and Anthracenedione-based Anticancer Agents / Ed. J.W. Lown. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier, 1988. P. 1 - 57.
15. Rifampin. № 8215 // The Merck Index. 11 Ed. / Ed. Budvari S. Rahway. N.Y.: Merck and Co. Inc., 1989. P. 8215.
16. Toth K., Vaughan M.M., Slocum H.K., Arredondo M.A., Takita H., Baker R.M., Rustom Y.M. // Am. J. Pathology. 1994. V. 144. P. 227 - 236.
17. Gottesman M.M., Pastan I. // Annu. Rev. Biochem. 1993. V. 62. P. 385 - 427.
18. Homolya L., Hollo Z., Germann U.A., Pastan I., Gottesman M., Sarkadi B. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 21493 - 21496.
19. Priebe W., Perez-Soler R. // Pharmac. Ther. 1993. V. 60. P. 215 - 234.
20. Leontieva O.V., Povarov L.S., Preobrazhenskaya M.N., Bernacki R.J. // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1995. V. 36. P. 392.
21. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. // J. Natl. Cancer Inst. 1990. V. 82. P. 1107 - 1112.

14-Esters and 13-Hydrazones of Anthracycline Antibiotics of the Daunorubicin Series: Synthesis and Cytostatic Activity toward Tumor Cells Sensitive or Resistant to Doxorubicin

L. S. Povarov*, O. V. Leont'eva*, R. J. Bernacki**, E. N. Olsuf'eva*,
E. I. Salimova*, P. Pera**, and M. N. Preobrazhenskaya*¹

*Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Bol'shaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119867 Russia

**Grace Cancer Drug Center, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York, USA

Abstract – Doxorubicin and 14-hydroxycarminomycin 14-*O*-hemiadipates and 14-*O*-hemipimelates, synthesized from 14-bromo derivatives of daunorubicin and carminomycin and monosodium adipate and pimelate, were converted to the corresponding *N*-trifluoroacetylated compounds. 13-(4-Methylpiperazine-1-yl)imino derivatives of the anthracycline antibiotics were also obtained. The cytostatic activity of the compounds synthesized was studied using a panel of human and animal tumor cell lines sensitive or resistant to doxorubicin. *N*-Trifluoroacetylation of the antibiotics resulted in a decrease in the cytostatic activity. The activity of the water-soluble 13-(4-methylpiperazine-1-yl)imino derivatives is close to that of the corresponding parent antibiotics.

Key words: anthracycline antibiotics, multidrug resistance.

¹ To whom correspondence should be addressed.