



УДК 577.182.54'17

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 3'-N-(N,N-ДИМЕТИЛАМИНОМЕТИЛЕН)ДАУНОРУБИЦИНА С ФЕНИЛ- И ЭТИЛИЗОТИОЦИАНАТОМ

© 1995 г. Л. С. Поваров, Л. И. Власенкова, Э. И. Лажко, О. С. Анисимова*,
Э. Де Клерк**, Я. Бальзарини**, М. Н. Преображенская[#]

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

* Центр химии лекарственных соединений – Всероссийский научно-исследовательский
химико-фармацевтический институт, Москва;

** Институт медицинских исследований Рега Католического университета, г. Леван, Бельгия

Поступила в редакцию 06.07.94 г.

Фенилтиокарбамоилирование гидрохлорида 3'-N-(N,N-диметиламинометилена)даунорубицина под действием фенилизотиоцианата в пиридине, сопровождающееся гидролизом диметиламинометиленовой группировки и N → O-миграцией образующейся формильной группы, приводит к 3'-N-(N-фенилтиокарбамоил)-4'-O-формилдаунорубину, структура которого подтверждена методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. В качестве побочного продукта выделен 3'-N-формилдаунорубин. Взаимодействие 3'-N-(N,N-диметиламинометилена)даунорубицина с этилизотиоцианатом протекало по аналогичной схеме. Полученные соединения на 1 - 2 порядка менее цитотоксичны, чем даунорубин, и не ингибируют репликацию ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в субтоксических концентрациях.

Ключевые слова: 3'-N-(N-фенилтиокарбамоил)-4'-O-формилдаунорубин, 3'-N-(N-этилтиокарбамоил)-4'-O-формилдаунорубин.

Ранее было показано [1], что при взаимодействии даунорубицина (I) и родственных антибиотиков (карминомицина, доксорубицина) с алкил- или арилизотиоцианатами образуются соответствующие 3'-N-алкил(арил)тиокарбамоильные производные. Эти соединения представляют интерес как новый тип модификации антрациклиновых антибиотиков по 3'-аминогруппе.

В настоящей работе мы изучили взаимодействие с фенил- и этилизотиоцианатом гидрохлорида 3'-N-(N,N-диметиламинометилена)даунорубицина (II), образующегося при взаимодействии даунорубицина (I) с ацеталем диметилформамида [2]. Выдерживание амидина (II) с фенилизотиоцианатом в коммерческом пиридине при 20°C привело к сложной смеси веществ, разделение которой хроматографическими методами позволило выделить два основных продукта реакции (см. схему): 3'-N-(N-фенилтиокарбамоил)-4'-O-формилдаунорубин (IIIa) и 3'-N-формилдаунорубин (IV) с выходами 40 и 20% соответственно. При использовании пиридина, высушенного над молекулярными ситами 4 Å, образовывалась сложная смесь неустойчивых веществ.

[#] Автор для переписки.

Аналогично при взаимодействии амидина (II) с этилизотиоцианатом были получены 3'-N-(N-этилтиокарбамоил)-4'-O-формилдаунорубин (IIIб) и 3'-N-формилдаунорубин (IV) с выходом 15 и 25% соответственно. При введении в реакцию с соединением (II) аллилизотиоцианата удалось выделить с выходом 50% лишь продукт (IV), идентичный ранее полученному по спектральным и хроматографическим характеристикам [3, 4]. Повидимому, в присутствии невысушенного пиридина наряду с реакцией тиокарбамоилирования происходит гидролиз диметиламинометиленовой группы; мы показали, что N-формильное производное (IV) образуется из исходного амидина (II) при действии влажного пиридина при комнатной температуре.

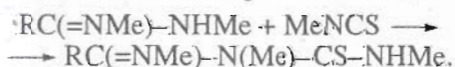
Структура O-формильных производных (IIIa) и (IIIб) подтверждена данными ИК-, ЯМР- и масс-спектрометрии. В ИК-спектрах этих соединений можно выделить полосу поглощения сложноэфирной группы при 1730 см⁻¹, которая частично накладывается на полосу поглощения карбонильной группы при 13-С-атоме антибиотика. Из табл. 1 и 2 видно, что в спектрах присутствуют сигналы протона и углерода формильной группы. Слабопольное смещение сигнала 4'-H по сравнению

с сигналами этого протона в 3'-N-(N-фенилтиокарбамоил)даунорубицине (VIIa) и 3'-N-(N-этилтиокарбамоил)даунорубицине (VIIб) (3.38 → 5.43 и 3.78 → 5.38 м. д. соответственно) свидетельствует об этерификации 4'-гидроксильной группы в соединениях (IIIa) и (IIIб) [1]. Наличие формильной группы при 4'-О-атоме доказано с помощью INERT-эксперимента: селективное насыщение формильного протона при 8.08 м. д. в соединении (IIIa) приводит к появлению в спектре INERT только сигнала 4'-С-атома (70.80 м. д.).

В масс-спектре в условиях химической ионизации соединения (IIIa) наблюдался пик молекулярного иона [M]⁺ и пик [M + 1]⁺ со значениями m/z 690 и 691. В процессе съемки происходит термическая деструкция и в спектре наблюдаются пики, соответствующие последовательному отрыву фрагментов заместителей углеводной части молекулы ([M - Ph]⁺, [M - PhNH]⁺, [M - PhNHCS]⁺, [M - PhNHCSNH]⁺, [M - PhNHCSNH - CHO]⁺, [M - PhNHCSNH - OCHO]⁺ с m/z 613, 598, 554, 539, 510 и 494 соответственно), а также пики ионов, возникающих при отрыве и/или фрагментации агликона антибиотика. Образование фрагмента с m/z 539 согласуется с расположением формильной группы при атоме 4'-О, а не 3'-N. Схема распада соединения (IIIa) при десорбционной химической ионизации аналогична.

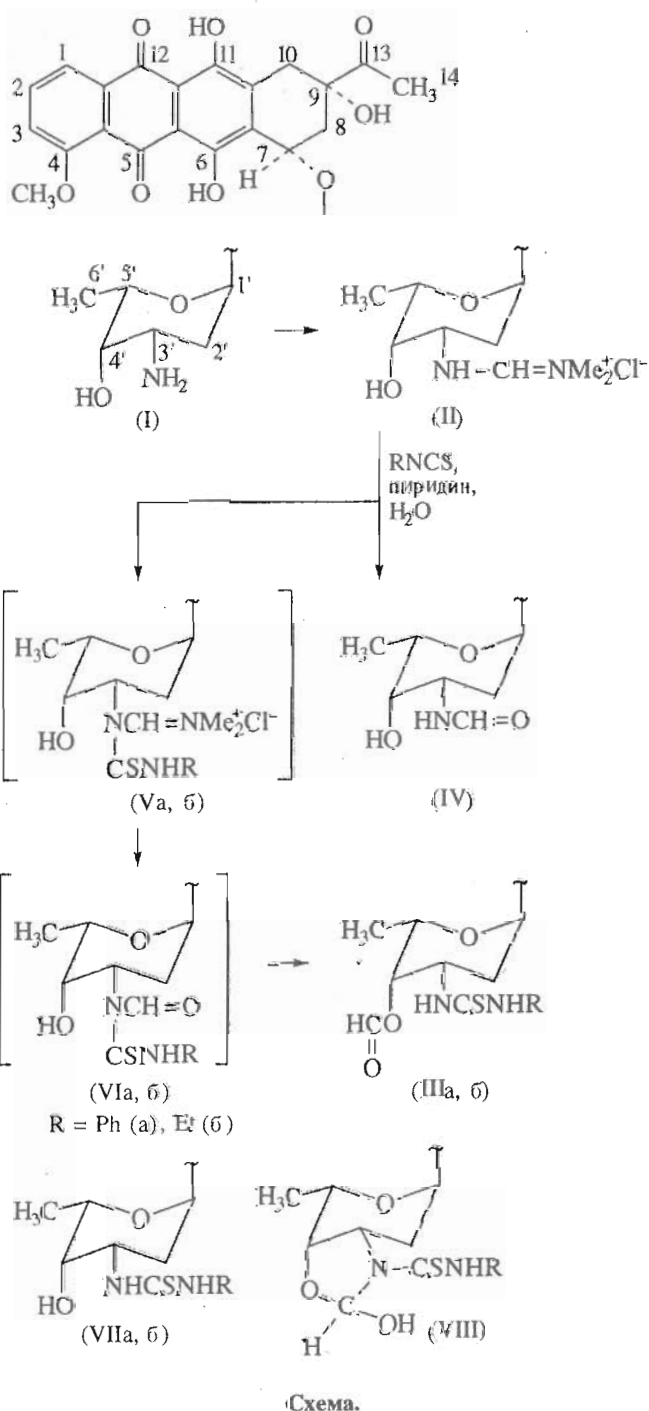
Образование 3'-N-тиокарбамоильных производных, содержащих 4'-О-формильную группу, оказалось неожиданным. Мы установили, что в наших условиях 3'-N-формилдаунорубицин (IV) не взаимодействует с фенилизотиоцианатом. В связи с этим наиболее логичным кажется представление о промежуточном образовании 3'-(N,N-диметиламинометил)-3'-фенилтиокарбамоилдаунорубицина (Va), гидролиз которого приводит к N-формильному производному (VIa). Затем формильная группа мигрирует к 4'-ОН-группе с образованием производного (IIIa). Нельзя также исключить возможность миграции формимидного остатка в промежуточном соединении (V) от 3'-N к 4'-О и последующего гидролиза с образованием соединений (IIIa, б).

Известно несколько примеров взаимодействия амидинов с изотиоцианатами [5]. Так, при реакции N,N'-диметиламидинов с алкилизотиоцианатами образуются N-алкилтиокарбамоиламидины:



По-видимому, в нашем случае реакция протекает по аналогичной схеме, однако образующийся тиокарбамоиламидин (V) гидролизуеться и формильный остаток в замещенной формилтиомочевине (VI) мигрирует в 4'-О-положение (или сначала происходит миграция, а затем гидролиз).

Как уже упоминалось выше, в отличие от соединения (II) 3'-N-формилдаунорубицин (IV) не



реагирует с фенилизотиоцианатом. Большая реакционная способность амидина (II) по сравнению с соответствующим карбонильным производным (IV), по-видимому, связана с электронодонорными свойствами диметиламиногруппы, которые повышают нуклеофильность атома азота в замещенном енаmine (II). Миграция 3'-N-формильного остатка в 4'-О-положение – новый пример участия соседней 4'-ОН-группы остатка даунозамина в превращениях заместителя при 3'-N. Ранее было показано, что участие 4'-ОН-группы в реакциях

Таблица 1. ^1H -ЯМР-спектры соединений (IIIa, IIIб)

Протоны	(IIIa)*		(IIIб)**	
	δ , м. д.	КССВ, Гц	δ , м. д.	КССВ, Гц
1-Н	7.99	$J_{1,2}$ 7.8	8.02	$J_{1,2}$ 7.7
2-Н	7.75	$J_{2,3}$ 8.8	7.76	$J_{2,3}$ 8.8
3-Н	7.36	$J_{1,3}$ 1.0	7.36	$J_{1,3}$ 1.1
4-ОСН ₃	4.05		4.04	
7-Н	5.25	$J_{7,8e}$ 2.0	5.25	$J_{7,8e}$ 2.0
8-He	2.30	$J_{8a,8e}$ 14.8	2.29	$J_{8a,8e}$ 14.9
8-Ha	2.12	$J_{7,8a}$ 4.2	2.11	$J_{7,8a}$ 4.2
10-He	3.20	$J_{8e,10e}$ 1.9	3.23	$J_{8e,10e}$ 1.9
10-Ha	2.89	$J_{10a,10e}$ 18.9	2.91	$J_{10a,10e}$ 18.9
6-ОН	13.94		13.98	
9-ОН	4.36		4.37	
11-ОН	13.20		13.24	
14-Н	2.42		2.42	
1'-Н	5.52	$J_{1',2a}$ 4.1	5.56	$J_{1',2a}$ 3.9
2'-He	1.94	$J_{1',2e}$ <1.0	2.02	$J_{1',2e}$ <1.0
2'-Ha	1.75	$J_{2a,2e}$ 13.1	1.90	$J_{2a,2e}$ 12.8
3'-Н	4.97	$J_{2a,3'}$ 13.1 $J_{2e,3'}$ 5.0	4.88	$J_{2a,3'}$ 12.8 $J_{2e,3'}$ 4.8
4'-Н	5.43	$J_{3',4'}$ <1.0	5.38	$J_{3',4'}$ <1.0
5'-Н	4.33	$J_{4',5'}$ <1.0	4.27	$J_{4',5'}$ <1.0
5'-СН ₃	1.17	$J_{5',\text{СН}_3}$ 6.6	1.20	$J_{5',\text{СН}_3}$ 6.5
СSНР	7.72		5.92	
СНО	8.08		8.25	
3'-NH	5.70	$J_{3',\text{NH}}$ 8.3	5.55	$J_{3',\text{NH}}$ 8.0

* Сигналы Ph-группы при 7.08; 7.38 и 7.28 м. д., $J_{\text{NH, Ph}}$ 2.6 Гц.

** Сигналы Et-группы при 3.27 и 1.14 м. д., $J_{\text{NH, Et}}$ 2.0 Гц; $J_{\text{СН}_2\text{СН}_3}$ 7.3 Гц.

превращения 3'-карбамоильной или 3'-тиокарбамоильной группы приводит к образованию конденсированных производных оксазолидина [1, 6]. В нашем примере возможность такой перегруппировки связана с активирующим влиянием тиокарбамоильного заместителя при аминогруппе. По аналогии с описанными ранее механизмами миграции ацильной группы [7] можно предположить, что перегруппировка включает в себя образование промежуточного пятичленного соединения (VIII).

Были исследованы цитотоксический и анти-ВИЧ-эффекты полученных соединений. В табл. 3 показано их воздействие в сравнении с даунору-

бицином (I), 3'-N-(N-фенилтиокарбамоил)даунорубицином (VIIa) и 3'-N-(N-этилтиокарбамоил)даунорубицином (VIIб) на пролиферацию клеток лейкоза мышей L1210, Т-лимфобластных клеток человека Molt-4F и Т-лимфоцитов человека (Molt4/C8 и СЕМ/О) и приведены цитотоксические концентрации, необходимые для снижения выживаемости клеток МТ-4 на 50%, в сравнении с концентрациями, на 50% защищающими эти клетки от цитопатического действия вирусов ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Как видно из таблицы, действие на вирусы происходит при концентрациях, очень близких к цитотоксическим.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали гидрохлорид даунорубицина, полученный на опытной установке НИИНА РАМН, и пиридин марки ч. д. а. без дополнительной очистки и высушивания. Для ТСХ применяли Silufol (Kavalier, Чехо-Словакия). Препаративную хроматографию проводили на пластинках (20 × 20 см) с силикагелем Kieselgel 60H (Merck, ФРГ) при толщине слоя 0.5 мм в системе хлороформ-бензол-метанол, 10 : 1 : 2. Спектры ЯМР зарегистрированы на приборе VX-400 Varian (США) с рабочей частотой 400 и 100.6 МГц для ядер ¹H и ¹³C соответственно в CDCl₃; хим. сдвиги ¹H приведены относительно сигнала CHCl₃ (7.25 м. д.), ¹³C – относительно сигнала CDCl₃ (77.00 м. д.). Для отнесения сигналов в протонном спектре использовали импульсную последовательность COSY* [8], а в спектре ¹³C-ЯМР – импульсную последовательность HETCOR* [9] и INEPT* [10]. ИК-спектры записаны на спектрофотометре SP-1100 Pye Unicam (Англия) в таблетках с KBr. Масс-спектры сняты на приборе SSQ 710 Finnigan (США) с непосредственным вводом образца в источник (газ-реагент – изобутан) в условиях химической ионизации. Изучение цитотоксической и анти-ВИЧ-активностей проводили по методам [11].

Взаимодействие гидрохлорида 3'-(N,N-диметиламинометилена)даунорубицина (II) [2] с N-фенилизотиоцианатом. Раствор 200 мг (0.32 ммоль) гидрохлорида 3'-(N,N-диметиламинометилена)даунорубицина (II) [2] и 0.4 мл (3.7 ммоль) N-фенилизотиоцианата в 15 мл пиридина выдерживали 7 сут при 20°C. Реакционную смесь концентрировали в вакууме до 1/3 объема и продукты реакции осаждали добавлением 30 мл эфира, фильтровали, промывали эфиром (2 × 30 мл), сушили в вакууме. После препаративной ТСХ получили 98 мг (40%) 3'-N-(N-фенилтиокарбамоил)-4'-O-формилдаунорубицина (IIIa) и 36 мг (20%) 3'-N-формилдаунорубицина (IV). Для (IIIa) R_f 0.53, т. пл. 156 - 158°C, [α]_D²⁰ +72° (с 0.05, хлороформ). Найдено, %: С 60.49, Н 4.77, N 3.84, S 4.68. C₃₅H₃₄N₂O₁₁S. Вычислено, %: С 60.87, Н 4.63, N 4.06, S 4.64. Для (IV) R_f 0.42, т. пл. 164°C, [α]_D²⁰ +264° (с 0.05, хлороформ). По данным [3], т. пл. 154 - 157°C, [α]_D²⁰ +260° (с 0.1, хлороформ).

Взаимодействие гидрохлорида 3'-N-(N-диметиламинометилена)даунорубицина (II) с этилизотиоцианатом. Раствор 200 мг (0.32 ммоль) гидрохлорида (II) и 0.6 мл (6.89 ммоль) этилизотиоцианата в 15 мл пиридина выдерживали 14 сут при 20°C, продукты реакции выделяли так же, как в предыдущем опыте. Получили 30 мг (15%) 3'-N-(N-этилтиокарбамоил)-4'-O-формилдаунорубици-

Таблица 2. ¹³C-ЯМР-спектры соединения (IIIa)*

Номер С-атома	δ, м. д.	Номер С-атома	δ, м. д.
1	119.81	11a	111.29
2	135.68	12	186.57
3	118.39	12a	135.49
4	160.99	13	212.09
4a	120.87	14	24.88
5	187.03	4-OCH ₃	56.65
5a	111.45	1'	100.29
6	156.32	2'	30.37
6a	133.87	3'	49.27
7	69.91	4'	70.80
8	35.25	5'	65.99
9	76.60	6'	16.95
10	33.45	CHO	160.10
10a	134.58	NHCSNH	180.30

* Сигналы группы Ph при 125.53; 130.24; 127.79.

Таблица 3. Подавление пролиферации клеток лейкоза мышей L1210, культуры Т-лимфоцитов человека (Molt4/C8 и СЕМ/0), Т-лимфобластных клеток человека (Molt-4F) полученными производными даунорубицина и их влияние на цитопатогенный эффект вируса иммунодефицита

Соединение	IC ₅₀ , мкМ*			EC ₅₀ , мкМ ² *		
	L1210 [†]	Molt4/C8	СЕМ/0	ВИЧ-1	ВИЧ-2	CC ₅₀ ^{3*}
(I)	0.44	0.044 ^{4*}				
(II)	0.192	0.123 ^{4*}				
(IIIa)	0.94	0.604	1.94	>0.8	>0.8	1.36
(IIIб)	1.29	1.84	2.60	>0.8	>0.8	1.34
(IV)	2.18	3.22	11.0	>0.8	>0.8	1.41
(VIIa)	0.702	0.737 ^{4*}				
(VIIб)	0.293	0.280 ^{4*}		>0.162		0.379

* IC₅₀ – концентрация, необходимая для подавления пролиферации клеток на 50%.

²* EC₅₀ – эффективная концентрация, необходимая для 50% защиты клеток МТ-4 от цитопатического эффекта ВИЧ.

³* CC₅₀ – цитотоксическая концентрация, необходимая для снижения выживаемости клеток МТ-4 на 50%.

⁴* Приведены данные для культуры Molt-4F.

* COrrelated Spectroscopy, HETeronuclear COrrelation, Insensitive Nucleic Enhanced by Polarization Transfer.

на (ШБ) и 50 мг (25%) 3'-N-формилдаунорубина (IV). Для (ШБ) R_f 0.50, т. пл. 141 - 143°C, $[\alpha]_D^{20} +224^\circ$ (с 0.05, хлороформ). Найдено, %: С 57.50, Н 5.50, N 4.33. $C_{31}H_{34}N_2O_{11}S$. Вычислено, %: С 57.94, Н 5.63, N 4.36. Для (IV) R_f 0.42.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 940411385).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Preobrazhenskaya M.N., Bakina E.V., Povarov L.S., Lazhko E.I., Aleksandrova L.G., Balzarini J., De Clercq E.* // *J. Antibiot.* 1991. V. 44. P. 192 - 199.
2. *Поваров Л.С., Ульянова Л.А., Тарасова В.Е., Одноралец Е.В., Юдина О.Н., Шепелевцева Н.Г., Гольдберг Л.Г.* // *Антибиотики и химиотерапия.* 1977. Т. 3. С. 1034 - 1040.
3. *Олсуфьева Е.Н., Александрова Л.Г., Розынов Б.В.* // *Антибиотики и химиотерапия.* 1988. Т. XXXIII. С. 729 - 735.
4. *Takahashi Y., Naganava H., Takeuchi T., Umezawa H., Komiyama T., Oki T., Inui T.* // *J. Antibiot.* 1977. V. XXX. P. 622 - 624.
5. *Граник В.Г.* // *Успехи химии.* 1983. Т. LI. Вып. 4. С. 669 - 703.
6. *Поваров Л.С., Бакина Е.В., Лажко Э.И., Орлова Г.Н., Жукова О.С., Обидняк Н.А., Юрченко Н.Я., Глазкова Т.Ю., Преображенская М.Н.* // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. С. 559 - 568.
7. *Пространственные эффекты в органической химии.* / Ред. М.С. Ньюмен. М.: ИЛ, 1960. С. 297 - 301.
8. *Bax A., Freeman R., Morris G.A.* // *J. Magn. Reson.* 1981. V. 42. P. 164 - 168.
9. *Bax A.* // *J. Magn. Reson.* 1984. V. 57. P. 314 - 318.
10. *Bax A.* // *J. Magn. Reson.* 1983. V. 53. P. 517 - 520.
11. *Balzarini J., Baba M., Pauwels R., Herdewin P., Ward S.G., Robins M.J., De Clercq E.* // *Mol. Pharmacol.* 1988. V. 33. P. 243 - 249.

Interaction of 3'-N-(N,N-Dimethylaminomethylene)-daunorubicin with Phenyl- or Ethylisothiocyanate

L. S. Povarov*, L. I. Vlasenkova*, E. I. Lazhko*, O. S. Anisimova**,
E. De Clercq***, J. Balzarini***, and M. N. Preobrazhenskaya*¹

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

** *The Center for Chemistry of Drugs, Ordzhonikidze All-Russian Chemical
and Pharmaceutical Institute, Moscow*

*** *Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium*

Abstract – Interaction of 3'-N-(N,N-dimethylaminomethylene)daunorubicin with phenylisothiocyanate in pyridine was accompanied by hydrolysis of the dimethylaminomethylene moiety and N → O-migration of the resultant formyl group and led to the formation of 3'-N-(N-phenylthiocarbamoyl)-4'-O-formyl-daunorubicin; its structure was deduced from NMR and mass spectrometry data. 3'-N-Formyl-daunorubicin was isolated as a by-product in this reaction. Interaction of 3'-N-(N,N-dimethylaminomethylene)daunorubicin with ethylisothiocyanate proceeded similarly. The synthesized compounds demonstrated cytotoxicities 1 - 2 order of magnitude less than that of daunorubicin but did not inhibit the replication of human immunodeficiency viruses (HIV-1 and HIV-2) at subtoxic concentrations.

Key words: 3'-N-(N-phenylthiocarbamoyl)-4'-O-formyl-daunorubicin, 3'-N-(N-ethylthiocarbamoyl)-4'-O-formyl-daunorubicin.

¹ To whom correspondence should be addressed.