

На правах рукописи

ТЕВЯШОВА АННА НИКОЛАЕВНА

**МОДИФИКАЦИЯ УГЛЕВОДНОЙ ЧАСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
АНТИБИОТИКОВ АНТРАЦИКЛИНОВОЙ ГРУППЫ**

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Тевяшова

МОСКВА, 2005

Работа выполнена в научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

доктор химических наук

Олсуфьева Евгения Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

Бакиновский Леон Владимирович

доктор химических наук, профессор

Юркевич Александр Морисович

Ведущая организация.

НИИ физико-химической биологии

им. А.Н. Белозерского

МГУ им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «27» июня 2005 г. в 15 часов на заседании Диссертационного Совета Д 212 120 01 при Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова по адресу: 119571, Москва, пр. Вернадского, д. 86

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МИТХТ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «24» мая 2005 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,

кандидат химических наук,

старший научный сотрудник

Лютик А.И.



2006-4

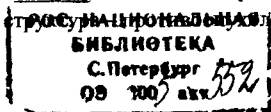
2153894

8341

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Антрациклиновые антибиотики даунорубицин и доксорубицин широко применяются в современной химиотерапии опухолевых заболеваний человека. Однако антрациклины имеют ряд недостатков, основным из которых является кардиотоксичность. Кроме того, антрациклиновые антибиотики обладают высокой кумулятивной токсичностью, мутагенностью, канцерогенностью, миело- и иммунодепрессивным действием. Другой важной проблемой является устойчивость опухолевых клеток к применяемым препаратам, в том числе по механизму множественной лекарственной устойчивости. Особого внимания заслуживает оригинальный отечественный антибиотик антрациклиновой группы – карминомицин. Этот антибиотик в 70-е годы был открыт в НИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР и внедрен в практику отечественного здравоохранения. Карминомицин рекомендован для лечения сарком мягких тканей, острых лейкозов и некоторых форм злокачественных опухолей. Его отличает от других антрациклинов меньшая кардиотоксичность, способность тормозить рост опухолей, устойчивых к доксорубину и способность всасываться через желудочно-кишечный тракт. В начале 90-х годов по ряду экономических причин производство карминомицина было прекращено. Возобновление производства карминомицина, ценного для практической медицины средства, а также химическая модификация антрациклиновых антибиотиков, направленная на поиск препаратов с улучшенными химиотерапевтическими свойствами, активных в отношении опухолевых клеток с множественной лекарственной устойчивостью, является актуальной задачей биоорганической и медицинской химии. Работа была выполнена в рамках темы института № 009 "Направленный синтез препаратов нового поколения на основе антибиотиков и других природных соединений, воздействующих на опухолевые и бактериальные клетки с различным типом резистентности к существующим лекарственным средствам".

Цель работы. Целью работы являлась разработка методов синтеза и получение производных антрациклиновых антибиотиков, обладающих преимуществами перед родительскими антибиотиками. Были поставлены задачи: 1) разработать метод препаративного получения карминомицина исходя из даунорубицина; 2) разработать метод и получить новые производные антрациклинов с квадратной кислотой; 3) разработать метод введения по 3'-аминогруппе остатка даунозамина гидрофильных фармакофорных групп, а также остатка D-галактозы, присоединенных к 3'-аминогруппе остатка даунозамина через гидрофильный или гидрофобный спейсер; 4) разработать метод получения водорастворимых конъюгатов доксорубицина с высокомолекулярным полисахаридом галактоманнаном; 5) для полученных соединений изучить закономерности структурно-фармакологической активности в опытах *in vitro* и *in vivo*.



Научная новизна. Разработан новый способ препаративного получения карминомицина исходя из даунорубицина. Получены новые производные – амиды даунорубицина, доксорубицина и карминомицина с квадратной кислотой различного строения. Разработан новый метод введения в молекулу антрациклинового антибиотика моно- и дисахаридов реакцией восстановительного алкилирования 3'-аминогруппы остатка даунозамина. Впервые получены 3'-N-алкильные производные антрациклиновых антибиотиков разных типов, среди которых некоторые обладали преимуществами перед родительскими антибиотиками в опытах *in vivo*. Разработан метод и впервые осуществлен синтез новых водорастворимых депо-форм доксорубицина – конъюгатов с высокомолекулярным полисахаридом галактоманнаном, отличающихся нагрузкой антибиотика, а также способом его присоединения к галактоманнану.

Практическая ценность работы. Разработанный метод препаративного получения карминомицина рекомендован для реализации в промышленности. Получено и охарактеризовано 35 новых производных. Для ряда новых производных антрациклиновых антибиотиков проведены предклинические испытания. Показано, что некоторые из синтезированных соединений - 3'-N-(α -D-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-O-D-1-дезоксиглюцит-1-ил)доксорубин и 3'-N-(D-1-дезоксигалактит-1-ил)-14-гидрокарминоцин обладают преимуществами перед исходными антибиотиками и перспективны для дальнейшего изучения в клинике. Отработана и осуществлена в препаративном масштабе методика синтеза 3'-N-(α -D-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-O-D-1-дезоксиглюцит-1-ил)доксорубицина.

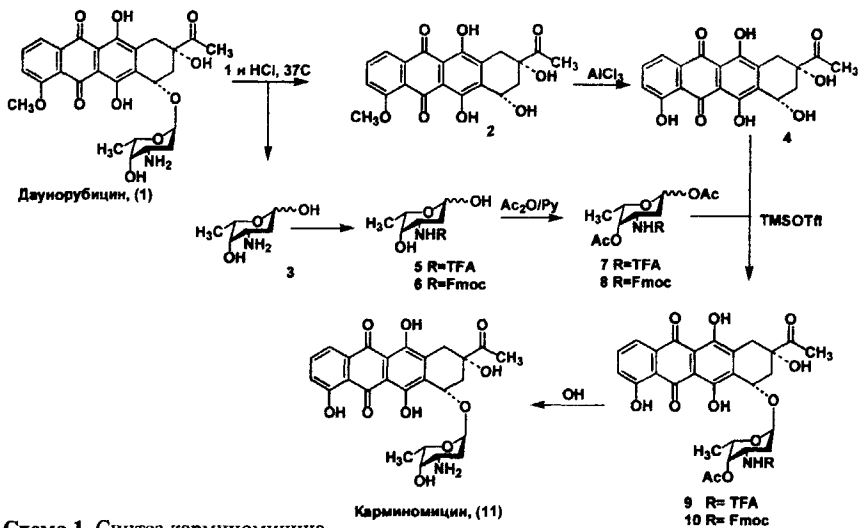
Публикации и апробация работы. По материалам диссертации было опубликовано 12 печатных работ, в том числе, получен 1 патент на изобретение "Способ получения антибиотика карминомицина или его гидрохлорида" № 2004105794 от 27.02.04. Результаты работы были представлены на Конференции молодых ученых института (НИИНА им. Г.Ф.Гаузе РАМН, 2002) (работе присуждена вторая премия), на 8^{ой} Международной конференции по химии антибиотиков и родственных микробных продуктов (ИССА-8, г. Токио, Япония, 2002), на 4-^{ой} Всесоюзном симпозиуме по органическому синтезу "Органическая химия – упадок или возрождение?" (г. Углич, 2003), на Всероссийской научно-практической конференции "Отечественные противоопухолевые препараты" (с. Московский, 2004), на 22-^{ой} Международном углеводном симпозиуме (г. Глазго, Великобритания, 2004), на Всероссийской научно-практической конференции "Отечественные противоопухолевые препараты" (с. Московский, 2005), на Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (г. Москва, 2005), на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов "Окружающая среда и здоровье" (г. Суздаль, 2005).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 130 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы и приложений. Диссертация содержит 20 рисунков, 23 схем и 9 таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка метода препаративного синтеза карминомицина.

Разработан метод препаративного получения карминомицина (11) исходя из даунорубидина (1) (Схема 1).



На первом этапе были подобраны оптимальные условия гидролиза даунорубидина (1), обеспечивающие количественное образование агликона дауномицинона (2) и даунозамина (3). В предварительных опытах показано, что нагревание 1 в кипящей смеси 0.2 н H_2SO_4 в $MeOH-H_2O$ (1:1) (условия гидролиза противоопухолевого антибиотика-гликозида – оливомицина до агликона оливина), приводило к количественному образованию агликона (2), однако, даунозамин (3) образовывался с низким выходом. В подобранных оптимальных условиях гидролиз даунорубидина (0.1 н HCl , $37^\circ C$, 20 ч) до дауномицинона (2) и даунозамина (3) протекал с выходами 99% и 94%, соответственно. Деметилирование 2 проводили $AlCl_3$ в кипящем дихлорэтано. Полученный карминомицинон (4) по своим характеристикам (R_F , 1H -ЯМР-спектр) полностью соответствовал образцу карминомицинона, полученному кислотным гидролизом биосинтетического карминомицина. Даунозамин (3) реакцией с этиловым эфиром трифторуксусной кислоты превращали в 3-N-трифторацетилдаунозамин (5) (3-N-TFA-даунозамин), гидроксильные группы которого далее ацилировали уксусным ангидридом в пиридине с образованием 1,4-ди-О-ацетил-3-N-TFA-даунозамина (7) в виде смеси α и β изомеров ($\alpha:\beta \approx 1:2$ по данным 1H -ЯМР спектроскопии).

б) ^1H -ЯМР спектр карминомицина, полученного через $3'$ -N-Фмос-даунозамин (Py-d_5).

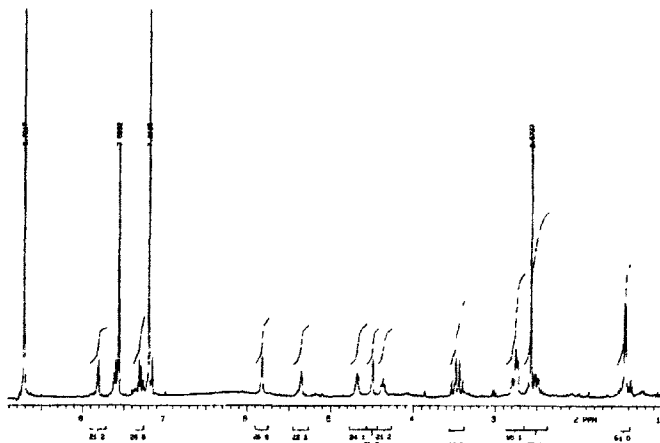


Рис.1. Сравнение ^1H -ЯМР спектров образцов природного и полусинтетического карминомицина.

Разработанный способ (общий выход 25-28% в расчете на даунорубицин) позволяет получать карминомицин в граммовых количествах с чистотой более 90% (по данным ВЭЖХ) без использования хроматографии на каждой из стадий синтеза и может быть реализован в промышленном масштабе.

2. Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с квадратной кислотой.

Реакцией даунорубицина (1), карминомицина (11) и доксорубицина (12) с диметилловым эфиром квадратной кислоты (3,4-диметоксициклобут-3-ен-1,2-дион) (13) при pH 7 после хроматографической очистки были получены моноамиды квадратной кислоты с даунорубицином (14), карминомицином (15) и доксорубицином (16) с выходами 63%, 51% и 48%, соответственно (Схема 2) Данные ^1H и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии приведены в таблице 1.

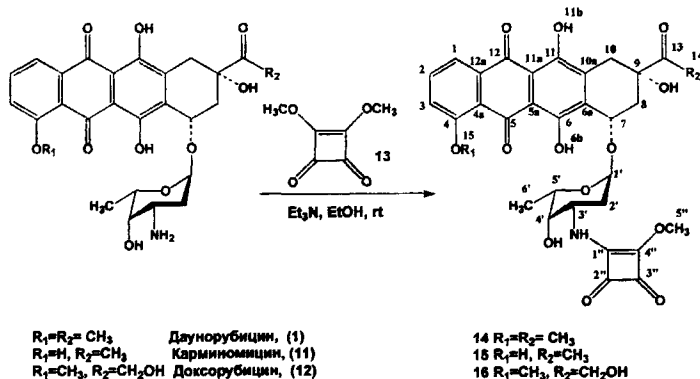


Схема 2. Синтез моноамидов квадратной кислоты с антрациклиновыми антибиотиками.

Таблица 1. Данные ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии для соединений 14-16

Номер атома	Группа	Соединение					
		14 (CDCl_3)		15 ($\text{CDCl}_3+\text{DMSO}=10:1$)		16 ($\text{DMSO}+\text{CDCl}_3$)	
		^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	CH	120.23	8.04	119.92	7.75	120.06	7.92
2	CH	136.21	7.80	137.51	7.65	136.41	7.74
3	CH	118.91	7.41	125.17	7.22	119.36	7.39
4	C	161.5	-	162.8	-	161.48	-
4a	C	121.8	-	116.31	-	121.06	-
5	C	187.46	-	190.78	-	187.33	-
5a	C	(111.82) ^c	-	(110.67) ^c	-	(111.64) ^c	-
6	C	(156.16) ^b	-	(157.12) ^b	-	(165.65) ^b	-
6a	C	(134.39) ^a	-	(134.75) ^a	-	(134.78) ^a	-
6b	OH	-	(13.29)	-	12.81	-	13.20
7	CH	68.68	5.41	68.76	5.20	68.54	5.23
8	CH ₂	35.33	2.34/2.18	35.69	2.25/2.05	36.25	2.27/2.09
9	C	77.07	-	76.61	-	76.85	-
10	CH ₂	34.18	3.28/2.98	33.91	3.09/2.96	34.25	3.12/2.98
10a	C	(134.94) ^a	-	(133.65) ^a	-	(134.54) ^a	-
11	C	(156.62) ^b	-	(157.12) ^b	-	(155.91) ^b	-
11a	C	(111.95) ^c	-	(111.51) ^c	-	(111.76) ^c	-
11b	OH	-	14.05	-	13.36	-	13.97
12	C	187.14	-	186.44	-	187.11	-
12a	C	135.88	-	137.44	-	135.66	-
13	C	212.02	-	212.07	-	213.98	-
14	CH ₃ (CH ₂)	25.18	2.45	25.07	2.34	(CH ₂) 65.45	4.68
15	CH ₃	57.1	4.10	-	-	57.15	3.95
1'	CH	99.45	5.61	100.5	5.42	99.83	5.44
2'	CH ₂	31.33	2.04/1.86 1	30.81	2.08/1.72	30.07	2.05/1.67
3'	CH	51.06	4.02	51.66	3.89	51.62	3.88
4'	CH	70.09	3.78	69.55	3.58	70.05	3.55
5'	CH	67.85	4.17	68.2	4.05	68.22	3.40
6'	CH ₃	17.08	1.38	17.38	1.24	17.45	1.22
7'	OH	-	3.52	-	ND	-	ND
8'	NH	-	6.83	-	ND	-	ND
1''	C	170.22	-	172.31	-	172.33	-
2''	C	190.03	-	189.46	-	189.46	-
3''	C	182.99	-	183.66	-	183.63	-
4''	C	178.46	-	177.57	-	177.56	-
5''	CH ₂	61.14	4.33	60.66	4.18	60.64	4.16

^{a,b,c} = возможно обращение отнесения сигналов

ND = не определено

Полученные моноамиды квадратной кислоты с антрадициновыми антибиотиками 14-16 за счет присутствия реакционноспособной метоксигруппы могут быть использованы для присоединения антрадицинов к различным молекулам, содержащим аминогруппы, в том числе, к антителам, иммуноглобулинам и т.д.

Реакцией производных **14** с даунорубицином (**1**) или **16** с доксорубицином (**12**) в EtOH при значении pH~8.0 были получены соответствующие симметричные диамиды квадратной кислоты с даунорубицином (**17**) и доксорубицином (**18**) (Схема 3). Соединения **17-18** были также получены реакцией двух эквивалентов даунорубицина (**1**) или доксорубицина (**12**) с **13** при значении pH реакционной смеси pH~8.0. Реакцией двух эквивалентов **14** или **16** с 1,6-гексаметилендиаминами были получены диамиды квадратной кислоты с даунорубицином (**19**) и доксорубицином (**20**), в которых остатки антрациклиновых антибиотиков разделены гексаметиленовым спейсером (Схема 4).

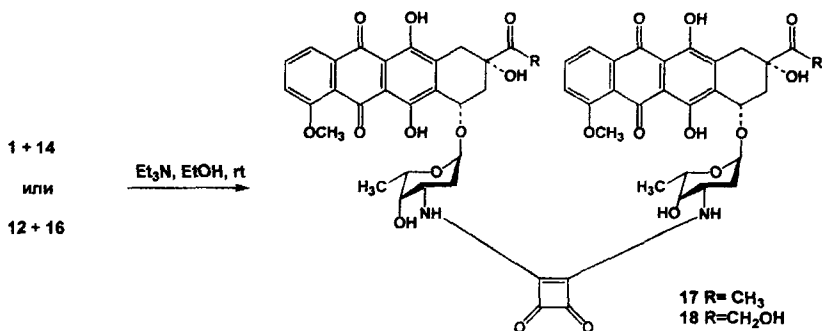


Схема 3. Синтез диамидов квадратной кислоты с антрациклиновыми антибиотиками.

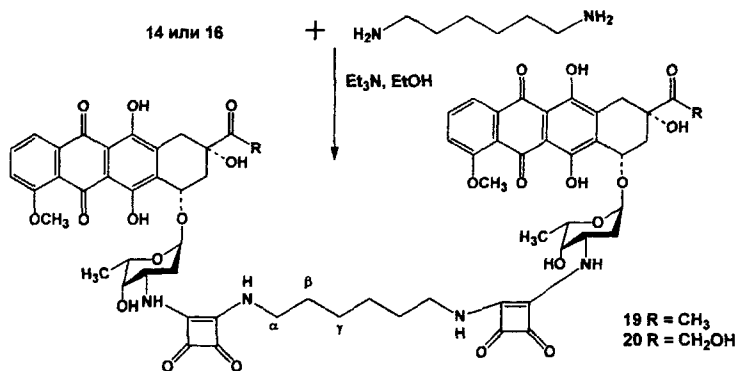


Схема 4. Синтез диамидов квадратной кислоты с антрациклиновыми антибиотиками

Чистота полученных производных **17-20** была изучена методами ТСХ и ВЭЖХ, структура этих соединений подтверждена методами MALDI масс-спектрометрии и ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии, с использованием метода COSY.

Антипролиферативная активность полученных производных **14-20** была изучена в Университете медицины им. Земмельвейса (г Будапешт, Венгрия) на культуре опухолевых клеток рака молочной железы линии MCF-7. Исследованные соединения обладали

сниженной антипролиферативной активностью (имели более высокие значения IC_{50} , где IC_{50} - концентрация соединения в нг/мл, вызывающая гибель 50% клеток), чем препарат сравнения карминомицин (11) Наибольшую антипролиферативную активность среди производных **14-20** обнаруживали симметричный амид квадратной кислоты и даунорубицина (**17**) (IC_{50} 108 6 нг/мл), а также амид квадратной кислоты и даунорубицина, в котором остатки даунорубицина разделены гексаметиленовым спейсером (**19**) (IC_{50} 87 нг/мл). Цитотоксичность этих производных ниже, чем у карминомицина (IC_{50} 48 28), однако, существенно выше по сравнению с соответствующим моноамидом **14** (IC_{50} >300 нг/мл). Более высокую антипролиферативную активность диамидов **17** и **19** по сравнению с моноамидом **14** можно объяснить тем, что механизм действия соединений **17** и **19** основан на бис-интеркаляции.

3. Получение новых производных антрациклиновых антибиотиков 3'-N-алкильного типа.

Среди 3'-N-алкильных производных антрациклиновых антибиотиков были описаны соединения, обладающие высокой противоопухолевой активностью, однако, соединения такого типа, содержащие по 3'-аминогруппе даунозамина гидрофильный полигидроксильированный фрагмент, ранее не были изучены Цель работы заключалась во введении по 3'-аминогруппе остатка даунозамина гидрофильных полигидроксильированных фрагментов, например, остатков глицеринового альдегида, моносахаридов или дисахаридов.

3.1 Восстановительное алкилирование антрациклиновых антибиотиков DL-глицериновым альдегидом.

На первом этапе работы была изучена возможность прямого алкилирования антрациклиновых антибиотиков глицериновым альдегидом

Реакция карминомицина (**11**) с небольшим избытком DL-глицеринового альдегида в присутствии $NaBH_3CN$ приводила к образованию 3'-N-(2'', 3''-дигидроксипропил)-13-(R, S)-дигидрокарминомицина (**21**) (Схема 5)

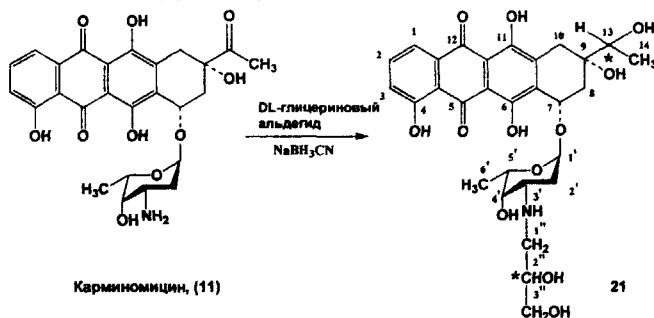


Схема 5. Восстановительное алкилирование карминомицина DL-глицериновым альдегидом.

Чтобы избежать восстановления 13-кетогруппы антибиотика в качестве исходных соединений использовались 13-диметилкеталь-14-бромодаунорубидина (22) или 13-диметилкеталь-14-бромокарминомицина (23), полученные соответственно из даунорубидина (1) или карминомицина (11) описанным методом. Соединения 22 или 23 вводили в реакцию восстановительного алкилирования с DL-глицериновым альдегидом. В результате гидролиза промежуточных алкилированных 13-диметилкетала-14-бромодаунорубидина (24а) или 13-диметилкетала-14-бромокарминомицина (25а) после хроматографической очистки на силианизированном силикагеле были получены соответствующие производные доксорубидина (24) или 14-гидроксикарминомицина (25) в виде смеси трех изомеров (Схема 6).

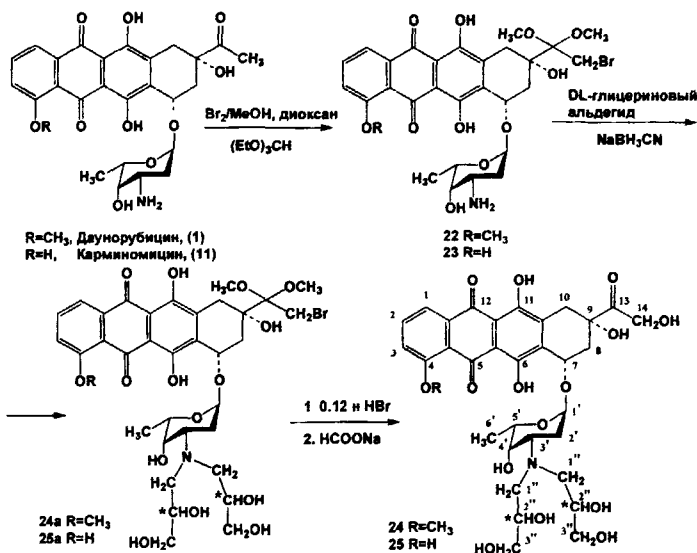


Схема 6. Восстановительное алкилирование 13-диметилкетала 14-бромодаунорубидина (22) и 13-диметилкетала-14-бромокарминомицина (23) DL-глицериновым альдегидом.

3.2 Восстановительное алкилирование антрациклиновых антибиотиков моносахаридами.

Восстановительное алкилирование даунорубидина (1) в присутствии NaBH₃CN моносахаридами D-глюкозой или D-галактозой приводило к образованию 3'-(1-деокси-D-глюцит-1-ил)-13-(R,S)-дигидродаунорубидина (26) и 3'-(1-деокси-D-галактит-1-ил)-13-(R,S)-дигидродаунорубидина (27), соответственно (Схема 7).

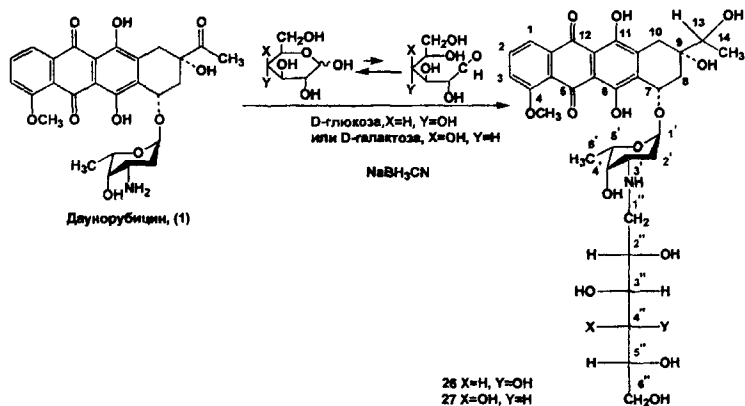


Схема 7. Восстановительное алкилирование даунорубина моносахаридами D-глюкозой и D-галактозой.

Чтобы избежать восстановления 13-кетогруппы антибиотика, в качестве исходных соединений использовались 13-диметилкеталь-14-бромдаунорубина (22) или 13-диметилкеталь-14-бромокарминомина (23) и D-глюкоза или D-галактоза.

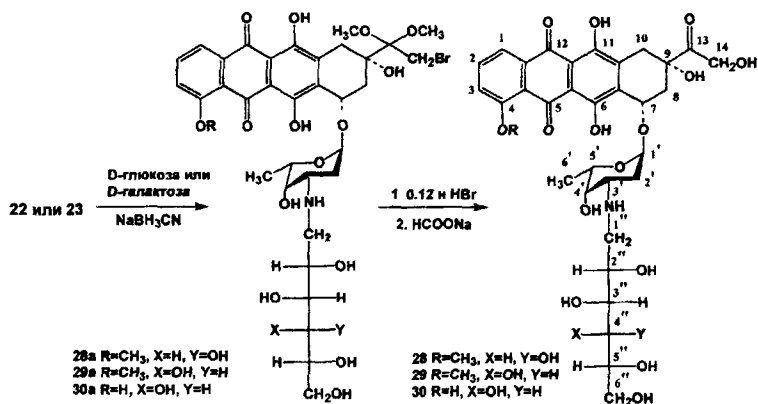


Схема 8. Восстановительное алкилирование 13-диметилкетала 14-бромдаунорубина (22) и 13-диметилкетала-14-бромокарминомина (23) моносахаридами.

После гидролиза промежуточных алкилированных 13-диметилкеталей-14-бромдаунорубина (28а, 29а) или 13-диметилкетала-14-бромокарминомина (30а) были выделены соответствующие производные доксорубина и 14-гидроксикарминомина: 3'-N-(D-1-дезоксиглюцит-1-ил)доксорубин (28), 3'-N-(D-1-дезоксигалактит-1-ил)доксорубин (29) и 3'-N-(D-1-дезоксигалактит-1-ил)-14-гидроксикарминомин (30) (Схема 8).

Интересно отметить, что в случае использования моносахаридов в реакции восстановительного алкилирования происходило образование соответствующих моноалкильных производных 28-30, в то же время алкилирование DL-глицериновым альдегидом в аналогичных условиях приводило к соответствующим диалкильным производным 24, 25. Вероятно, это можно объяснить большей активностью альдегидной группы в DL-глицериновом альдегиде по сравнению с альдегидной группой в D-глюкозе и D-галактозе или меньшим объемом вводимого заместителя в случае DL-глицеринового альдегида.

3.3 Синтез конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с D-галактозой

Одним из перспективных направлений химической модификации антрациклинов является получение конъюгатов с различными углеводами. Одной из целей нашей работы являлся синтез конъюгатов доксорубина и 14-гидроксикарминомицина, содержащих остаток D-галактозы, поскольку имеются литературные данные о наличии на опухолевых клетках галектинов - рецепторов к D-галактозе. Это позволяет рассчитывать на повышение избирательности противоопухолевого действия препаратов, содержащих остаток D-галактозы.

Для синтеза конъюгатов доксорубина и 14-гидроксикарминомицина с D-галактозой, в которых остаток D-галактозы присоединен к 3'-аминогруппе даунозамина через гидрофильный полигидроксильированный спейсер, использовали реакцию восстановительного алкилирования бром-кеталей 22 и 23 дисахаридами, содержащими остаток D-галактозы - мелибиозой или лактозой. По схеме, аналогичной Схеме 8, были получены соответствующие производные доксорубина и 14-гидроксикарминомицина: 3'-N-(α -D-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-O-D-1-дезоксиглюцит-1-ил)доксорубин (31), 3'-N-(α -D-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-O-D-1-дезоксиглюцит-1-ил)-14-гидроксикарминомицин (32) и 3'-N-(β -D-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O-D-1-дезоксиглюцит-1-ил)доксорубин (33) (Рис.2)

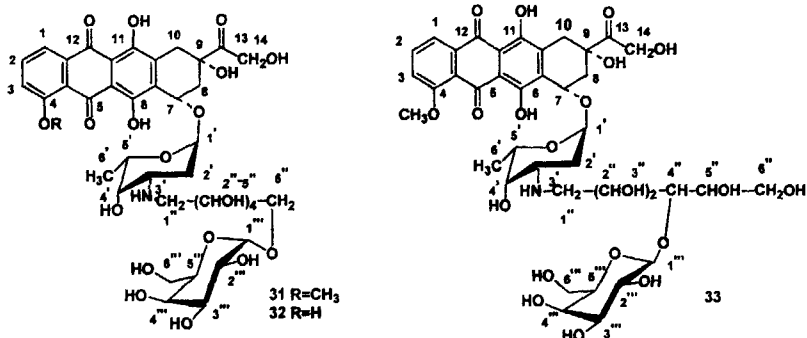


Рис.2. Конъюгаты доксорубина и 14-гидроксикарминомицина с D-галактозой, в которых остаток D-галактозы присоединен через гидрофильный спейсер

Были получены также конъюгаты доксорубина с D-галактозой, в которых остаток D-галактозы был присоединен к 3'-аминогруппе даунозамина через гидрофобный ароматический спейсер. Предварительно реакцией тетра-О-ацетил- α -D-галактопиранозилбромидом с ванилином или 4-гидроксibenзальдегидом были получены 3-метокси-4-O-[(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)окси]бензальдегид (**34**) и 4-O-[(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)окси]бензальдегид (**35**). Восстановительное алкилирование аминогруппы 13-диметилкетал-14-бромдаунорубина (**22**) соединениями **34** или **35** в присутствии NaBH_3CN приводило к соответствующим алкильным производным 13-диметилкетал-14-бромдаунорубина (**36**) или (**37**) соответственно. После деацетилирования остатка D-галактозы в присутствии NaOCH_3 и кислотного гидролиза промежуточных интермедиатов **38a** и **39a** были получены целевые 3'-N-[4'-O-[(β -D-галактопиранозил)окси]-3"-метокси]бензил]доксорубин (**38**) и 3'-N-[4'-O-[(β -D-галактопиранозил)окси]бензил]доксорубин (**39**) (Схема 9).

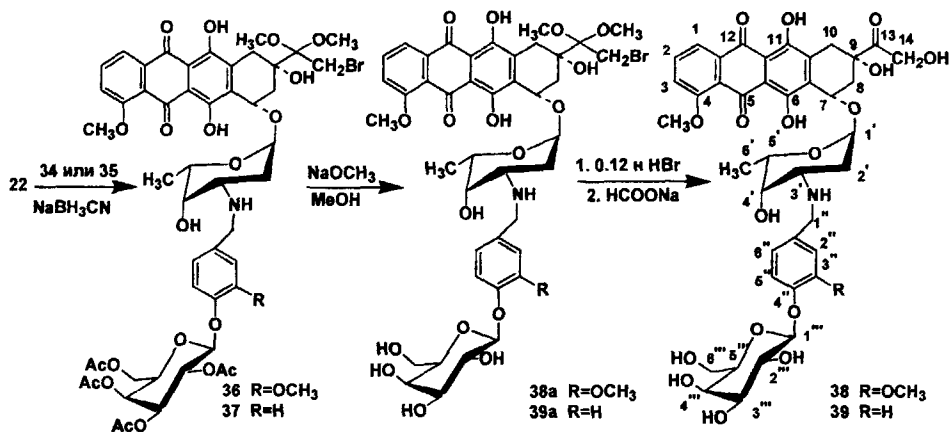


Схема 9. Синтез конъюгатов доксорубина с D-галактозой, в которых остаток D-галактозы присоединен через ароматический спейсер.

Как и в случае алкилирования моносахаридами, использование в реакции восстановительного алкилирования ароматических альдегидов, содержащих остаток D-галактозы, приводило к соответствующим моноалкильным производным, что возможно, связано со стерическими факторами.

Доказательство структуры соединений **21**, **24-33**, **38**, **39** было проведено методами ESI и MALDI масс-спектрометрии и ^1H -ЯМР-спектроскопии (Таблица 2).

Доказательство структуры полученных соединений осуществлено также кислотным гидролизом и сравнением с заведомыми образцами агликонов методом ТСХ. При кипячении в течение 1 ч в 1 N HCl соединения **21** образуется 13-(R, S)-дигидрокарминомицин,

соединений 26, 27 - 13-(R,S)-дигидродауномицинон, соединений 24, 28, 29, 31, 33, 38, 39 - адриаиминон, а соединений 25, 30, 32 - 14-гидроксикарминомицинон.

Таблица 2. Данные ^1H ЯМР спектроскопии для соединений 21, 24-33, 38, 39.

Номер атома	Соединение												
	21	24'	25'	26	27	28	29	30	31	32	33	38''	39''
	А	Б	Б	В	В	Б	Б	В	В	В	В	В	Б
Антрациклиноновая часть													
1	7.91	7.82	7.76	8.08	8.02	7.90	7.87	7.85	8.05	7.81	8.02	7.85	8.05
2	7.62	(2H), 7.64	7.82	7.72	7.78	7.64	7.62	7.60	7.73	7.61	7.70	7.60	7.72
3	7.34	(1H)	7.39	7.40	7.46	7.90	7.90	7.29	ND	7.31	7.39	7.85	7.40
4		3.99		3.98	3.98	3.98	3.97		3.97		3.98	3.97	3.93
7	5.41	5.33	5.03	5.42	5.37	4.95	4.94	5.13	5.45	5.11	5.40	4.93	5.42
8	3.02, 2.25/ 2.70, 2.42	2.20- 1.80	2.21- 1.85	2.26/ 2.60, 2.42	2.22/ 2.61, 2.35	2.15	2.15	2.48/ 2.73	2.84/ 2.54	2.48/ 2.74	2.83/ 2.51	2.18/ 2.15	2.75/ 2.50
10	3.60/ 3.37	3.73- 2.50	3.80- 2.90	3.58, 3.22/ 3.48, 3.22	3.49, 3.41/ 3.06, 3.06	3.43	3.43	3.47/ 3.35	3.58/ 3.47	3.49/ 3.37	3.56/ 3.43	2.97/ 2.10	3.52/ 3.38
13	4.17			4.10	4.15								
14	1.57	4.60	4.60	1.65/ 1.63	1.58/ 1.56	4.57	4.57	5.33	5.45, 5.38	5.35	5.45/ 5.39	4.58	5.32
Остаток даунозмина													
1'	5.82	5.44	5.51	5.84	5.82	5.32	5.32	5.55	5.81	5.61	5.78	5.32	5.82
2'	2.58/ 2.45	2.00- 1.25	2.21- 1.85	2.68/ 2.63	2.70/ 2.61	1.85/ 1.97	1.85/ 1.97	2.60	2.72/ 2.62	2.67/ 2.64	2.43	1.95/ 2.05	2.78/ 2.68
3'	4.83	3.60- 3.20	3.28	4.25	4.25	3.39	3.39	4.15	4.36	4.19	3.74	3.45	4.12
4'	4.94	3.70	3.80	ND ^d	4.69	3.55	3.55	4.37	4.54	4.39	4.13	4.12	ND
5'	4.73	4.09	4.18	4.74	4.74	4.16	4.16	4.63	4.72	4.67	4.64	4.17	4.45
6'	1.63	1.14	1.15	1.53/ 1.50	1.52/ 1.50	1.17	1.17	1.40	1.50	1.41	1.47	1.20	1.48
Полиольная часть													
1''	4.08	3.60- 3.20	3.30- 2.70	3.91/ 3.72	3.92/ 3.72, J _{gem} 12.7	2.98/ 2.93	3.03	3.92	4.04/ 3.84	3.85	3.50		
2''	4.27	ND	5.40- 5.28	4.92	4.50- 4.15	3.86	3.87	4.92	5.02	4.82	4.66		
3''	3.19	4.92	4.92	4.70		3.65	3.63	4.57	4.54	4.54			
4''				4.25- 4.50		3.09	3.10	4.15	4.63	4.38	4.64		
5''						3.75	3.85	4.45	4.64- 3.96	4.12 4.59	- 4.44		
6''				4.23		3.39	3.40	4.63					
Остаток D-галактозы													
1'''									5.15	5.37	5.40	5.57	5.30
2'''									4.36	4.54	4.64	3.88	4.65
3'''											-	4.52	4.20
4'''											4.44	4.77	4.68
5'''									4.64 - 3.96	4.12 - 4.59	4.54	4.12	4.18
6'''a											4.36	4.70	4.32
6'''b											4.36	4.80	4.28

* Сигналы в спектрах уширены

** Данные ^1H ЯМР для ароматических спейсеров соединений 38 (3-ОМе-4-оксibenзильный спейсер) 3.40 (2H, CH₂), 7.07 (1H, H-2"), 3.61 (3H, OMe), 5" (ND), 6" (ND), 38 (4-оксibenзильный спейсер) 3.52 (2H, CH₂), 6.98 (1H, H-2"), 7.44 (1H, H-3"), 7.44 (1H, H-5"), 6.98 (1H, H-6")

A Py-d₅, B DMSO-d₆, B Py-d₅+CF₃COOD, ND - не определено

3.4 Изучение антипролиферативной активности полученных производных

Изучение антипролиферативной активности производных доксорубина **31**, **33**, **38**, **39** на культуре опухолевых клеток мышиного лейкоза L1210 проводилось в Институте Рега Католического университета (г. Лёвен, Бельгия). Было показано, что эти соединения обладают цитотоксичностью на два порядка меньшей, чем доксорубин. Например, для соединения **31** IC_{50} составляет 21 μM , для соединения **33** IC_{50} составляет 24 μM , в то время как для доксорубина IC_{50} - 0 213 μM .

Изучение антипролиферативной активности производных доксорубина **24**, **29**, 14-гидроксикарминомина **25**, **30**, **32** и 13-(R,S)-дигидрокарминомина **21** в отношении чувствительных и резистентных опухолевых клеток линии рака молочной железы (MCF-7 и MCF-7Dox соответственно) и лейкоза (K562 и K562i/S9 соответственно) в сравнении с карминомином (**11**), 14-гидроксикарминомином и доксорубином (**12**) проводили также в НИИ канцерогенеза ГУ Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН (Таблица 3).

Таблица 3. Антипролиферативная активность (IC_{50} , нмоль) антрациклинов в отношении чувствительных (MCF-7, K562) и MDR-резистентных линий (MCF-7/Dox, K562i/S9) опухолевых клеток

	Соединение	MCF-7	MCF-7Dox	R/S ^{***}	K562	K562i/S9	R/S
Доксорубин и его производные	Доксорубин (12)	300*	3650	12.5	140	1990	14.0
	24				12800		
	29	>32000	ND	ND	15650	ND	ND
Карминомин и его производные	Карминомин (11)	90	90	1.0	60	60	1.0
	14-Гидроксикарминомин	1180	1220	1.03	180	190	1.05
	21				100		
	25				300		
	30	9170	11380	1.24	1180	1220	1.03
	32	ND	ND	ND	5850	14860	2.53

* IC_{50} , нмоль, концентрация соединения, вызывающая гибель 50% клеток

**R/S, индекс резистентности - отношение IC_{50} по отношению линий резистентных опухолевых клеток к IC_{50} линий чувствительных опухолевых клеток

Введение в молекулу антрациклинового антибиотика гидрофильного фрагмента по 3'-аминогруппе остатка даунозамина приводило к снижению антипролиферативной активности по сравнению с родительским антибиотиком. В то же время, в отличие от доксорубина (**12**) и его производных (**24**, **29**), карминомина (**11**), 14-гидроксикарминомина и его производных **30**, **32** были одинаково активны как в отношении чувствительных, так и в отношении резистентных линий опухолевых клеток линии рака молочной железы (MCF-7 и MCF-7Dox, соответственно) и лейкоза (K562 и K562i/S9, соответственно)

Клетки MCF-7/Dox и K562i/S9 обладали резистентностью по механизму типичной MDR, связанной с работой мембранного белка-насоса Pgp. При добавлении в среду

вепарамила, являющегося ингибитором белка Pgp, резистентные клетки MCF-7/Dox и K562i/S9 становились чувствительными к доксорубину и винкристину.

3.5 Изучение противоопухолевой активности полученных производных в экспериментах на животных.

Синтезированные производные доксорубина, содержащие остаток D-галактозы, присоединенный через полигидроксильированный (конъюгаты доксорубина с мелибиозой **31** и лактозой **33**) или ароматический спейсер (**38**, **39**) были изучены в лаборатории химиотерапии и фармакокинетики ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков при внутривенном введении мышам с лейкозом P388 (Таблица 4).

Таблица 4. Противоопухолевая активность соединений **31**, **33**, **38**, **39** в сравнении с доксорубином [при внутривенном введении мышам (линия BDF₁ C₅₇ × DBA₂, самцы) с лейкозом P388 через 24 ч после имплантации опухоли]

Соединение	Доза (мг/кг)	Режим введения (в/в)	Токсическая гибель	УПЖ (%)*
Контроль	-	-	0/10	0
Доксорубин (12)	7	Однокр.	0/6	70
31	20	Однокр.	0/6	79
31	40	Однокр.	0/6	118
33	40	Однокр.	0/6	65
38	60	Однокр.	0/6	44
39	60	Однокр.	0/6	59
Доксорубин (12)	2.3	q2 × 3**	4/7	
31	20	q2 × 3**	0/10	79
31	40	q2 × 3**	0/10	133

* УПЖ – увеличение продолжительности жизни по сравнению с контролем

В проведенных экспериментах наиболее активным оказалось производное доксорубина **31**, которое в эквитоксической дозировке не уступало доксорубину. Соединение **31** в сравнении с доксорубином было протестировано также при трехкратном режиме введения. В этих экспериментах конъюгат доксорубина с мелибиозой (**31**) обладал меньшей кумулятивной токсичностью по сравнению с доксорубином. Положительные результаты были получены при изучении в экспериментах *in vivo* 3'-N,N-ди-(2'', 3''-дигидроксипропил)доксорубина (**24**) и 3'-N-(D-1-дезоксигалактит-1-ил)-14-гидроксикарминомина (**30**). Соединение **24** при однократном введении в дозе 10 мг/кг по своей противоопухолевой активности не уступало доксорубину (доза 7 мг/кг), увеличивая продолжительность жизни мышей с лейкозом P388 на 108.1% (УПЖ для доксорубина составило 108.3%). Однократное внутривенное введение соединения **30** в дозе 12 мг/кг приводило к полному излечению мышей с лейкозом P388.

Таким образом, модификация антрациклиновых антибиотиков, приводящая к 3'-N-алкильным производным, является перспективным направлением для создания препаратов, обладающих преимуществами перед родительскими антибиотиками.

4. Конъюгаты доксорубина с галактоманнаном.

Одним из современных подходов в создании новых противоопухолевых препаратов является молекулярный дизайн и синтез так называемых веществ — про-лекарств. В этой связи перспективным является получение различных конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с полисахаридами. Полисахариды обычно обладают низкой токсичностью и иммуногенностью, являются биологически совместимыми и биологически деградируемыми соединениями. Этот подход может быть эффективен для направленной доставки препарата и улучшения терапевтического индекса.

Целью работы было получение водорастворимых конъюгатов доксорубина с полисахаридами, которые действовали бы по принципу про-лекарств, высвобождая доксорубин в условиях *in vivo*. В качестве полисахарида для конъюгации с доксорубином был выбран водорастворимый 1,4-β-D-галактоманнан (ГМ) (Фирма ProPharmaceuticals), природный полисахарид растительного происхождения, широко применяемый в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. По сравнению с другими полисахаридами, галактоманнан содержит в боковой цепи множество остатков галактозы, которые могут взаимодействовать с галактоз-специфическими рецепторами опухолевых клеток, такими как, например, галектины

Галактоманнан активировали реакцией периодатного окисления, с последующей очисткой полученного окисленного ГМ методом гель-фильтрации на Сефадексе G-25. Активированный ГМ вводили в реакцию с доксорубином, при этом происходило образование оснований Шиффа между альдегидными группами окисленного ГМ и 3'-аминогруппой доксорубина (DOX). На схеме 10 представлены возможные варианты образующихся структур на примере одной из окисленных субъединиц активированного ГМ.

Была проведена серия экспериментов, в которых варьировались степень окисления ГМ и количество вводимого в реакцию доксорубина. Было показано, что конъюгат доксорубина с ГМ был растворим в воде только при относительно невысоком содержании доксорубина (~5% весовых, определено на единицу массы высушенного порошка методом УФ спектроскопии при 490 нм). Полученный конъюгат доксорубина с ГМ очищали от не вступившего в реакцию доксорубина и низкомолекулярных примесей методом многократного диализа, дополнительную очистку конъюгата осуществляли методом гель-фильтрации на Сефадексе G-25.

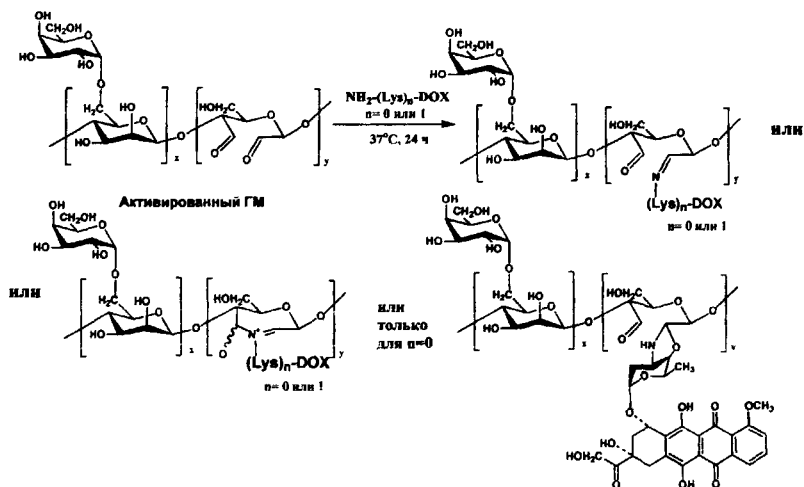


Схема 10. Возможные структуры конъюгатов доксорубицин+ГМ и 3'-N-L-лизилдоксорубицин+ГМ.

Чтобы увеличить содержание доксорубицина в конъюгате с галактоманнаном, был использован 3'-N-L-лизилдоксорубицин - гидрофильное производное доксорубицина, содержащее дополнительную аминогруппу по сравнению с доксорубицином. Синтез 3'-N-L-лизилдоксорубицина осуществлен в 4 стадии исходя из L-лизина и доксорубицина (12). Аминогруппы L-лизина защищали с помощью Fmoc-групп, карбоксильную группу активировали реакцией с N-гидрохисукцинимидом. Реакция доксорубицина с O-[N^α, N^ε-дифос-L-лизил]оксисукцинимидом с последующим удалением Fmoc-защитных групп морфолином приводила к 3'-N-L-лизилдоксорубицину с выходом 67% в расчете на доксорубицин. Полученный 3'-N-L-лизилдоксорубицин вводили в реакцию с активированным ГМ, при этом образование связи между 3'-N-L-лизилдоксорубицином и окисленным ГМ было возможно как по α-, так и по ε-аминогруппе 3'-N-L-лизилдоксорубицина (на схеме 10 не представлено) (Схема 10). Выделение и очистку полученного конъюгата 3'-N-L-лизилдоксорубицин+ГМ проводили аналогично конъюгату доксорубицин + ГМ (методами диализа и гель-фильтрации). Введение лизинового спейсера между доксорубицином и ГМ позволило повысить нагрузку доксорубицина в конъюгате до 10% (весовых, определено на единицу массы высушенного порошка методом УФ спектроскопии при 490 нм). Молекулярный вес полученных конъюгатов доксорубицин+ГМ и 3'-N-L-лизилдоксорубицин+ГМ был определен методом гель-хроматографии на колонке с Сефадексом G-200, предварительно прокалиброванной пуллуланами – стандартами для гель-хроматографии (MW 24000 – 100000 Да). Молекулярный вес конъюгата доксорубицин+ГМ, определенный этим методом, составил ~ 95000 Да, конъюгата 3'-N-L-лизилдоксорубицин+ГМ ~ 98000 Да, исходного ГМ ~ 92000 Да).

Методами ТСХ и ВЭЖХ с использованием стандартных образцов доксорубина и 3'-N-L-лизилдоксорубина было показано, что в условиях мягкого кислотного гидролиза (0.1 н HCl, 37°C, 20 ч) от конъюгата доксорубин+ГМ отщеплялся доксорубин, а от конъюгата 3'-N-L-лизилдоксорубин+ГМ – соответственно 3'-N-L-лизилдоксорубин.

Данные об антипролиферативной активности полученных конъюгатов доксорубин+ГМ и 3'-N-L-лизилдоксорубин+ГМ в отношении трех линий опухолевых клеток: мышинной меланомы B16-F1, рака молочной железы MCF-7 и рака кишечника HT-29 предоставлены фирмой ProPharmaceuticals (таблица 5).

Таблица 5. Антипролиферативная активность доксорубина и конъюгатов доксорубин+ГМ и 3'-N-L-лизилдоксорубин+ГМ.

Соединение	IC ₅₀ , мг/мл		
	B16-F1	MCF-7	HT-29
Доксорубин	0.01-0.02	0.08-0.12	0.2-0.3
Доксорубин+ГМ	0.5-0.8	3.0-4.4	13-20
3'-N-L-Лизил-доксорубин+ГМ	>50	>50	>50

IC₅₀ - концентрация соединения, вызывающая гибель 50% клеток

Как видно из представленных данных, конъюгат доксорубин+ГМ обладал цитотоксичностью на 1-2 порядка меньшей по сравнению с доксорубином. Если пересчитать полученные данные с учетом количества содержащегося в конъюгате доксорубина, можно сделать вывод о том, что полученный конъюгат действительно представляет собой депо-форму доксорубина.

Для выявления различий в механизмах действия антрациклиновых антибиотиков и высокоактивного отечественного противоопухолевого углеводсодержащего антибиотика группы ауреловой кислоты оливомидина, а также выяснения роли углеводных остатков, исследовали оливомидин, его агликон оливин в сравнении с доксорубином. Кислотный гидролиз оливомидина до агликона оливина проводили кипячением антибиотика в смеси 0.2 н H₂SO₄ в MeOH-H₂O (1:1) в течение 2 ч. Оливин был очищен методом кристаллизации, охарактеризован методом ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии. Изучение антипролиферативной активности оливомидина и оливина проводилось в НИИ канцерогенеза ГУ Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН. Было показано, что оливомидин: 1) вызывает апоптоз опухолевых клеток человека различной тканевой принадлежности, 2) не активен в отношении опухолевых клеток рака молочной железы MCF-7/Dox и лейкоза K562i/S9, устойчивых к доксорубину, 3) подавляет генную транскрипцию. Полученные данные позволяют предположить, что механизм действия оливомидина, в отличие от доксорубина, основан на его способности ингибировать транскрипцию. Агликон оливомидина не вызывал цитотоксичность и не блокировал транскрипцию.

ВЫВОДЫ.

1. Разработан новый способ препаративного получения карминомицина исходя из даунорубицина с общим выходом ~25-28%, который позволяет получать карминомицин с чистотой более 90% (по данным ВЭЖХ) без использования хроматографии на каждой из стадий синтеза и может быть реализован в промышленном масштабе

2. Получены новые производные – амиды даунорубицина, доксорубицина и карминомицина с квадратной кислотой, симметричные диамиды квадратной кислоты с антрациклиновыми антибиотиками и симметричные диамиды квадратной кислоты с антрациклиновыми антибиотиками, в которых остатки антибиотиков разделены гексаметиловым спейсером. Среди синтезированных соединений наибольшей антипролиферативной активностью обладали диамиды антрациклиновых антибиотиков с квадратной кислотой.

3. Разработан новый метод введения в молекулу антрациклинового антибиотика остатков моно- и дисахаридов реакцией восстановительного алкилирования 3'-аминогруппы остатка даунозамина.

4. Впервые осуществлен синтез производных, содержащих по 3'-аминогруппе остатка даунозамина гидрофильный полигидроксильированный фрагмент (остаток глицеринового альдегида или моносахарида), а также получены новые конъюгаты доксорубицина и 14-гидроксикарминомицина с D-галактозой, в которых остаток D-галактозы присоединен через гидрофильный или гидрофобный ароматический спейсер.

5. Показано, что карминомицин и его производные активны в отношении резистентных опухолевых клеток линий MCF-7/Dox и K562i/S9. Установлено, что некоторые из синтезированных соединений - 3'-N-(- α -D-1-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-O-D-1-дезоксиглюцит-1-ил)доксорубицин (31) и 3'-N-(D-1-дезоксигалактит-1-ил)-14-гидроксикарминомицин (30) обладают преимуществами перед исходными антибиотиками в опытах на мышах с лейкозом P388.

6. Разработан метод и получены новые депо-формы доксорубицина – конъюгаты с высокомолекулярным полисахаридом галактоманнаном, отличающиеся нагрузкой антибиотика, а также способом его присоединения к галактоманнану. Показано, что полученные водорастворимые конъюгаты сохраняют антипролиферативную активность в отношении трех линий опухолевых клеток.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Олсуфьева Е.Н., Тевяшова А.Н., Преображенская М.Н. Способ получения антибиотика карминомицина или его гидрохлорида.// Решение о выдаче патента РФ на изобретение № 2004105794 от 27.02.04.
2. Олсуфьева Е.Н., Штиль А.А., Тевяшова А.Н., Преображенская М.Н. Карминомицин и его производные // Российский биотерапевтический журнал.- 2004 - №1.- С. 28
3. Тевяшова А.Н., Олсуфьева Е.Н., Штиль А.А., Преображенская М.Н. Получение новых углеводсодержащих производных антрациклиновых антибиотиков.// Российский биотерапевтический журнал.- 2005 - №1.- С. 72.
4. Симонова В.С., Самусенко А.В., Филиппова Н.А., Тевяшова А.Н., Лынив Л.С., Кулик Г.И., Чехун В.Ф., Штиль А.А. Оливомидин вызывает апоптоз опухолевых клеток и подавляет р53-индуцированную транскрипцию // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2005.- №4.- С. 451-455.
5. Olsufyeva E.N., Tevyashova A.N., Treshalin I.D., Preobrazhenskaya M.N., Platt D., Klyosov A. Synthesis and antitumor activity of new D-galactose containing derivatives of doxorubicin.// Carbohydrate Research - 2003.- V.338 - P. 1359-1367.
6. Tevyashova A. N., Shtil A.A., Olsufyeva E.N., Simonova V.S., Samusenko A.V., Preobrazhenskaya M.N. Carminomycin, 14-hydroxycarminomycin and its novel carbohydrate derivatives potently kill human tumor cells and their multidrug resistant variants // Journal of Antibiotics - 2004.- V. 57, №2 - P. 143-150.
7. Tevyashova A.N., Sztaricskai F., Batta G., Herczegh P., Jency A. Formation of squaric acid amides of anthracycline antibiotics Synthesis and cytotoxic properties // Bioorg & Med Chem Lett - 2004 - V. 14 - P. 4783-4789.
8. Olsufyeva E.N., Tevyashova A.N., Treshalin I.D., Treshalin M.I., Preobrazhenskaya M.N., Klyosov A., Platt D. Synthesis and anticancer activity of new conjugates of D-galactose and doxorubicin // 8th International Conference on Chemistry of Antibiotic and Related Microbial Products (ICCA-8) - Токио, Япония - 2002 -Тезисы докладов.- Р. 44.
9. Олсуфьева Е.Н., Тевяшова А.Н., Преображенская М.Н. Получение новых углевод-содержащих аналогов антибиотиков-антрациклинов путем восстановительного алкилирования аминогруппы остатка даунозимида // 4-ый Всесоюзный симпозиум по органическому синтезу “Органическая химия – упадок или возрождение” - Углич - 2003 - Тезисы докладов - С. 118.
10. Tevyashova A.N., Shtil A.A., Olsufyeva E.N., Preobrazhenskaya M.N. Novel derivatives of anthracycline antibiotics modified at carbohydrate moiety.// 22nd International Carbohydrate Symposium.// Глазго, Великобритания.- 2004.- Тезисы докладов - Р. 30.
11. Тевяшова А.Н., Олсуфьева Е.Н., Штиль А.А., Преображенская М.Н. Новые конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с моно-, ди- и полисахаридами // 3-ий Московский Международный конгресс “Биотехнология: состояние и перспективы развития”.- Москва.- 2005.- Тезисы докладов.- Т. 1.- С. 144-145.
12. Олсуфьева Е.Н., Тевяшова А.Н., Штиль А.А., Преображенская М.Н. Пути создания новых антрациклиновых антибиотиков, преодолевающих резистентность опухолевых клеток.// 3-ий Московский Международный конгресс “Биотехнология: состояние и перспективы развития”.- Москва - 2005 - Тезисы докладов - Т. 1 - С. 174-175

Принято к исполнению 18/05/2005
Исполнено 19/05/2005

Заказ № 882
Тираж: 100 экз..

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru

0 5 - 1 3 7 9 6

РНБ Русский фонд

2006-4

8341