



УДК 577.181

СИНТЕЗ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО N-АЦИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ДОКСОРУБИЦИНА

© 1999 г. В. М. Щербаков, В. М. Девиченский*,
Е. А. Воронцов*, С. Л. Кузнецов*, Л. Н. Крюков*

Институт биологической медицины,
117815, Москва, ул. Акад. Опарина, 4;

* Центр медико-биологических и экологических проблем РАЕН, Москва

Поступила в редакцию 25.09.98 г. Принята к печати 05.10.98 г.

Проведено модифицирование доксорубицина путем его N-ацилирования 3-гемисукцинатом эстрогена. Показана высокая антипролиферативная активность полученного соединения *in vitro* на клеточных культурах аденокарциномы молочной железы MCF-7 и гепатомы HepG2 человека.

Ключевые слова: доксорубицин; эстрон; раковая клетка; противоопухолевая активность; гидрофобность.

Успех лекарственной терапии злокачественных новообразований во многом зависит от избирательности цитостатического/цитотоксического воздействия противоопухолевых препаратов. Одним из многих направлений по решению этой задачи является химическая модификация молекул известных противоопухолевых препаратов, приводящая к изменению их гидрофобности. Описаны примеры успешного использования гидрофобизованных производных антибиотиков в экспериментах на культурах раковых клеток и в терапевтической практике. Так, при терапии первичного и метастатического рака печени, аденокарцином прямой и сигмовидной кишки, а также аденокарциномы поджелудочной железы не без успеха применялось стиреновое производное цитостатика неокарциностатина (SMANCS) [1, 2]. Имеются сведения об использовании в экспериментах *in vitro* и *in vivo* N-арахидоноильного производного даунорубицина [3]. Ограничение на применение в клинике подобных препаратов связано с их плохой растворимостью в водных средах. Поэтому такие соединения могут быть введены пациенту только регионально в неполярном растворителе. В качестве последнего в настоящее время широко используется рентгено-контрастное вещество Lipiodol Ultrafluid [4]. Опыты *in vitro* и клинические исследования свидетельствуют о том, что некоторые полусинтетические "химерные" препараты обладают достаточно вы-

сокой противоопухолевой активностью и существенно сниженной системной токсичностью [5].

Мы осуществили синтез соединения (IV) – N-ацильного производного – широко известного в клинической практике цитостатика антрахинонового ряда – доксорубицина (III). В качестве кислотной компоненты использован 3-гемисукцинат эстрогена (I) [6]. Химическая модификация доксорубицина (III) по аминогруппе проведена стандартным (N-гидрокси-сукцинимидным) методом активированных эфиров с участием DCC [7] (схема).

Спектры поглощения полученного конъюгата доксорубицин–эстрон (IV) отражают особенности спектров поглощения исходных соединений кислоты (I) и амина (III). В спектре ¹H-ЯМР амида (IV) присутствуют сигналы групп протонов, характерные для антрахинонового, стероидного, сукцинатного и углеводного фрагментов.

Соединение (IV) характеризуется выраженной гидрофобностью по сравнению с доксорубицином (III), о чем свидетельствует его крайне малая растворимость в воде.

При определении цитотоксичности *in vitro* на культурах клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (рис. 1) полученное вещество (IV) проявило более высокую активность, чем исходный доксорубицин (III). Аналогичный результат наблюдался и в опытах с клетками гепатомы человека HepG2 (рис. 2).

Более выраженная способность соединения (IV) ингибировать пролиферацию раковых клеток обеих линий, по сравнению с доксорубицином (III), по-видимому, объясняется:

1) Значительным различием в степени гидрофобности тестируемых соединений. Следстви-

Сокращения: AFP – альфа-фетопротейн; HONSi – N-гидрокси-сукцинимид; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид.

* Автор для переписки.

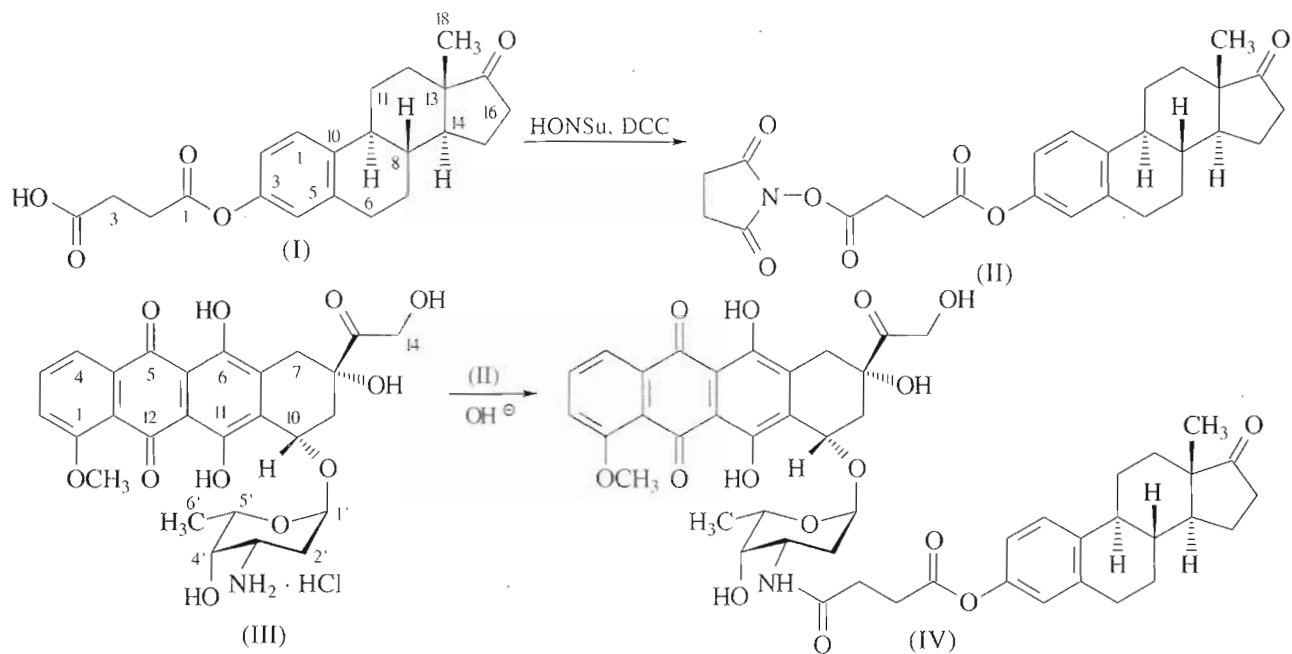


Схема.

ем этого может быть более облегченный эндоцитоз соединения (IV) в клетки-мишени. При этом речь может идти как о нерецепторном, так и о рецепторном эндоцитозе конъюгата (IV). Известно, например, что клетки MCF-7 и HepG2 способны секретировать онкофетальный белок *альфа*-фетопротейин (AFP) [8], который образует нековалентный комплекс с некоторыми стероидными гормонами, в частности с эстроном [9]. С другой стороны, показано, что AFP, неся на себе лиганды, подобные стероидным гормонам, может проникать в опухолевые клетки некоторых видов в соответствии с механизмом рецепторного эндоцитоза [10]. К таким клеткам относятся, в частности, и упомянутые выше линии клеток, экспрессирующие рецепторы, специфические к AFP [11].

2) *Образованием комплекса соединения (IV) с рецептором/рецепторами гормонов.* Использование лигандов, связанных с цитотоксическими/цитостатическими агентами, для селективного воздействия на клетки-мишени хорошо известно. В частности, показан избирательный противоопухолевый эффект иммунотоксина, созданного на основе ковалентного конъюгата гелонина (белка, инактивирующего рибосомы) с моноклональными антителами к AFP или F(ab')₂-фрагменту этого белка, на клетки гепатомы человека HuH-7, но не на клетки HuH-13, не способные секретировать мембраносвязанный AFP [12]. Для адресной доставки цитостатиков в опухолевые клетки используют также ковалентные конъюгаты моноклональных антител к AFP с доксорубицином

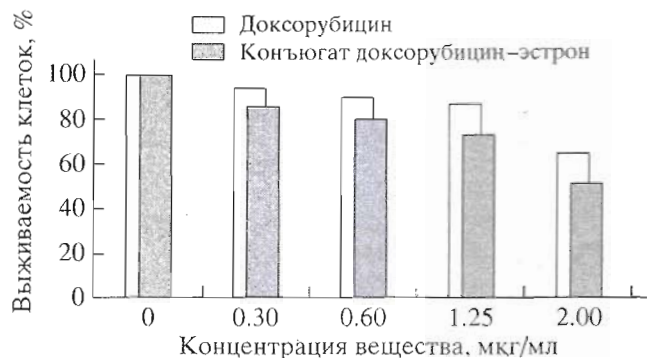


Рис. 1. Влияние доксорубицина (III) и конъюгата доксорубицин-эстрон (IV) на пролиферацию клеток MCF-7 аденокарциномы молочной железы человека.

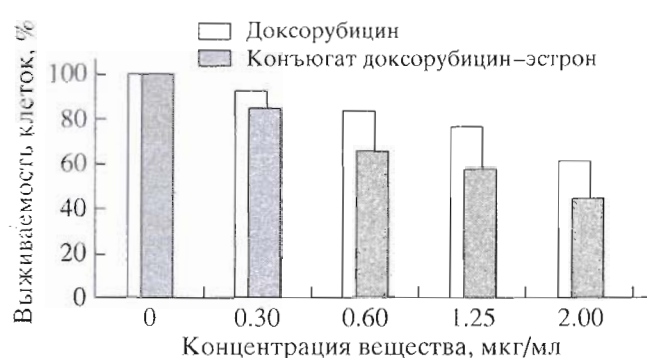


Рис. 2. Влияние доксорубицина (III) и конъюгата доксорубицин-эстрон (IV) на пролиферацию клеток HepG2 гепатомы человека.

[13], дауномицином [14], цисплатином [15], митомицином С [16]. Для опухолевых клеток, в частности для клеток HerG2, показана увеличенная экспрессия мембранного глюкокортикоидного рецептора, лигандом для которого, помимо глюкокортикоидов, является и эстрон [17].

3) *Большой стабильностью конъюгата доксорубин-эстрон (IV) к действию протеолитических цитоплазматических ферментов.* Например, было показано, что свободный доксорубин (III) при инкубации с некоторыми культурами клеток довольно быстро претерпевает изменения, приводящие к образованию нефлуоресцирующих и неактивных продуктов [18].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При синтезе и биологических испытаниях применяли следующие основные реактивы и материалы: 3-гемисукцинат эстрогена (Sigma, США), *N*-гидроксисукцинимид (HONSu) (Aldrich, США), DCC (Ferak, Зап. Берлин), гидрохлорид доксорубина (Sigma, США и Ферейн, Россия), среду для культивирования клеток DMEM, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) (Aldrich, США), пенициллин, стрептомицин (Sigma, США), DMSO (Merck, ФРГ). Остальные реактивы и растворители – отечественного производства.

Для проведения ТСХ применяли пластины Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Alufolien (Merck, ФРГ). Детекция пятен – в УФ-свете при 254 нм и при дневном освещении.

Для колоночной хроматографии использовали Kieselgel 60 (0.063–0.200 мм) (Fluka AG, Швейцария).

Температуры плавления определяли на приборе Voetius (ГДР) (без исправления).

Спектры ¹H-ЯМР получали на приборе Varian VXL-400 (США) в DMSO-*d*₆ (Fluka AG, Швейцария) с использованием в качестве внутреннего стандарта – остаточного сигнала растворителя (δ 2.49 м.д.). Приведены сигналы протонов основных групп (δ, м.д.) и значения констант спин-спинового взаимодействия (*J*) в герцах. При описании формы сигналов использованы сокращения: с – синглет; д – дублет; т – триплет; м – мультиплет; дд – дублет дублетов; уш. с – уширенный синглет.

ИК-спектры получали на спектрофотометре Specord M80 (Carl Zeiss Jena, ГДР). Образцы были запрессованы с KBr в вакуумной пресс-форме. При описании интенсивности и формы полос поглощения (приведены частоты характеристических колебаний) используются сокращения: с. – сильная; ср. – средняя; сл. – слабая; оч. ш. – очень широкая; пл. – плечо.

Поглощение в УФ и видимой областях измеряли на спектрофотометрах Labsystem (Финляндия) и Hitachi 557 (Япония). Величины ε приведены в М⁻¹ см⁻¹.

Культивирование клеток MCF-7 и HerG2 проводили в пластиковых культуральных флаконах

(Corning Costar, США) при 37°C в увлажненной атмосфере (5% CO₂) в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Для оценки биологической активности использовали 96-луночные планшеты той же фирмы.

Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста по методу Мосманна [19].

***N*-Оксисукцинимидный эфир 3-гемисукцината эстрогена (II).** К раствору 0.150 г (4.05 × 10⁻⁴ моль) 3-гемисукцината эстрогена (I) и 0.060 г (5.21 × 10⁻⁴ моль) HONSu в 8 мл сухого 1,4-диоксана при перемешивании и комнатной температуре прибавляли раствор 0.100 г (4.85 × 10⁻⁴ моль) DCC в 2 мл того же растворителя. Образовавшуюся вскоре суспензию перемешивали 4 ч и фильтровали. Осадок промывали 1,4-диоксаном (5 мл × 2). Объединенные маточный и промывной растворы упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 20 мл этилацетата при 45°C и декантировали от нерастворившейся части в делительную воронку. Этилацетатный раствор, охлажденный до комнатной температуры, промывали 0.15 н. раствором NaHCO₃ водой (10 мл × 2) и сушили безводным Na₂SO₄. Затем раствор фильтровали и упаривали в вакууме. Выход активированного эфира (II) 0.19 г. R_f 0.55 (в этилацетате). Далее продукт реакции (II) использовали без дополнительной очистки.

(8*S*-цис-)-7,8,9,10-Тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксиацетил)-1-метокси-16-[[[3'-эстра-1,3,5(10)-триен-17-он-3-оксикарбонил]пропанамило]-2',3',6'-тридезоксид-α-L-липсо-гексапирано-зил]окси]нафтацен-5,12-дион (IV). К раствору 0.20 г (3.4 × 10⁻⁴ моль) гидрохлорида доксорубина (III) в 20 мл воды при комнатной температуре прибавляли 20 мл 0.15 н. раствора NaHCO₃ и перемешивали 5 мин. Затем постепенно приливали 20 мл 1,4-диоксана и несколько минут перемешивали. К полученному раствору основания доксорубина прибавляли раствор 0.180 г (3.84 × 10⁻⁴ моль) активированного эфира (II) в 20 мл 1,4-диоксана и продолжали перемешивание еще 4 ч. Реакционный раствор подкисляли 0.1 н. раствором HCl до pH 2.5–3 и фильтровали через мелкопористый стеклянный фильтр. Отгоняли в вакууме почти весь 1,4-диоксан при температуре до 45°C и добавляли 15 мл воды. Осадок суспендировали и отделяли фильтрованием через стеклянный фильтр. Промывали его водой, эфиром, *n*-пентаном (10 мл × 2) и сушили в вакууме. Получали 0.24 г (78%) технического продукта (IV), который дополнительно очищали на колонке с силикагелем (1 × 18 см). В качестве элюента использовали 1,4-диоксан. Фракции, содержащие амид (IV), собирали и упаривали в вакууме; R_f 0.69 (в 1,4-диоксане); 0.64 (в 95% этаноле). Очищенный продукт (IV) суспендировали в эфире, отфильтровывали и сушили в вакууме. Получали 0.13 г (42%) темно-красного целевого соединения (IV), т. пл. 156–163°C.

Спектр ¹H-ЯМР: 0.84 (с, 3H, CH₃18); 1.18 (д, 3H, J 6.9, CH₃6'); 2.45, 2.64 (2м, 2H, 2H, -OOC-CH₂-CH₂-CON-); 3.99 (с, 3H, OCH₃); 4.57 (уш. с, 2H, H14, агликон); 6.68 (д, 1H, J 1.6, H4, стероид); 6.72 (дд, 1H, J_{2,1} 8.8, J_{2,4} 2.5, H2, стероид); 7.16 (д, 1H, J 8.7, H1, стероид); 7.50 (м, 1H, Ag, агликон); 7.79 (т, 1H, J 8.0, Ag, агликон); 7.88 (д, 1H, J 7.9, Ag, агликон); 13.28, 14.05 (2с, 1H, 1H, 2НО-Ag). ИК-спектр (ν, см⁻¹): 3430 оч. ш. с. (ОН связ.); 2975 пл. сл. (Ag-OCH₃); 2932 с. (CH₂); 1755 пл. (C=O, 5-чл. цикл); 1740 с. (C=O); 1616 с. (C=O, хелатированный хинон); 1580 с., 1495 ср. (C-C аром.); 1155 ср. (COOAg). УФ-спектр (E_{1OH}), λ_{max}, нм (ε): 582 (1350), 530 (7200), 496 (12200), 479 (11900), 288 (8400), 250, 234.

Определение антипролиферативной активности доксорубина (III) и конъюгата доксорубин-эстрон (IV). Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и клетки гепатомы человека HepG2 параллельно высевали в 96-луночные планшеты для микротитрования по 15 × 10³ клеток в лунку; вносили растворы гидрохлорида доксорубина (III) и соединения (IV) по лункам в различных концентрациях и инкубировали в стандартных условиях культивирования клеток в течение 72 ч. За 2 ч до окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора МТТ в среде для культивирования клеток в концентрации 1 мг/мл. После развития окраски среду удаляли, выпавшие кристаллы формазана растворяли в 150 мкл DMSO и измеряли интенсивность окраски по поглощению при 540 нм. Выживаемость клеток оценивали в процентах от величины поглощения для соответствующего контроля.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Е.И. Дудич (Институт инженерной иммунологии) и к.б.н. Г.В. Луценко (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) за любезно предоставленные линии клеток человека HepG2 и MCF-7. Авторы также глубоко признательны к.х.н. И.П. Яковлеву (Институт ор-

ганической химии им. Н.Д. Зелинского РАН) за получение и помощь при интерпретации ИК-спектров и д.х.н. В. В. Негребецкому (НИИ химических средств защиты растений) за получение данных спектроскопии ¹H-ЯМР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takeshita J., Maeda H., Kanamaru R. // *Gan.* 1992. V. 73. P. 278-284.
2. Konno T., Maeda H., Iwai K. // *Cancer (Phila.)*. 1984. V. 54. P. 2367-2374.
3. Deutsch H.F., Tsukada Y., Sasaki T., Hirai H. // *Cancer Res.* 1983. V. 43. P. 2668-2672.
4. Konno T. // *Cancer (Phila.)*. 1990. V. 66. P. 1897-1903.
5. Deutsch H.F. // *Adv. Cancer. Res.* 1991. V. 56. P. 253-312.
6. Drasar P., Cerny I., Pouzar V., Havel M. // *Coll. Czechoslovak Chem. Commun.* 1984. V. 49. P. 306-312.
7. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наук. думка, 1987. 264 с.
8. Villacampa M.T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. V. 122. P. 1322-1327.
9. Allen S.H., Bennet J.A., Mizejewski C.J. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1993. V. 1202. P. 135-142.
10. Suzuki Y.H., Taga H., Ishizuki K. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1983. V. 417. P. 224-239.
11. Uridel J., Laborda J., Naval J. *Biological Actives of AFP.* CRC Press, 1989. II. P. 113-116.
12. Masuda K., Takahashi K., Hirano K. // *Tumor Biol.* 1994. V. 15. P. 175-183.
13. Konno H., Suzuki H., Tadakuma T. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 4471-4477.
14. Tsukada Y., Ohkawa K., Hibi N. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 4293-4295.
15. Hata Y., Takada N., Sasaki F. // *J. Pediatr. Surg.* 1992. V. 27. P. 724-727.
16. Kato Y., Tsukada Y., Hara T. // *J. Appl. Biochem.* 1983. V. 5. P. 313-319.
17. Lui W.Y. // *Hepatology.* 1993. V. 18. P. 1167-1174.
18. Белоусова Ю.В., Шмырёв И.И., Посыпанова Г.А., Москалёва Е.Ю., Северин С.Е., Михайлова Л.И., Кириличников М.П., Северин Е.С., Скрябин К.Г. // *Молекуляр. биология.* 1997. Т. 31. С. 118-123.
19. Mosmann T. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 65. P. 55-63.

The Synthesis and Antiproliferative Activity of a New N-Acyl Derivative of Doxorubicin

V. M. Shcherbakov*, V. M. Devichenskii**, E. A. Vorontsov**, S. L. Kuznetsov**, and L. N. Kryukov**

*Institute of Biological Medicine, ul. Akademika Oparina 4, Moscow, 117815 Russia

**Center of Medicobiological and Ecological Problems, Russian Academy of Natural Sciences, Simferopolskii bul' v. 8, Moscow, 113149 Russia

Doxorubicin was acylated with estrone 3-hemisuccinate. The modified derivative exhibited high antiproliferative activity *in vitro* toward cell cultures of the MCF-7 human mammary adenocarcinoma and HepG2 human hepatoma.

Key words: antitumor activity, cancer cell, doxorubicin, estrone, hydrophobicity

To whom correspondence should be addressed.