



УДК 577.07:577.352.2:616-006

ЛИПИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ САРКОЛИЗИНА, МЕТОТРЕКСАТА И РУБОМИЦИНА

© 1996 г. Е. Л. Водовозова, П. Ю. Никольский, И. И. Михалев, Ю. Г. Молотковский[#]*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 20.12.95 г.

С целью изменения фармакокинетических свойств известных противоопухолевых препаратов – сарколизина, рубомицина и метотрексата – синтезированы их липидные производные с остатками *rac*-1,2-диолеилглицерина и гептадецилового спирта. Получен также липидный аналог с простыми эфирными связями в глицериновом остатке – 1-октадецил-2-метил-3-сарколизил-*sn*-глицерин, липидная часть молекулы которого сама представляет собой антинеопластическое вещество.

Ключевые слова: цитотоксические вещества, антинеопластическая активность, химиотерапия злокачественных новообразований, липидные производные противоопухолевых препаратов, липиды с простыми эфирными связями, липосомы.

Эффективность терапевтического применения противоопухолевых препаратов существенно ограничивается их высокой и зависящей от дозы токсичностью для нормальных тканей, в особенности для тканей сердца и костного мозга. В последние годы с целью направленной доставки противораковых лекарств к клеткам злокачественных опухолей начали интенсивно исследоваться липосомы и липидные микрокапли (наносферы) [1–4]. Так, большое количество работ посвящено изучению противоопухолевого действия липосом различной “архитектуры”, содержащих во внутреннем объеме доxorубицин (см., например, [5–7]). Ведутся также исследования по применению липосомных форм даунорубицина (рубомицина) [8], метотрексата [2], цисплатина [9], блеомицина [10] и др.

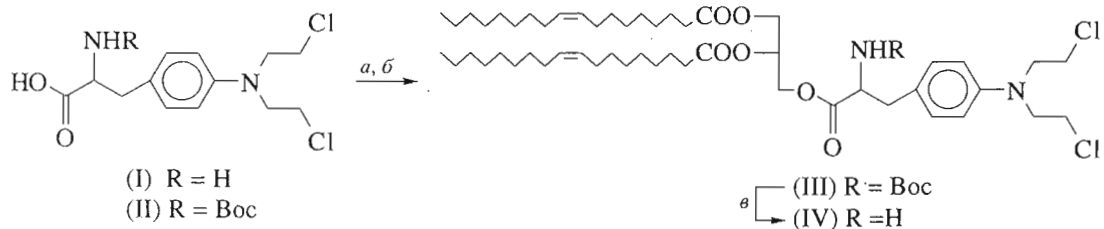
Токсическое воздействие на организм в целом лекарств, заключенных внутрь липосом или наносфер, ослабляется в первую очередь за счет уменьшения их концентрации в кровотоке. Кроме того, цитоплазматические мембраны злокачественных клеток сильно отличаются по своей структуре от мембран нормальных клеток [11]: они обладают повышенной жидкостью [12], и это, очевидно, облегчает их слияние с липосомами. Каким образом осуществляется такое слияние, эндоцитозом или встраиванием участков липосомного бислоя в клеточную мембрану, остается пока невыясненным. Все же независимо от этого механизма как слияние липосомы с клет-

кой, так и ее разрушение в процессе циркуляции в кровотоке (особенно, если речь идет о крупных моноламеллярных липосомах с большим внутренним объемом) могут приводить к нежелательной утечке лекарственного препарата.

В связи с этим большой интерес представляют липосомы, содержащие цитотоксическое вещество в области липидного бислоя. Однако применяемые сегодня противоопухолевые препараты в основном являются гидрофильными и сами по себе удерживаться в мембране не могут. В нескольких работах сообщается о синтезе амфифильных производных лекарств, в молекулярную структуру которых вводится липидный якорь. Предполагается, что при попадании в клетку активная цитотоксическая часть молекулы отщепляется под действием внутриклеточных ферментов: фосфолипаз, эстераз и др. Так, описаны синтезы и испытания противоопухолевой активности ряда диацилглицериновых производных 1- β -D-арабинофуранозилцитозин-5'-дифосфата [13, 14], дипальмитоилфосфатидилфторуридина [15–17], димиристоилфосфатидилэтанололаминопроизводных метотрексата [18, 19] и холестеринных аналогов бис(2-хлорэтил)нитрозомочевины [20]. Такие производные в опытах *in vitro* и *in vivo* показали большую эффективность по сравнению с исходными противоопухолевыми лекарствами. Липидный остаток в молекуле модифицированного препарата несомненно влияет на способность его переноса через биологические мембраны, что отражается на его фармакокинетике. Описаны, в частности, сильные лимфотропные свойства липидных производных 5-фторуридина [17] и N,N'-бис(2-хлорэтил)-N'-нитрозомочевины [20], которые позволяют

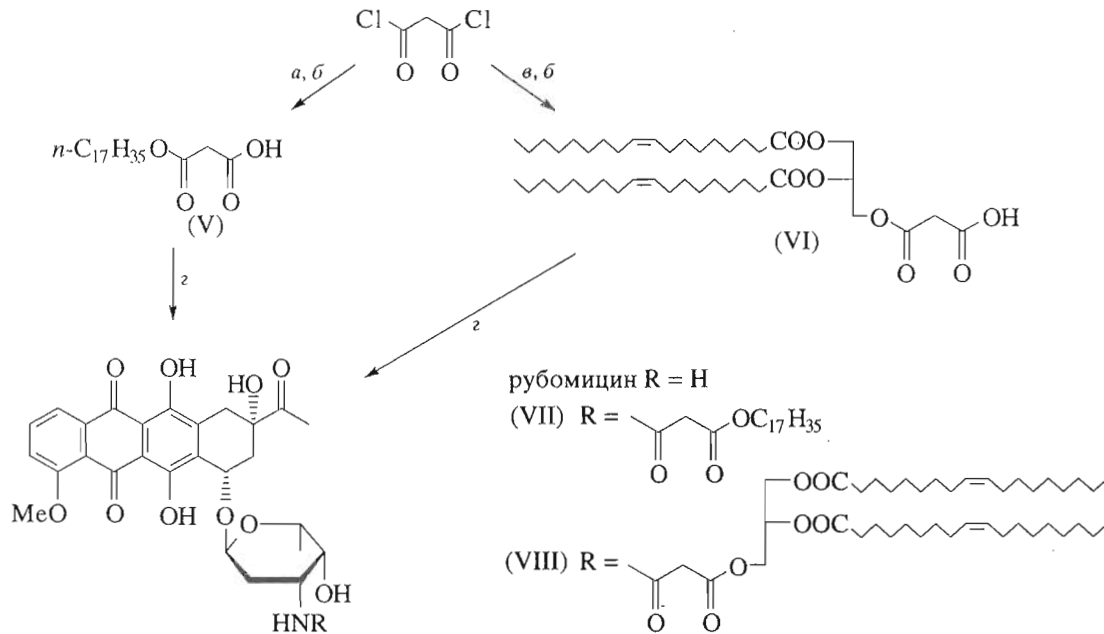
Сокращения: ET-18-OSN₃ – *rac*-1-октадецил-2-метилглицеро-3-фосфохолин; РМА – фосфорномолибденовая кислота.

[#] Автор для переписки.



Реагенты: *a* – Boc_2O ; *b* – *rac*-1,2-диолеоилглицерин, DCC, 4-пирролидинопиридин; *v* – CF_3COOH

Схема 1.



Реагенты: *a* – *n*- $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{OH}$, Py; *b* – H_2O ; *v* – *rac*-1,2-диолеоилглицерин, Py; *z* – N-гидроксисукцинимид, DCC; затем рубомидин, NEt_3

Схема 2.

рассчитывать на их применение для лечения опухолей мозга и лимфатической системы.

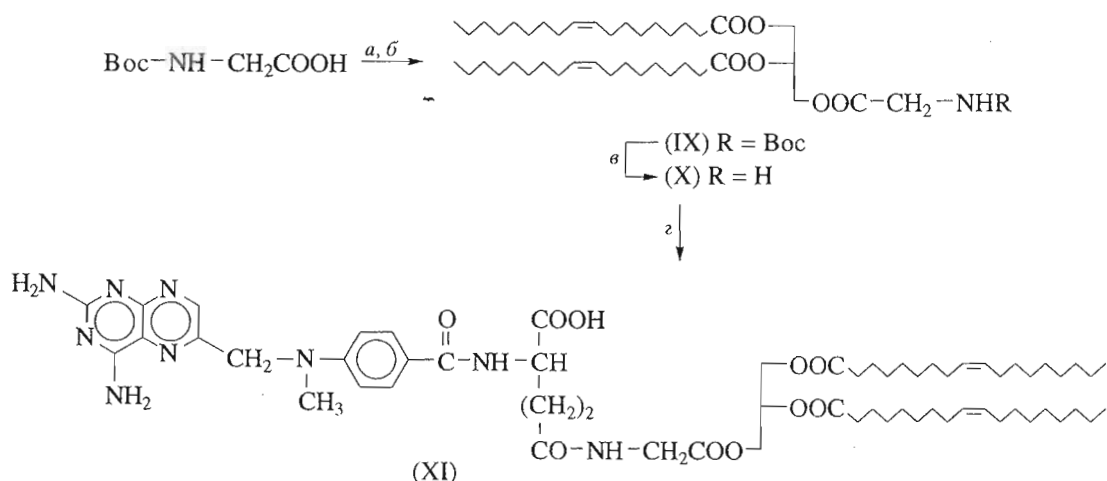
В связи с этим нами был предпринят синтез ряда липофильных производных противоопухолевых лекарств, различающихся по механизму действия: сарколизина (4-[бис(2-хлорэтил)амино]-DL-фенилаланина (I), алкилирующий агент), метотрексата (антагонист фолиевой кислоты) и рубомидина (антибиотик).

Диглицеридное производное сарколизина, *rac*-1,2-диолеоил-3-сарколизилглицерин (IV), синтезировали исходя из сарколизина (I) и *rac*-1,2-диолеоилглицерина (схема 1). N-Бос-сарколизин (II) вводили в реакцию с диолеоилглицерином в присутствии DCC и 4-пирролидинопиридина. После выделения продукта конденсации (III) и снятия защиты обработкой трифторуксусной кислотой получали диолеоилсарколизилглицерин (IV).

Для превращения в липофильное производное рубомидин был N-ацилирован гептадецилмалоновой кислотой (V). Мы полагаем, что сконструированное соединение (VII) должны внутри клетки расщепляться легче, чем обычное N-ацильное производное, например N-стеарат. Из моногептадецилмалоната (V), полученного ацилированием гептадецилового спирта малонилдихлоридом, мы синтезировали N-гидроксисукцинимидный эфир, который и вводили в реакцию конденсации с рубомидином (схема 2).

N-(*rac*-1,2-Диолеоилглицеро-3-малонил)рубомидин (VIII) был получен аналогично, через N-гидроксисукцинимидный эфир диолеоилглицеромалоната (VI) (схема 2).

Нам не удалось получить липидное производное метотрексата прямым ацилированием диолеоилглицерина. Поэтому сначала была проведена конденсация диолеоилглицерина с фторангидридом



Реагенты: *a* – цианурфторид, Py; *b* – *rac*-1,2-диолеилглицерин, NEt_3 ;
a – CF_3COOH ; *z* – метотрексат, N-гидроксисукцинимид, DCC, NEt_3

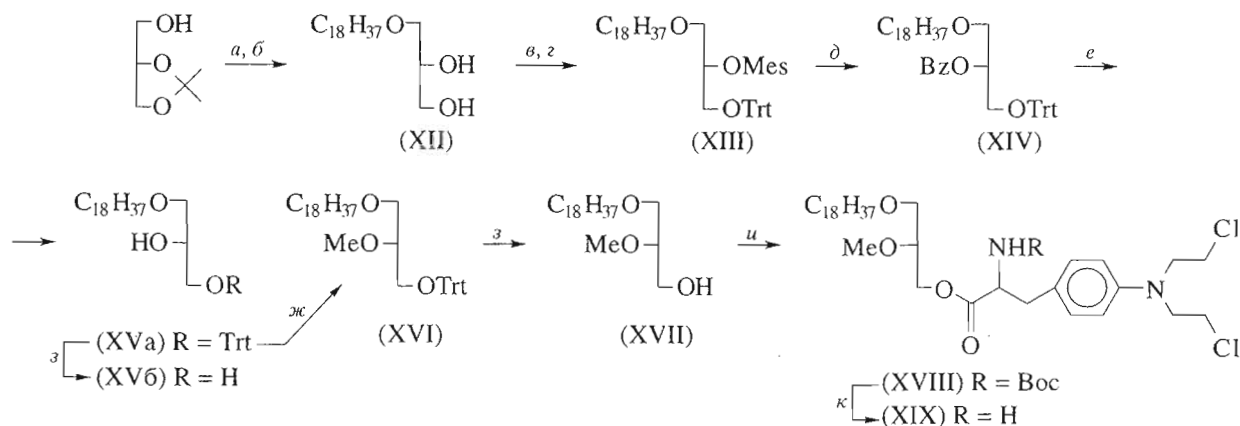
Схема 3.

Вос-глицина, NH_2 -группа очищенного продукта реакции (IX) была деблокирована обработкой трифторуксусной кислотой (схема 3). Полученный *rac*-1,2-диолеил-3-глицилглицерин (X) был введен в реакцию конденсации с метотрексатом в присутствии N-гидроксисукцинимид, DCC и триэтиламина. В результате реакции был получен набор соединений, которые мы идентифицировали по спектральным характеристикам и поведению при ТСХ. Их выходы и хроматографическая подвижность были аналогичны описанным для фосфатидилэтаноланоинопроизводных метотрексата [18]. В ходе реакции образуются продукты амидирования метотрексата по α - или γ -карбоксилам глутамильного остатка и по обеим COOH -группам. Глутамильный α -карбоксил обладает более сильными кислотными свойствами, чем γ -карбоксил, и поэтому продукт конденсации диолеилглицероглицина по γ - COOH метотрексата должен быть наиболее полярным. Это подтверждается характеристиками трех главных продуктов реакции метотрексата с диэтил-*L*-глутаматом [21]. Поскольку, по данным Хашимото и сотр. [19], встроенный в липосомный бислой метотрексат, модифицированный фосфатидилэтаноланоино по γ -карбоксилу, обладал наибольшей среди других фосфатидилэтаноланоинопроизводных метотрексата цитотоксической активностью, мы и выделили из реакционной смеси наиболее полярный *rac*-1,2-диолеилглицеро-3-глицинометотрексат (XI) (см. “Экспериментальную часть”) (схема 3).

Кроме указанных соединений мы синтезировали также диалкилглицериновое производное сарколизина (XIX) (схема 4). Известно, что фосфолипиды с простой эфирной связью (аналоги фактора активации тромбоцитов – 1-алкил-2-аце-

тил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина) обладают антинеопластической активностью (см. обзоры [22, 23]). В отличие от большинства применяемых в настоящее время противоопухолевых препаратов такие фосфолипиды (например, применяемый в клинике *rac*-1-октадецил-2-метилглицеро-3-фосфохолин, эдельфозин, ET-18- OCH_3), по-видимому, влияют не на функции ДНК, а на процессы передачи сигналов, которые управляют функционированием регуляторных факторов роста и дифференцировки клеток. Полностью механизм противоопухолевого действия липидов с простыми эфирными связями пока не выяснен, хотя по данному вопросу имеется обширный экспериментальный материал [23]. Можно предположить, что наличие в одной молекуле остатков такого фосфолипида и известного цитотоксического лекарства позволит получить препарат с высокой противоопухолевой эффективностью. Действительно, есть данные, что введение ET-18- OCH_3 совместно с рядом известных лекарств (митомичином С, адриамицином, цисплатином, блеомицином) дает синергический или аддитивный цитотоксический эффект [24], а производные 1- β -*D*-арабинофуранозилцитозина с 1-*O*- и 1-*S*-алкильными фосфолипидами проявили значительную противоопухолевую активность [25].

В синтезе 1-октадецил-2-метил-3-сарколизил-*sn*-глицерина (XIX) мы исходили из 1-октадецил-2-метил-*sn*-глицерина (XVII) и N-Вос-сарколизина (схема 4). Для получения хирального глицерида с природной конфигурацией глицеринового остатка мы использовали метод [26]. На первой стадии 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерин алкилировали октадецилбромидом, изопропилиденовую защиту удаляли в кислой среде и полученный 3-октадецил-*sn*-глицерин (XII) далее тритилировали и



Реагенты: *a* – NaH, *n*-C₁₈H₃₇Bг; *б* – H⁺; *в* – TrtCl, Py; *з* – MeCl, Py; *д* – NaOBz, DMF; *е* – NaOMe; *ж* – MeI, KOH; *з* – 80% AcOH; *и* – N-Вос-сарколизин, 4-пирролидинопиридин, DCC; *κ* – CF₃COOH

Схема 4.

превращали в мезилат (XIII). Последний обрабатывали бензоатом натрия в DMF при повышенной температуре и полученный продукт (XIV) дебензоилировали обработкой метилатом натрия. Образец выделенного октадецилтритилглицерина (XVa) подвергли кислотному гидролизу для удаления тритильной защиты и получили 1-октадецил-*sn*-глицерин (XVб), который по сравнению с 3-октадецил-*sn*-глицерином (XII) имел равный по величине и противоположный по знаку удельный угол вращения (см. “Экспериментальную часть”). Таким образом, нуклеофильное замещение мезилата (XIII) бензоатом натрия протекает с обращением конфигурации (S_N2-механизм) без рацемизации и соединение (XIV) представляет собой 1-октадецил-2-бензоил-3-тритил-*sn*-глицерин. Продукт дебензоилирования последнего (XVa) алкилировали метилиодидом. Полученный 1-октадецил-2-метил-3-тритил-*sn*-глицерин (XVI) детритилировали обработкой уксусной кислотой до 1-октадецил-2-метил-*sn*-глицерина (XVII), который и превращали в сарколизиновое производное (XIX) (схема 4).

Все липидные производные противоопухолевых соединений (IV, VII, VIII, XI, XIX) хорошо встраиваются в бислойную мембрану фосфатидилхолиновых липосом, что было определено при гель-фильтрации липосомных дисперсий на сефадексе (данные не приведены). Результаты испытаний этих веществ на цитотоксическую и противоопухолевую активность будут предметом наших дальнейших сообщений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезе использовали сарколизин, метотрексат и гидрохлорид рубомицина отечественного производства, которые были любезно предо-

ставлены А.М. Козловым (Онкологический научный центр РАМН), ди-*трет*-бутилдикарбонат, трифторуксусную кислоту, цианурфторид (2,4,6-трифтор-1,3,5-триазин) и N-гидрохисукцинимид (Fluka, Швейцария), гептадециловый спирт (Ferak, Германия), N,N'-дициклогексилкарбодимид (Serva, Германия), Вос-глицин (Reanal, Венгрия), 4-пирролидинопиридин, сухой пиридин, 1,2-изопропилен-*sn*-глицерин и мезилхлорид (Merck, Германия). *rac*-1,2-Диолеоилглицерин синтезировали из олеоилхлорида и *rac*-1-тритилглицерина, малонилдихлорид получали действием тионилхлорида на малоновую кислоту. Тритилхлорид (“Рехахим”, Россия) кипятили с ацетилхлоридом в бензоле и кристаллизовали. Сухой хлороформ получали перегонкой над пятиокисью фосфора. Остальные растворители отечественного производства использовали после обычной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 (40–63 мкм) и силикагель 100 (63–200 мкм) (Merck), силикагель L (100–160 мкм; Chemapol, Чехия), для гель-фильтрации – сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция), для ТСХ – пластинки с флуоресцентным индикатором Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Применяли следующие системы для ТСХ: хлороформ–метанол–вода–триэтиламин, 80 : 25 : 3 : 1 (А); гексан–этилацетат–уксусная кислота, 80 : 20 : 1 (Б); хлороформ–изопропанол–уксусная кислота, 90 : 8 : 1 (В); бензол–этилацетат, 10 : 1 (Г); бензол–этилацетат, 5 : 1 (Д); толуол–хлороформ–изопропанол, 10 : 10 : 1 (Е); гексан–этилацетат, 8 : 2 (Ж); гексан–этилацетат–этанол, 90 : 5 : 2 (З); гептан–этилацетат, 9 : 1 (И); толуол–этилацетат–изопропанол, 25 : 1 : 0.1 (К). Обнаружение пятен на хроматограммах проводилось с помощью РМА или просматриванием пластинок в УФ- или видимом свете. Температуры плавления определены на блоке Кофлера и исправлены, удельные углы

вращения – на поляриметре DIM 360 Jasco (Япония). Спектры ^1H -ЯМР снимали в CDCl_3 на приборе Bruker WM-500 (США), масс-спектры – на спектрометрах Kratos MS 50TC (FAB, энергия атомов ксенона 8 эВ, глицериновая матрица) или МСБХ (временноразрешенный масс-спектрометр с ионизацией продуктами деления калифорния-252 при ускоряющем напряжении +15 эВ) (г. Сумы, Украина), УФ-спектры веществ в этаноле – на спектрофотометре Ultrospec II 4050 (ЛКВ, Швеция). Все упаривания проводили в вакууме при температуре не выше 40°C.

N-Вос-сарколизин (II). Сарколизин (I) (84 мг, 263 мкмоль) растворяли в 1.7 мл сухого DMF, прибавляли 100 мкл триэтиламина и 136 мг (620 мкмоль) $(\text{Вос})_2\text{O}$. Реакцию вели 30 мин при перемешивании при 20°C. Прибавляли к реакционной смеси 17 мл этилацетата, перемешивали и подкисляли концентрированным водным раствором лимонной кислоты до pH примерно 4. Водную фазу отделяли и экстрагировали этилацетатом (3 × 2 мл); объединенный органический экстракт промывали водой (2 × 3 мл), упаривали и сушили 2 ч (40°C/20 Па). Получили продукт (II) в виде концентрированного раствора в DMF, индивидуальный по данным ТСХ, R_f 0.85 (система А, УФ-детекция). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 369.9 $[M - \text{Cl}]^+$, 404.8 $[M]^+$, 428.6 $[M + \text{Na}]^+$. УФ-спектр, λ_{max} 260 нм (ϵ 30700).

rac-1,2-Диолеил-3-(N-Вос-сарколизил)глицерин (III). N-Вос-сарколизин (II) (100 мг, 233 мкмоль) и rac-1,2-диолеилглицерин (112 мг, 180 мкмоль) растворяли в 4.5 мл сухого хлороформа, прибавляли 40 мг 4-пирролидинопиридина (270 мкмоль) и 300 мкл раствора DCC в CCl_4 (200 мг/мл, ~300 мкмоль). Реакцию вели при перемешивании при 20°C в течение ночи, добавляли еще 200 мкл раствора DCC в CCl_4 , перемешивали 3 ч, реакционную смесь фильтровали, фильтра упаривали приблизительно до 1 мл и проводили гель-фильтрацию на колонке (1 × 70 см), уравновешенной системой хлороформ–метанол, 1 : 1, контролируя состав фракций ТСХ в системе Б (УФ-детекция). Фракции, содержащие наибольшее количество продукта, объединяли и упаривали, получили 120 мг частично очищенного продукта в виде коричневого масла, который очищали дополнительно хроматографией на колонке с силикагелем 60, элюируя градиентом этилацетата в гексане (0 → 10%). Получили 56 мг (~23%) бесцветного маслообразного вещества, индивидуального хроматографически, R_f 0.51 (Б, РМА и УФ-детекция). УФ-спектр: λ_{max} 260 нм (ϵ 31400).

rac-1,2-Диолеил-3-сарколизилглицерин (IV). Продукт (III) (56 мг, 54 мкмоль) растворяли в 15 мл хлороформа, охлаждали до 0°C и при перемешивании прибавляли 30 мл трифторуксусной

кислоты. Выдерживали реакционную смесь 30 мин при той же температуре, упаривали, прибавляли толуол и еще раз упаривали. После высушивания в течение 10 ч при 20 Па получили 49 мг (99.4%) производного (IV) в виде аморфного бесцветного вещества, индивидуального хроматографически, R_f 0.43 (В, РМА и УФ-детекция). Масс-спектр (FAB), m/z : 907 = $[M]^+$ (55%), 909 = $[M]^+$ (45%). УФ-спектр: λ_{max} 260 нм (ϵ 32600). ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 0.87 (т, 6H, 2CH₃); 1.29 (м, 20H, H4-H7 и H12-H17); 1.6 (т, 4H, H3); 1.99 (м, 8H, H8 и H11); 2.29 (м, 4H, H2); 3.6 (т, 4H, $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl})_2$); 3.7 (т, 4H, $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl})_2$); 4.1–4.4 (уш. м, 4H, H'1 и H'3); 5.22 (м, 1H, H'2); 5.31 (м, 4H, $-\text{HC}=\text{CH}-$); 6.62 (д, 2H, H_m^{Ph}); 7.07 (дд, 2H, H_o^{Ph}).

Моногептадецилмалонат (V). 400 мкл (4 ммоль) малонилдихлорида прибавляли к 2 мл сухого хлороформа, охлаждали до 0°C и к смеси медленно прибавляли при интенсивном перемешивании раствор 100 мг гептадецилового спирта (400 мкмоль) и 32 мкл (400 мкмоль) пиридина в 1 мл сухого хлороформа, выдерживали 1 ч при перемешивании при 0°C. Выливали реакционную смесь в 10 мл воды, интенсивно перемешивали 10 мин, экстрагировали гексаном (2 × 5 мл), экстракт упаривали и растворяли в смеси диоксан–вода, 2 : 1. Через 1 ч раствор упаривали и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем 60 в системе бензол–этилацетат, 20 : 1. Выделяли 37 мг (27%) моноэфира (V), индивидуального хроматографически, R_f 0.41 (Г, РМА). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 343 $[M + \text{H}]^+$, 240 $[M - \text{HOOCCH}_2\text{COO}]^+$. ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 0.86 (т, 3H, CH₃); 1.25 (м, 28H, H3-H16); 1.65 (м, 2H, H2); 3.42 (с, 2H, H'); 4.16 (т, 2H, H1).

Моно(rac-1,2-диолеилглицеро-3)малонат (VI). К раствору 300 мкл (3 ммоль) малонилдихлорида в 600 мкл сухого хлороформа, охлажденному до –10°C, медленно, при перемешивании прибавляли раствор 100 мг (156 мкмоль) диолеилглицерина и 15 мкл пиридина в 3 мл сухого хлороформа, перемешивали еще 1 ч при 20°C, выливали реакционную смесь в 20 мл воды и экстрагировали гексаном (2 × 10 мл). Экстракт упаривали, остаток растворяли в 10 мл смеси диоксан–вода (2 : 1), через 1 ч снова упаривали, растворяли в 10 мл гексана. Гексановый раствор промывали 0.1 н. HCl, водой и насыщ. NaCl (по 10 мл), упаривали и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем 60 в бензоле. Выделяли 17 мг (15%) соединения (VI) в виде бесцветного аморфного вещества, индивидуального хроматографически, R_f 0.24 (Д, РМА). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 707 $[M]^+$, 730 $[M + \text{Na}]^+$, 746 $[M + \text{K}]^+$, 604 $[M - \text{HOOCCH}_2\text{COO}]^+$, 426 $[M - \text{олеил}]^+$. ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 0.87 (т, 6H, 2CH₃); 1.28 (м, 20H, H4–H7 и H12–H17); 1.98 (м, 8H,

H8 и H11); 2.29 (м, 4H, H2); 3.43 (с, 2H, H^{''}); 4.1–4.4 (м, 5H, H[']1–H[']3); 5.34 (м, 4H, –CH=CH–).

N-(Гептадецилмалонил)рубомидин (VII). 10 мг (30 мкмоль) моногептадецилового эфира малоновой кислоты (V) в 0.5 мл хлороформа прибавляли к раствору 7 мг (60 мкмоль) N-гидроксисукцинимид в 0.5 мл этилацетата, к полученной смеси прибавляли при перемешивании 8 мг (30 мкмоль) DCC в 80 мкл хлороформа. Через 30 мин в реакционную смесь добавляли 0.5 мл гексана и центрифугировали для отделения от осадка дициклогексимочевины. Полученный раствор, содержащий, по данным ТСХ, N-гидроксисукцинимидный эфир гептадецилмалоната, R_f 0.62 (Д, РМА), прибавляли к раствору 5.25 мг (10 мкмоль) гидрохлорида рубомидина в 2 мл хлороформа, содержащему 2 мкл триэтиламина, смесь перемешивали 18 ч при 20°C. Ход реакции контролировали ТСХ (Е, РМА и визуально). Реакционную смесь упаривали, растворяли в смеси бензол–хлороформ (2 : 1) и хроматографировали на колонке с силикагелем 60 в системе бензол–хлороформ–изопропанол (2 : 1 : 0.1). Выделяли 3 мг (35%) соединения (VII) в виде красного аморфного вещества, R_f 0.34 (Е, РМА и визуально). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 852 $[M]^+$, 875 $[M + \text{Na}]^+$, 891 $[M + \text{K}]^+$. УФ-спектр, λ_{max} , нм (ϵ): 252 (54000), 290 (8700).

N-(*rac*-1,2-Диолеилглицеро-3-малонил)рубомидин (VIII). К раствору 10 мг (90 мкмоль) N-гидроксисукцинимид в 1.5 мл этилацетата прибавляли 17 мг (25 мкмоль) диолеилглицеромалоната (VI) в 0.8 мл хлороформа. К полученной смеси при перемешивании прибавляли 5 мг (25 мкмоль) DCC в 50 мкл хлороформа. Через 30 мин реакционную смесь центрифугировали и полученный супернатант прибавляли к раствору 15 мг (25 мкмоль) рубомидингидрохлорида в 2 мл хлороформа, содержащему 3 мкл триэтиламина. Реакционную смесь выдерживали 48 ч при 20°C, упаривали, остаток растворяли в смеси бензол–хлороформ (2 : 1) и хроматографировали на колонке с силикагелем 60 в системе бензол–хлороформ–изопропанол (2 : 1 : 0.1). Выделяли 3 мг (10%) соединения (VIII) в виде красного масла, R_f 0.32 (Е, РМА и визуально). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 1240 $[M + \text{Na}]^+$, 1256 $[M + \text{K}]^+$. УФ-спектр, λ_{max} , нм (ϵ): 252 (52000), 290 (8750).

***rac*-1,2-Диолеил-3-(N-Вос-глицил)глицерин (IX).** К раствору 60 мг (330 мкмоль) Вос-глицина в 6 мл ацетонитрила прибавляли 60 мкл (800 мкмоль) пиридина и 50 мкл (370 мкмоль) цианурфторида, перемешивали 3 ч при 20°C. Затем прибавляли к реакционной смеси раствор 200 мг (300 мкмоль) *rac*-1,2-диолеилглицерина в смеси 6 мл бензола и 100 мкл (1 ммоль) триэтиламина. Через 1 ч перемешивания при 20°C прибавляли к реакционной смеси 5 мл воды и экстрагировали этилацетатом (2 × 10 мл), органический слой промывали 10%

КНСО₃, водой и насыщ. NaCl (по 10 мл), сушили над Na₂SO₄. После упаривания остаток хроматографировали на колонке с силикагелем 60 в системе бензол–этилацетат, 25 : 1. Получили 114 мг (44%) хроматографически чистого *rac*-1,2-диолеил-3-(N-Вос-глицил)глицерина (IX) в виде бесцветного масла, R_f 0.6 (Д, РМА). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 779 $[M + \text{H}]^+$, 722 $[M - \text{CMe}_3]^+$, 678 $[M - \text{Вос}]^+$, 603 $[M - \text{Вос} - \text{Gly}]^+$. ¹H-ЯМР (δ , м. д.): 0.88 (т, 6H, 2CH₃); 1.31 (м, 20H, H4–H7 и H12–H17); 1.45 (с, 9H, Вос); 1.6 (м, 4H, H3); 2.00 (м, 8H, H8 и H11); 2.32 (м, 4H, H2); 3.90 (уш. с, 1H, NH); 4.1–4.4 (м, 4H, H[']1 и H[']3); 4.95 (уш. м, 1H, H[']2); 5.33 (м, 4H, –CH=CH–).

***rac*-1,2-Диолеил-3-глицилглицерин (X).** 102 мг (131 мкмоль) соединения (IX) растворяли в 5 мл хлороформа, охлаждали до 0°C, прибавляли 4 мл трифторуксусной кислоты и выдерживали реакционную смесь 1 ч при той же температуре. Упаривали и высушивали продукт, как описано для соединения (IV). Получили 89 мг (100%) производного (X) в виде бесцветного маслообразного вещества, индивидуального хроматографически, R_f 0.54 (А, РМА). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 678 $[M]^+$, 604 $[M - \text{OOCCH}_2\text{NH}_2]^+$.

***rac*-1,2-Диолеилглицеро-3-глицинометотрексат (XI).** 13.5 мг (30 мкмоль) метотрексата растворяли в 2 мл смеси хлороформ–метанол (1 : 1), добавляли 20 мкл (200 мкмоль) триэтиламина, 60 мг (80 мкмоль) соединения (X) в 2 мл смеси хлороформ–метанол (1 : 1), 23 мг (200 мкмоль) N-гидроксисукцинимид в 300 мкл смеси хлороформ–метанол (1 : 1). К полученной смеси при перемешивании прибавляли 50 мг (250 мкмоль) DCC. Реакцию вели 18 ч при перемешивании. Затем добавляли дважды с интервалом 6 ч еще по 100 мг DCC. Реакционную смесь перемешивали еще 18 ч, после чего при анализе ТСХ были выявлены три аддукта метотрексата с диглицеридом (X) со следующими значениями R_f : 0.22, 0.26 и 0.38. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 300 мкл смеси хлороформ–метанол (2 : 1) и хроматографировали на колонке с силикагелем 100 в системе хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 1). Выделяли 2.1 мг (6.2%) наиболее полярного соединения (XI) в виде желтоватого маслообразного вещества, индивидуального хроматографически, R_f 0.22 (А, РМА и УФ-детекция). УФ-спектр: λ_{max} 294 нм (ϵ 67000).

3-Октадецил-*sn*-глицерин (XII). 10 г (75.8 ммоль) 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерина, 26.5 г (80 ммоль) *n*-октадецилбромид и 2.36 г (98.5 ммоль) гидрида натрия в 200 мл DMF перемешивали 24 ч при 20°C. Ход реакции контролировали ТСХ (Ж, РМА). Прибавляли в реакционную колбу 10 мл метанола и выливали полученную смесь в 250 мл ледяной воды, экстрагировали гексаном (2 × 100 мл),

органический слой упаривали. Полученное масло растворяли в 10 мл метанола, смешивали с 40 мл 10% HCl в метаноле и выдерживали 20 мин при 70°C. После охлаждения экстрагировали реакционную смесь гексаном (40 мл), водно-спиртовой слой упаривали с изопропанолом. Остаток промывали гексаном (50 мл), холодным метанолом (50 мл), высушивали под вакуумом над щелочью и перекристаллизовывали из диэтилового эфира. Получили 13.1 г (50.2%) бесцветного кристаллического вещества (XII), индивидуального хроматографически, R_f 0.1 (Ж, РМА). $[\alpha]_D^{18} -1.8^\circ$ (с 2.0; CHCl₃). Т. пл. 69°C (лит. данные [27]: т. пл. 70–71°C).

3-Октадецил-2-мезил-1-тримил-*sn*-глицерин (XIII). К раствору октадецилглицерина (XII) (3.3 г, 9.5 ммоль) в 30 мл сухого пиридина прибавляли при перешивании тримилхлорид (3.8 г, 13.6 ммоль), смесь перемешивали при 20°C в течение ночи, выливали в 60 мл воды со льдом и экстрагировали эфиром (2 × 25 мл). Эфирный слой высушивали сульфатом магния и упаривали. Остаток растворяли в гексане, отфильтровывали от нерастворившихся кристаллов (исходный октадецилглицерин). Полученный после упаривания остаток (R_f 0.48; Ж, РМА и УФ-детекция) растворяли в 30 мл сухого пиридина и охлаждали смесь до 0°C. Прибавляли метансульфохирид (3 мл, 19 ммоль) и перемешивали 2 ч при 0°C. Выливали реакционную смесь в 200 мл воды со льдом и экстрагировали хлороформом (2 × 50 мл), органический слой промывали насыщ. Na₂CO₃ (30 мл) и водой (2 × 30 мл), упаривали с толуолом. Твердый остаток растворяли в гептане и хроматографировали на колонке с силикагелем 100, элюируя градиентом этилацетата в гептане (0 → 5%). Получили 3.5 г (56%) продукта (XIII) в виде бесцветного твердого вещества, R_f 0.5 (З, РМА и УФ-детекция). Масс-спектр (FAB), m/z : 663 [M–H]⁺, 587 [M–Mes+2H]⁺. ¹H-ЯМР (δ, м. д.): 0.9 (т, 3H, CH₃); 1.26 (м, 30H, H₃-H₁₇); 1.52 (м, 2H, H₂); 3.06 (с, 3H, Mes); 3.32 (дд, 1H, H_a' 3); 3.42 (м, 3H, H_b' 3 и H₁); 3.58 (дд, 1H, H_a' 1); 3.68 (дд, 1H, H_b' 1); 4.83 (м, 1H, H₂); 7.23 (м, 3H, H_p^{Tr}); 7.32 (м, 6H, H_o^{Tr}); 7.45 (м, 6H, H_m^{Tr}).

1-Октадецил-2-бензоил-3-тримил-*sn*-глицерин (XIV). Растворяли 0.6 г (0.9 ммоль) глицеринового производного (XIII) в 20 мл сухого DMF, прибавляли бензоат натрия (1 г, 6.8 ммоль) и перемешивали 3 сут при 100°C. Реакционную смесь фильтровали, выливали в 100 мл ледяной воды и экстрагировали гептаном (3 × 50 мл). Органической слой промывали водой (2 × 50 мл) и упаривали с изопропанолом. Маслообразный остаток хроматографировали на колонке с силикагелем 60, элюируя градиентом этилацетата в гептане (0 → 10%). Получили 330 мг (52%) бесцветного маслообраз-

ного вещества (XIV), индивидуального хроматографически, R_f 0.6 (И, РМА и УФ-детекция); $[\alpha]_D^{18} +1.25^\circ$ (с 0.8; CHCl₃). ¹H-ЯМР (δ, м. д.): 0.87 (т, 3H, CH₃); 1.24 (м, 30H, H₃-H₁₇); 1.48 (м, 2H, H₂); 3.39 (м, 4H, H_a' 1 и H₁); 3.72 (дд, 1H, H_a' 3); 3.76 (дд, 1H, H_b' 3); 5.43 (м, 1H, H₂); 7.22 (м, 9H, H_p^{Tr} и H_m^{Tr}); 7.45 (м, 8H, H_o^{Tr} и H_m^{Bz}); 7.55 (м, 1H, H_p^{Bz}); 8.10 (м, 2H, H_o^{Bz}).

1-Октадецил-3-тримил-*sn*-глицерин (XVa). Растворяли 320 мг (464 мкмоль) соединения (XIV) в 4 мл смеси хлороформ–метанол (1 : 1), прибавляли 80 мкл (4 мг) 1 М метилата натрия в метаноле и перемешивали 2 сут при 20°C. Прибавляли к реакционной смеси 10 мкл CH₃COOH и упаривали. Остаток растворяли в 10 мл эфира, экстрагировали водой (2 × 3 мл), органический слой упаривали с гептаном и изопропанолом. Маслообразный остаток хроматографировали на колонке с силикагелем L, элюируя градиентом этилацетата в гептане (0 → 17%). Получили 180 мг (62%) хроматографически индивидуального вещества (XVa), R_f 0.55 (Ж, РМА и УФ-детекция). $[\alpha]_D^{18} -1.25^\circ$ (с 0.8; CHCl₃). Т.пл. 53–54°C. ¹H-ЯМР (δ, м. д.): 0.86 (т, 3H, CH₃); 1.26 (м, 30H, H₃-H₁₇); 1.50 (м, 2H, H₂); 2.36 (м, 1H, OH); 3.19 (м, 2H, H₁); 3.37–3.54 (набор м, 4H, H₁ и H₃); 3.94 (м, 1H, H₂); 7.13 (м, 3H, H_p^{Tr}); 7.28 (т, 6H, H_m^{Tr}); 7.44 (д, 6H, H_o^{Tr}).

1-Октадецил-*sn*-глицерин (XVb). Соединение (XVa) (6 мг, 10 мкмоль) обрабатывали уксусной кислотой в условиях, описанных ниже для превращения продукта (XVI) в (XVII). Удаляли хлороформ из реакционной смеси упариванием, промывали остаток гептаном (2 × 1 мл). После упаривания кислого водного слоя с изопропанолом и гептаном получили 2 мг (~60%) хроматографически индивидуального вещества, R_f 0.1 (Ж, РМА). $[\alpha]_D^{18} +1.8^\circ$ (с 0.2; CHCl₃).

1-Октадецил-2-метил-3-тримил-*sn*-глицерин (XVI). Использовали метод [28]. Растворяли глицериновое производное (XVa) (170 мг, 289 мкмоль) в 6 мл бензола, прибавляли порошкообразный K₂CO₃ (200 мг, 3.5 ммоль) и кипятили при интенсивном перемешивании с азеотропной отгонкой воды. Охлаждали реакционную смесь до 30°C, прибавляли метилиодид (223 мкл, 3.5 ммоль) и перемешивали 8 ч при 50°C. После охлаждения реакционную массу фильтровали, прибавив 1 мл триэтиламина, упаривали, растворяли в 20 мл эфира и промывали водой (3 × 5 мл). Органический слой сушили сульфатом магния и упаривали. Твердый остаток хроматографировали на колонке с силикагелем 60, элюируя градиентом этилацетата

в гептане (0 → 17%). Получили 100 мг (60%) бесцветного кристаллического вещества, R_f 0.22 (И, РМА и УФ-детекция). Т.пл. 51–52°C. $[\alpha]_D^{18} +2.25^\circ$ (с 0.8; CHCl_3). ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 0.86 (т, 3H, CH_3); 1.26 (м, 30H, H3-H17); 1.50 (м, 2H, H2); 3.17 (м, 2H, H1); 3.38 (с, 3H, OMe), 3.35–3.55 (набор м, 5H глицерина); 7.19 (т, 3H, H_p^{Tr}); 7.25 (т, 6H, H_m^{Tr}); 7.43 (д, 6H, H_o^{Tr}).

1-Октадецил-2-метил-*sn*-глицерин (XVII). Соединение (XVI) (100 мг, 168 мкмоль) растворяли в 2 мл хлороформа, прибавляли 7 мл 80% уксусной кислоты и интенсивно перемешивали 2 ч при 60°C. Упаривали реакционную смесь с гептаном, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем 60, элюируя градиентом смеси растворителей этилацетат–изопропанол, 10 : 1, в толуоле (0 → 14%). Получали 55 мг (95%) бесцветного аморфного вещества, R_f 0.2 (К, РМА). $[\alpha]_D^{18} -5.25^\circ$ (с 0.8; CHCl_3). ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 0.88 (т, 3H, CH_3); 1.26 (м, 30H, H3-H17); 1.55 (м, 2H, H2); 2.12 (уш. сигнал, 1H, H'3); 3.42 (м, 2H, H1); 3.44 (с, 3H, OMe); 3.5–3.7 (набор м, 5H глицерина).

1-Октадецил-2-метил-3-(*N*-Вос-сарколизил)-*sn*-глицерин (XVIII) получали аналогично соединению (III) из Вос-сарколизина (II) (105 мг, 236 мкмоль), соединения (XVII) (50 мг, 152 мкмоль), 4-пирролидинопиридина (35 мг, 243 мкмоль) и ДСС (300 + 200 мкмоль) в 4 мл сухого хлороформа. После хроматографии на колонке с силикагелем 60 (элюирование градиентом этилацетата в гептане (0 → 20%)) получили 40 мг (35.5%) продукта в виде масла, R_f 0.4 (Ж, РМА и УФ-детекция). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 710.9 $[M - \text{Cl}]^+$; 745.6 $[M]^+$.

1-Октадецил-2-метил-3-сарколизил-*sn*-глицерин (XIX). Удаление Вос-защиты в соединении (XVIII) проводили как описано выше для получения сарколизинового производного (IV). Получили 35 мг (100%) продукта в виде аморфного бесцветного вещества, индивидуального хроматографически, R_f 0.37 (В, РМА и УФ-детекция). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 611.3 $[M + 2\text{H} - \text{Cl}]^+$; 647.8 $[M + 2\text{H}]^+$; 670.9 $[M + 2\text{H} + \text{Na}]^+$. УФ-спектр: λ_{max} 260 нм (ϵ 28900). ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 0.88 (т, 3H, CH_3); 1.26 (м, 30H, H3-H17); 1.52 (м, 2H, H2); 3.4–3.5 (набор м, 10H, H1, OMe и H глицерина); 3.58 (м, 4H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Cl}$); 3.7 (м, 4H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Cl}$); 6.6 (дд, 2H, H_m^{Ph}); 7.2 (дд, 2H, H_o^{Ph}).

Настоящая работа выполнена при поддержке Международного научного фонда Дж. Сороса (грант MGS300).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lasic D.D. // *Liposomes: from Physics to Applications*. Amsterdam: Elsevier, 1993. P. 262–471.
2. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. // *Science*. 1995. V. 267. P. 1275–1276.
3. Pozansky M.J., Juliano R.L. // *Pharmacol. Rev.* 1984. V. 36. P. 277.
4. Piste G., Kirsh R., Bugelski P. // *Novel Approaches to Cancer Chemotherapy* / Ed. P.S. Sukara. N.Y.: Acad. Press, 1984. P. 166–230.
5. Merlin J.-L., Marchal S., Ramacci C., Notter D., Vigneron C. // *Eur. J. Cancer*. 1993. V. 29A. P. 2264–2268.
6. Williams S.S., Alosco T.R., Mayhew E., Lasic D.D., Martin F.J., Bankert R.B. // *Cancer Res.* 1993. V. 53. P. 3964–3967.
7. Unezaki S., Meruyama K., Takahashi N., Koyama M., Yuda T., Suginaka A., Iwatsuru M. // *Pharm. Res.* 1994. V. 11. P. 1180–1185.
8. Nagayasu A., Shimooka T., Kinouchi Y., Uchiyama K., Takeichi Y., Kiwada H. // *Biol. Pharm. Bull.* 1994. V. 17. P. 935–939.
9. Iga K., Hamaguchi N., Igari Y., Ogawa Y., Cotoh K., Ootsu K., Toguchi H., Shimamoto T. // *J. Pharm. Exp. Ther.* 1991. V. 257. P. 1203–1207.
10. Maekawa S., Sugimachi K., Kitamura M. // *Cancer Treat Rep.* 1987. V. 71. P. 1053–1059.
11. Bergelson L.D. // *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. 1972. V. XIII. Pt. 1. P. 3–59.
12. Shinitzky M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1984. V. 738. P. 251–261.
13. MacCoss M., Ryu E.K., Matsushita T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978. V. 85. P. 714–723.
14. Turcotte J.G., Srivastava S.P., Stein J.M., Calabresi P., Tibbetts L.M., Chu M.Y. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1980. V. 619. P. 619–631.
15. Shuto S., Itoh H., Ueda S., Imamura S., Fukukawa K., Tsujino M., Matsuda A., Ueda T. // *Chem. Pharm. Bull.* 1988. V. 36. P. 209.
16. Hayashi M., Itoh H., Kochio T., Nakagami K., Komiyama K. // *Biol. Pharm. Bull.* 1993. V. 16. P. 778–781.
17. Sakai A., Mori N., Shuto S., Suzuki T. // *J. Pharm. Sci.* 1993. V. 82. P. 575–578.
18. Hashimoto K., Loader J.E., Kinsky S.C. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. V. 816. P. 163–168.
19. Hashimoto K., Loader J.E., Knight M.S., Kinsky S.C. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. V. 816. P. 169–178.
20. Elkihel L., Gelin M., Letourneux Y. // *Arzneim. – Forsch.* 1995. V. 45-1. P. 190–194.
21. Rosowsky A., Yu C.-S. // *J. Med. Chem.* 1978. V. 24. P. 170–175.
22. Kovar A., Graner C., Zimmermann W. // *Pharmazie*. 1994. B. 49. S. 471–479.
23. Houlihan W.J., Lohmeyer M., Workman P., Cheon S.H. // *Med. Res. Rev.* 1995. V. 15. P. 157–223.
24. Principe P., Coulaub H., Mencia-Huerta J.-M., Broquet C., Braquet P. // *J. Lipid Mediators Cell Signalling*. 1994. V. 10. P. 171–173.

25. Hong C.I., West C.R., Bernacki R.J., Tebbi C.K., Berdel W.E. // *Lipids*. 1991. V. 26. P. 1437–1444.
26. Ponpipom M.M., Bugianesi R.L. // *Chem. Phys. Lipids*. 1984. V. 35. P. 29–38.
27. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ. М.: Мир, 1991. С. 144.
28. Саблина М.А., Ушакова И.П., Серебрянникова Г.А. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 1995. № 5. С. 974–978.

Lipid Derivatives of Sarcolysine, Methotrexate, and Rubomycin

E. L. Vodovozova, P. Yu. Nikol'skii, I. I. Mikhalev, and Yul. G. Molotkovsky

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

Abstract—To change the pharmacokinetic properties of the known antitumor agents sarcolysine, rubomycin, and methotrexate, their lipid derivatives were synthesized with the residues of *rac*-1,2-dioleoylglycerol and heptadecyl alcohol. An ether lipid analog, 3-sarcolysyl 2-methyl-1-octadecyl-*sn*-glycerol, with the lipid moiety being itself an antineoplastic agent was also obtained.

Key words: cytotoxic agents, antineoplastic activity, tumor chemotherapy, lipid derivatives of antitumor agents, ether lipids, liposomes.