

УДК 546.922:541.49+547.796.1

Т. В. СЕРЕБРЯНСКАЯ, Ю. В. ГРИГОРЬЕВ, И. М. ГРИГОРЬЕВА, академик О. А. ИВАШКЕВИЧ

СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИСКАРБОКСИЛАТОКОМПЛЕКСОВ ПЛАТИНЫ (II) С N-ЗАМЕЩЕННЫМИ 5-АМИНОТЕТРАЗОЛАМИНаучно-исследовательский институт
физико-химических проблем БГУ, Минск

Поступило 24.03.2014

Введение. Комплексные соединения переходных металлов с полиазотсодержащими гетероциклами, в частности, производными тетразола, привлекают все большее внимание исследователей в области медицинской и бионеорганической химии. Недавние исследования, проведенные группой Komeda и др., показали, что биядерные тетразолатные комплексы платины являются перспективными противоопухолевыми агентами, превосходящими свои пиразолатные аналоги по антипролиферативной активности и проявляющими низкую по сравнению с цисплатином токсичность *in vivo* [1; 2]. В результате проведенных нами ранее исследований было показано, что комплексы хлорида платины (II) с N-замещенными 5-аминотетразолами также сочетают высокую антипролиферативную активность *in vitro* с низкой острой токсичностью *in vivo* [3; 4]. Однако существенным их недостатком, препятствующим дальнейшему исследованию в качестве противоопухолевых средств, является низкая растворимость в воде.

Известно, что замещение хлорид-ионов в составе аналогов цисплатина на остатки дикарбоновых кислот, например, 1,1-циклобутандикарбоксилат или оксалат, является одним из эффективных подходов, позволяющих увеличить растворимость модифицированных комплексов в водных и биологических средах. Кроме того, за счет эффекта хелатирования такая модификация способствует снижению скорости гидролитической активации получаемых комплексов и таким образом понижает их нефро- и нейротоксичность [5], о чем свидетельствует успех платиновых препаратов второго и третьего поколения.

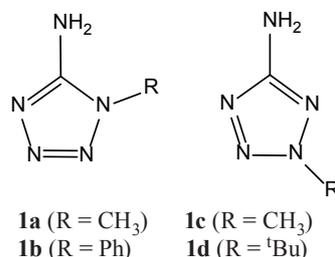
Цель работы – разработка методов синтеза и получение дикарбоксилатоккомплексов платины с N-замещенными 5-аминотетразолами, исследование их физико-химических свойств и антипролиферативной активности *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Исходные тетразолы **1a–1d** синтезировали по описанным методикам. 5-Амино-1-метилтетразол (**1a**) и 5-амино-2-метилтетразол (**1c**) получали метилированием 5-аминотетразола метилйодидом в основной среде [6], 5-амино-2-*трет*-бутилтетразол – алкилированием 5-аминотетразола *трет*-бутанолом в кислой среде [7], 5-амино-1-фенилтетразол (**1b**) синтезировали из 1-фенилтетразола по методике [8]. Оксалат серебра (I) и бисоксалатоплатинат (II) калия получены соответственно взаимодействием нитрата серебра или тетрахлоридоплатината калия с оксалатом калия в воде. *цис*-Дихлоридокомплексы платины (II) *цис*-[PtL₂Cl₂] (L = **1a–1d**) синтезировали по методике [4], *цис*-дийодидокомплексы платины (II) *цис*-[PtL₂I₂] (L = **1b, 1d**) – взаимодействием тетрахлоридоплатината калия с 6 эквивалентами иодида калия и 2 эквивалентами соответствующего тетразола в водно-этанольной среде. Дикарбоксилатоккомплексы платины получали из дихлоридо- и дийодидозамещенных предшественников путем обменного взаимодействия с оксалатом калия или серебра, а также малонатом калия или янтарной кислотой.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance 600 при рабочих частотах 600 МГц (¹H) и 150 МГц (¹³C), в качестве растворителя использовали (CD₃)₂SO или CD₃CN. ИК

спектры в области частот 4000–400 см⁻¹ снимали на спектрометре IR Thermo Avatar 330 фирмы Nicolet в кюветах из SiC. Определение антипролиферативной активности *in vitro* проводили по методике [9]. Внутриклеточное содержание платины в образцах измеряли методом атомной абсорбционной спектроскопии высокого разрешения на спектрометре с непрерывным источником излучения (contra AA 700, Analytik Jena AG) при 265 нм в соответствии с методикой [10].

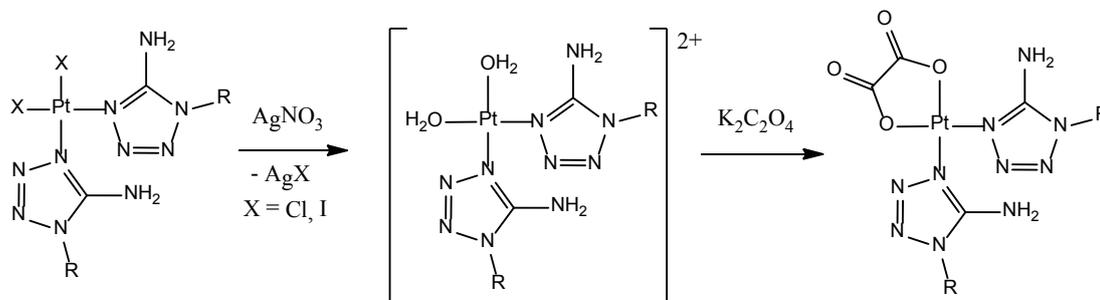
Результаты и их обсуждение. Среди N-замещенных тетразолов в качестве лигандов для получения дикарбоксилатоккомплексов платины (II) были выбраны 1- и 2-замещенные 5-аминотетразолы **1a–1d**:



Выбор именно этих производных тетразола был продиктован высокой цитотоксической активностью полученных ранее тетразолсодержащих аналогов цисплатина на основе 2-*трет*-бутил- и 1-фенил-5-аминотетразолов [4]. В качестве уходящих групп были выбраны остатки простейших дикарбоновых кислот: щавелевой, малоновой и янтарной.

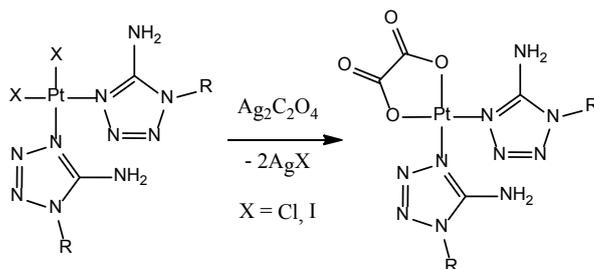
В литературе описано два основных метода получения дикарбоксилатоккомплексов платины с азотсодержащими основаниями. Наиболее распространенным является получение дикарбоксилатоккомплексов из их дигалогенидозамещенных аналогов PtL₂X₂, (L – азотсодержащий лиганд, X – галогенид-анион), в качестве которых, как правило, используются дихлоридо- или диiodидо-производные. В этом случае синтез *цис*-дикарбоксилатоккомплексов платины (II) требует осаждения галогенид-ионов с помощью солей серебра (I) с последующей их заменой на остаток дикарбоновой кислоты. Данная операция может проводиться либо в одну, либо в две стадии. При двустадийном проведении данного процесса для осаждения галогенид-ионов используется нитрат серебра, после чего к фильтрату, полученному после отделения осадка галогенида серебра (I), добавляют раствор дикарбоксилата щелочного металла [11]:

схема 1

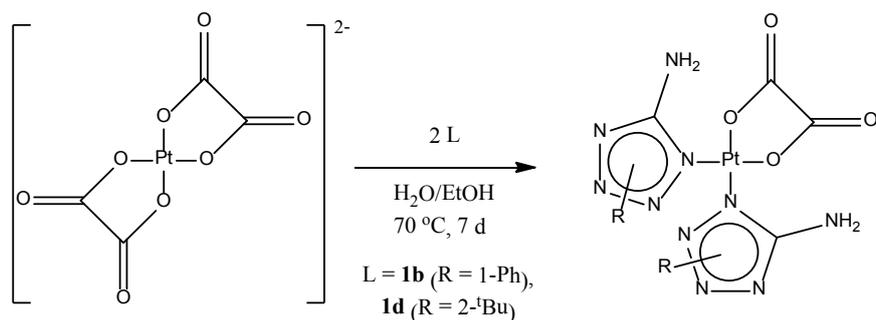


Одностадийный подход предполагает получение соли дикарбоксилата серебра (I), добавление которой к раствору либо суспензии соответствующего дигалогенидокомплекса платины (II) позволяет осуществить замену галогенид-ионов на дикарбоксилатный лиганд в одну стадию [12]:

схема 2



Альтернативный метод получения дикарбоксилатокомплексов платины с азотсодержащими основаниями заключается в непосредственном взаимодействии азотсодержащего производного с бискарбоксилатокомплексом платины [13]:



Поскольку синтез тетразолсодержащих бискарбоксилатокомплексов платины (II) ранее никогда не проводился, нами с целью выявления наиболее эффективного подхода была изучена применимость всех вышеуказанных методов. В результате установлено, что применение двухстадийного подхода (схема 1, $X = \text{Cl}$) позволяет осуществить синтез тетразолсодержащих *цис*-дикарбоксилатокомплексов платины (II) с выходом 25–50 %. Оксалато-, малонато- и сукцината-комплексы платины (II) с N-замещенными производными 5-аминотетразола **1a** и **1c** выделены в виде мелкокристаллических порошков серовато- или желтовато-белого цвета, состав и свойства которых были изучены методом рентгенофазового анализа, а также ИК спектроскопии. В то же время применение данной методики для получения аналогичных комплексов с тетразолами **1b** и **1d** оказалось менее успешным. В случае 5-аминотетразола **1d** получаемый оксалатокомплекс сильно загрязнен побочными продуктами реакции, включая соли серебра. Существенно более чистый оксалатокомплекс платины с 5-аминотетразолом **1d** удалось выделить при использовании одностадийного подхода (схема 2, $X = \text{Cl}$). В случае 5-амино-1-фенилтетразола (**1b**) использование в качестве исходного реагента дихлоридного комплекса платины для получения дикарбоксилатокомплексов платины (II) оказалось неэффективным, поскольку в данном случае добавление нитрата серебра на первой стадии не приводит к осаждению хлорид-ионов в виде хлорида серебра. Вероятно, это связано с тем, что произведение растворимости хлорида серебра выше такового для исходного тетразолсодержащего комплекса платины.

С целью преодоления данной проблемы, нами была изучена возможность использования соответствующих дийодидокомплексов платины *цис*- $[\text{PtL}_2\text{I}_2]$ (L – 1- или 2-замещенный 5-аминотетразол), что позволяет на первой стадии процесса проводить осаждение йодида серебра, произведение растворимости которого на 7 порядков ниже такового для его хлоридного аналога. Синтез дикарбоксилатных комплексов платины из дийодидных комплексов проводился как в одну стадию с участием свежеприготовленного оксалата серебра (схема 2, $X = \text{I}$), так и в условиях двухстадийного подхода с последовательным осаждением йодида серебра с помощью нитрата серебра и последующим взаимодействием полученного после отделения осадка фильтрата с оксалатом калия (схема 1, $X = \text{I}$). В первом случае в связи с низкой растворимостью всех участников реакции в воде реакцию проводили в смеси воды с этанолом 1 : 2. В случае двухстадийного подхода в качестве растворителя для проведения стадии осаждения были изучены вода, этанол, ацетон, а также их смеси различного состава. Наилучшие результаты были получены при использовании одностадийного подхода. Тем не менее, выход полученных комплексов составил не более 10 %. Возможной причиной указанных затруднений в применении данных методик для получения тетразолсодержащих дикарбоксилатокомплексов платины является образование побочных продуктов вследствие взаимодействия ионов серебра с тетразолсодержащими лигандами, препятствующее проведению стадии осаждения галогенид-ионов.

Поскольку методы, основанные на стадии осаждения галогенидов серебра, оказались малоэффективными, нами была также изучена возможность получения дикарбоксилатокомплексов платины прямым замещением дикарбоксилатного лиганда. Необходимый для осуществления данной реакции бисоксалатоплатинат калия был синтезирован взаимодействием тетрахлоридо-

платинита калия с избытком оксалата калия. Реакцию проводили в течение 4 суток при 70 °С. Бисоксалатоплатинат калия был выделен в виде зеленовато-желтых игольчатых кристаллов в результате перекристаллизации полученного осадка из воды.

Взаимодействие бисоксалатоплатината калия с N-замещенными тетразолами **1b** и **1d** (схема 3) проводили в водно-спиртовой среде при 65–70 °С в течение недели. Выделенные продукты были охарактеризованы методами элементного анализа, ИК и ЯМР спектроскопии.

Полученные тетразолсодержащие дикарбоксилаток комплексы платины представляют собой кристаллические либо аморфные порошки, ограниченно растворимые в воде и спиртах (за исключением комплекса *цис*-Pt(**1d**)₂C₂O₄, который хорошо растворим во всех полярных органических растворителях), хорошо растворимые в диполярных апротонных растворителях, устойчивые при нагревании до 70 °С в водном растворе и до 150 °С в твердой фазе. Спектральные характеристики синтезированных комплексов были изучены методами ИК и ЯМР спектроскопии.

Отнесение полос поглощения в ИК спектрах дикарбоксилаток комплексов платины с N-замещенными тетразолами **1a–1d** были выполнены с использованием ранее опубликованных данных по интерпретации спектров их хлоридзамещенных аналогов [4]. В отличие от последних, в спектрах дикарбоксилаток комплексов платины в области 1650–1750 см⁻¹ наблюдаются интенсивные полосы, относящиеся к валентным колебаниям карбоксильной группы, что подтверждает замещение хлорид-ионов на оксалат-анион.

Согласно данным ¹H ЯМР спектроскопии, замещение хлорид ионов в составе комплексов платины с N-замещенными тетразолами на оксалат-анион приводит к еще большему дезэкранированию протонов заместителей в тетразольном цикле по сравнению со спектром некоординированного лиганда.

В ¹³C ЯМР-спектре оксалаток комплекса платины с 1-фенил-5-аминотетразолом сигнал C(5)-атома углерода тетразольного цикла (155,2 м. д.) наблюдается также в более слабом поле по сравнению со спектром его хлоридзамещенного аналога (154,3 м. д.). Наличие в составе полученного комплекса оксалатогруппы подтверждается появлением в ¹³C ЯМР спектре сигнала карбоксильного атома углерода при 165,6 м. д.

Определение антипролиферативной активности синтезированных комплексов в отношении двух линий опухолевых клеток человека проводилось колориметрически с использованием в качестве красителя кристаллического фиолетового по ранее описанной методике [9]. В качестве контроля использовали цисплатин и хлорсодержащие аналоги, а именно *цис*-Pt(**1b**)₂Cl₂ и *цис*-Pt(**1d**)₂Cl₂. Рассчитанные величины цитотоксической активности, выраженные в виде концентрации 50 %-ного ингибирования пролиферации клеток (ИК₅₀), приведены в таблице.

Как следует из представленных в таблице данных, активность полученных тетразолсодержащих оксалаток комплексов платины сопоставима с таковой для их хлорид-замещенных аналогов

**Антипролиферативная активность комплексов платины (II)
в отношении линий опухолевых клеток человека HT-29 и MDA-MB-231**

Комплекс	ИК ₅₀ , мкМ		
	HT-29	MDA-MB-231	HeLa [4]
<i>цис</i> -Pt(1a) ₂ C ₂ O ₄	>100	–	–
<i>цис</i> -Pt(1b) ₂ C ₂ O ₄	12,7 ± 0,1	20,8	–
<i>цис</i> -Pt(1d) ₂ C ₂ O ₄	16,1 ± 0,2	17,3 ± 1,2	–
<i>цис</i> -Pt(1a) ₂ (CH ₂ C ₂ O ₄)	>100	–	–
<i>цис</i> -Pt(1a) ₂ (C ₂ H ₄ C ₂ O ₄)	>100	–	–
<i>цис</i> -Pt(1b) ₂ Cl ₂	12,0 ± 2,0	10,5	16,0
<i>цис</i> -Pt(1d) ₂ Cl ₂	17,6	13,7	59,0
Цисплатин	7,0 [14]	10,0	8,0

Примечание. Здесь и далее: ИК₅₀ – концентрация комплекса, вызывающая 50 %-ное ингибирование пролиферации клеток данной клеточной линии; HT-29 – клеточная линия карциномы кишечника человека; MDA-MB-231 – клеточная линия карциномы грудной железы человека; HeLa – клеточная линия карциномы шейки матки человека.

и уступает активности цисплатина приблизительно в 2 раза. Следует отметить, что сохранение активности комплексов платины при замене уходящей группы с хлорид-ионов на дикарбоксилат-анион является достаточно редким явлением, поскольку известно, что подобная замена сопровождается замедлением процесса активации комплекса платины путем гидролиза и, например, при переходе от цисплатина к карбоплатину приводит к падению активности практически на порядок [15]. Согласно представленным данным, антипролиферативная активность полученных тетразолсодержащих дикарбоксилаток комплексов платины не зависит от природы уходящей группы, но увеличивается при увеличении размера гидрофобных заместителей в тетразольном цикле, что согласуется с ранее полученными данными по цитотоксической активности дихлоридо-комплексов платины (II) с N-замещенными тетразолами.

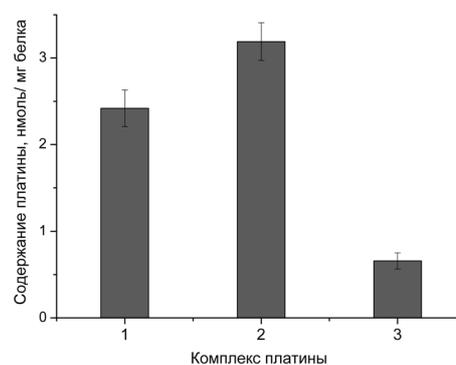
С целью проверки предположения о том, что цитотоксическая активность дикарбоксилаток комплексов платины непосредственно связана с их липофильностью, в настоящей работе предпринято экспериментальное определение внутриклеточного содержания дикарбоксилаток комплексов платины *цис*-Pt(**1a**)₂C₂O₄, *цис*-Pt(**1b**)₂C₂O₄ и *цис*-Pt(**1d**)₂C₂O₄, поглощаемых клетками карциномы кишечника человека HT-29. Определение проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии высокого разрешения по ранее описанной методике [10]. Полученные результаты представлены на рисунке в виде содержания платины в единице клеточной биомассы. Согласно данным, представленным на рисунке, комплексы *цис*-Pt(**1b**)₂C₂O₄ и *цис*-Pt(**1d**)₂C₂O₄ поглощаются клеткой в достаточно большом количестве, что согласуется с полученными данными о высокой липофильности данных соединений. В то же время для комплекса *цис*-Pt(**1a**)₂C₂O₄ наблюдается существенно более низкая внутриклеточная концентрация платины, что, по всей вероятности, и является причиной низкой антипролиферативной активности, проявляемой данным соединением и его аналогами *цис*-Pt(**1a**)₂(CH₂C₂O₄) и *цис*-Pt(**1a**)₂(C₂H₄C₂O₄), содержащими в качестве уходящей группы остатки малоновой и янтарной кислот.

Заключение. Разработаны эффективные методы получения тетразолсодержащих дикарбоксилаток комплексов платины, с помощью которых синтезированы оксалато-, малонато- и сукцинаток комплексы платины (II) с 1-*R*- и 2-*R*-5-аминотетразолами (*R* = 1-CH₃, 2-CH₃, 1-C₆H₅, 2-*t*-C₄H₉), представляющие собой аналоги третьего поколения платиновых противоопухолевых препаратов. В результате исследования физико-химических свойств полученных комплексов показано, что они обладают достаточной устойчивостью в растворе для проведения исследований их биологической активности. В результате экспериментального определения антипролиферативной активности и внутриклеточной концентрации исследуемых комплексов показано, что увеличение гидрофобности входящих в состав тетразольного лиганда заместителей сопровождается увеличением липофильности комплексов и их внутриклеточной концентрации, что и приводит к росту их цитотоксической активности, и выявлено два соединения-лидера, а именно оксалаток комплексы платины с 5-амино-1-фенил- и 5-амино-2-*трет*-бутилтетразолами *цис*-конфигурации, обладающие наилучшим сочетанием антипролиферативной активности, липофильности и растворимости.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, проект X12-084.

Литература

1. Komeda S., Takayama H., Suzuki T. et al. // *Metallomics*. 2013. Vol. 5. P. 461–468.
2. Uemura M., Suzuki T., Nishio K. et al. // *Metallomics*. 2012. Vol. 4. P. 686–692.
3. Voitekovich S. V., Serebryanskaya T. V., Lyakhov A. S. et al. // *Polyhedron*. 2009. Vol. 28. P. 3614–3620.
4. Serebryanskaya T. V., Yung T., Bogdanov A. A. et al. // *J. Inorg. Biochem.* 2013. Vol. 120. P. 44–53.
5. Pasetto L. M., D'Andrea M. R., Brandes A. A. et al. // *Critical Rev. Oncology/Hematology*. 2006. Vol. 60. P. 59–75.



Внутриклеточное содержание платины после инкубирования клеток опухолевой линии HT-29 в присутствии 15 мкМ растворов оксалаток комплексов платины *цис*-Pt(**1b**)₂C₂O₄ (1), *цис*-Pt(**1d**)₂C₂O₄ (2) и *цис*-Pt(**1a**)₂C₂O₄ (3) в течение 6 ч

6. Scheffler H., You Y., Ott I. // Polyhedron. 2010. Vol. 29. P. 66–69.
7. Ott I., Scheffler H., Gust R. // Chem. Med. Chem. 2007. Vol. 2. P. 702–707.
8. Ronald A. H., William G. F. // J. Am. Chem. Soc. 1954. Vol. 76, N 3. P. 923–926.
9. Voitekhovich S. V., Gaponik P. N., Lyakhov A. S., Ivashkevich O. A. // Tetrahedron. 2008. Vol. 64. P. 8721–8725.
10. Vorobyov A. N., Gaponik P. N., Petrov P. T., Ivashkevich O. A. // Synthesis. 2006. P. 1307–1312.
11. Abramkin S. A., Jungwirth U., Valiahdı S. M. et al. // J. Med. Chem. 2010. Vol. 53. P. 7356–7364.
12. Liu W., Chen X., Ye Q. et al. // Inorg. Chem. 2011. Vol. 50. P. 5324–5326.
13. Štarha P., Trávníček Z., Popa I. // J. Inorg. Biochem. 2010. Vol. 104. P. 639–647.
14. Schäfer S., Ott I., Gust R., Sheldrick W. S. // Eur. J. Inorg. Chem. 2007. P. 3034–3046.
15. Knox R. J., Friedlos F., Lydall D. A., Roberts J. J. // Cancer Res. 1986. Vol. 46. P. 1972–1979.

T. V. SEREBRYANSKAYA, Y. V. GRIGORIEV, I. M. GRIGORIEVA, O. A. IVASHKEVICH

azole@bsu.by

SYNTHESIS, PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF BISCAROXYLATE COMPLEXES OF PLATINUM (II) WITH N-SUBSTITUTED 5-AMINOTETRAZOLES

Summary

Effective methods for preparation of tetrazole-containing biscarboxylate complexes of platinum (II) were developed and novel oxalate, malonate and succinate platinum (II) complexes with 1-*R*- and 2-*R*-5-aminotetrazoles ($R = 1\text{-CH}_3, 2\text{-CH}_3, 1\text{-C}_6\text{H}_5, 2\text{-t-C}_4\text{H}_9$), analogues of third-generation antitumor platinum drugs were prepared. Studies of the obtained complexes showed their stability in solution, which is sufficient for biological studies. Cell proliferation tests and bioanalytical studies showed that increasing the hydrophobicity of substituents at the tetrazole heteroring leads to an increase in the intracellular concentration of complexes followed by a growth of their cytotoxic activity. Two platinum oxalate complexes with 5-amino-1-phenyl- and 5-amino-2-tert-butyltetrazoles having *cis*-configuration were chosen as leader compounds featuring the best combination of the antiproliferative activity, lipophilicity, and solubility.