

УДК 541.64.542.954

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ
НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТОВ ПЛЮРОНИКА Р85
С ДОКСОРУБИЦИНОМ¹

© 1999 г. Н. С. Мелик-Нубаров*, Т. Ю. Дородных*,
Е. В. Батракова**, М. Ю. Козлов*, Ю. Г. Сузальцева*, А. В. Кабанов**,
В. Ю. Алахов***, С. А. Аржаков*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.
Химический факультет
119899 Москва, Воробьевы горы

**Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy,
University of Nebraska Medical Center
600 South 42nd street, Omaha, NE 68198-6025, USA

***Institute Armand-Frappier, University of Quebec
531 Boulevard des Prairies, Building 18, Immunology Research Center, Laval,
Quebec H7N 4Z3, Canada

Поступила в редакцию 24.06.98 г.
Принята в печать 17.09.98 г.

Синтезированы два типа конъюгатов блок-сополимера этиленоксида (А) и пропиленоксида (Б) типа АБА (плюроник Р85) с противоопухолевым антибиотиком доксорубицином. Один из них (К1) получен ацилированием аминогруппы антибиотика N-гидрокисукциниimidным эфиром гемисукцината плюроника Р85. Другой конъюгат (К2) синтезирован алкилированием аминогруппы антибиотика бромацетильной группой, присоединенной к плюронику Р85. Исследована цитотоксичность полученных конъюгатов на культурах клеток человеческой карциномы яичника. Одна из исследованных клеточных культур (SKOV3) представляла собой линию, чувствительную к действию антибиотика, а другая (SKVLB) была выведена из первой по признаку устойчивости к химиотерапевтическим препаратам, обусловленной наличием на поверхности клеток белка gP-170, активно выбирающего лекарство из клетки. Оказалось, что К1 значительно менее эффективен для обоих типов клеток, чем свободный доксорубицин. В то же время К2 обладал значительно большей цитотоксичностью для устойчивых клеток, чем свободный антибиотик, а его активность по отношению к чувствительным клеткам не отличалась от активности свободного лекарства. В эксперименте на мышах линии BALB/c продемонстрирована чрезвычайно низкая общая токсичность конъюгата К2. Полученные результаты открывают перспективы использования К2 для лечения опухолей, обладающих множественной лекарственной устойчивостью.

Блок-сополимеры этиленоксида (А) и пропиленоксида (Б) типа АВА (проксанолы, плюроники) содержат в своем составе достаточно протяженный гидрофобный и два гидрофильных блока, что обуславливает их поверхностную активность и способность образовывать

мицеллы [1–4]. С другой стороны, указанные полимеры обладают очень низкой токсичностью [5]. Это открывает широкие перспективы их использования в медицине в качестве микроконтейнеров для целенаправленной доставки биологически активных веществ [6–9], компонентов искусственной крови [10–12] и агентов, способствующих преодолению биологических барьеров [13, 14]. Недавно было обнаружено,

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 94-03-08521а).

что плюроники L61 и P85 способны усиливать противоопухолевую активность антибиотиков антрациклического ряда (доксорубицина, фармараубицина и дауномицина) [14, 15]. Более того, оказалось, что совместное применение антибиотика в смеси с плюроником способствует преодолению множественной лекарственной устойчивости, возникающей при длительном применении лекарственной терапии. Ранее отмечено, что аналогичным эффектом обладают и другие ПАВ (например, Triton X-100) [16]. Мы предположили, что ковалентное присоединение доксорубицина к плюронику может усилить его биологическую активность. В настоящей работе предложен эффективный метод присоединения доксорубицина к плюронику и изучена противоопухолевая активность полученных конъюгатов на культурах клеток.

В литературе встречается большое количество примеров химической модификации доксорубицина [17–23], его конъюгирования с белками [24–29] и полимерами [24, 30, 31]. Во многих случаях ацилирование аминогруппы способствует значительному понижению биологической активности антибиотика. Поэтому было высказано предположение, что положительно заряженная аминогруппа доксорубицина существенна для его взаимодействия с двухцепочечной ДНК [32]. Ацилирование аминогруппы ангидридами кислот [18] и ее конъюгирование с аминогруппами полимера с помощью карбодиимида [29–31] приводят к образованию незаряженной амидной связи между доксорубицином и высокомолекулярным носителем. Напротив, при алкилировании аминогруппы доксорубицина галоидным алкилом образуется вторичный амин, положительно заряженный при нейтральных значениях pH. В настоящей работе мы сравнили цитотоксическую активность доксорубицина, конъюгированного с полимером через амидную связь (конъюгат K1) и через вторичную аминогруппу (конъюгат K2).

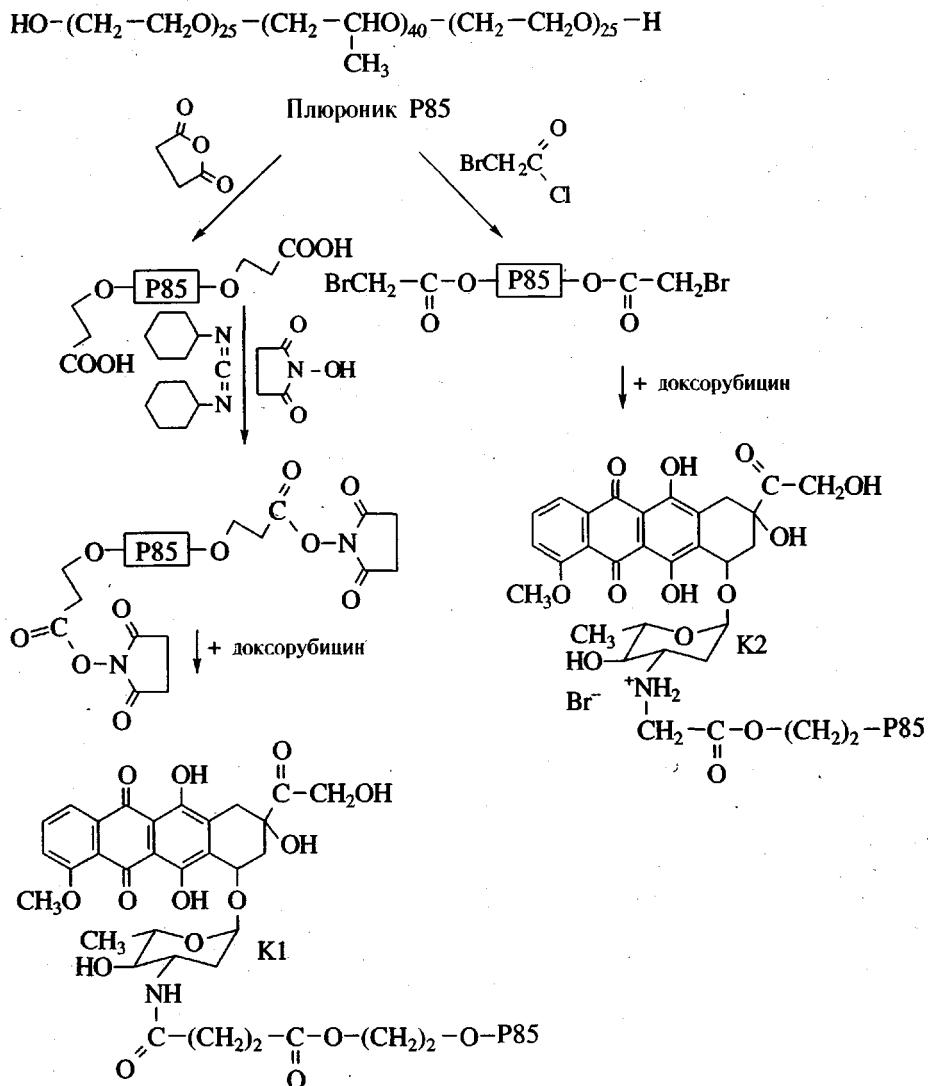
Блок-сополимер окиси этилена и окиси пропилена (плюроник P85 – продукт фирмы "Serva", Германия) очищали от примеси пероксидных групп путем обработки водным раствором йодистого натрия с последующей хроматографией на сефадексе LH-20, используя в качестве элюента 90%-ный этанол.

Хроматографически гомогенный доксорубицин был получен в Московском институте антибиотиков.

Бромацетилхлорид (продукт фирма "Sigma", США) использовали после вакуумной перегонки;

N,N-диизопропилэтамин и триэтиламин осушали выдерживанием над оксидом бария с последующей перегонкой в вакууме. 4-Диметиламинопиридин (ДМАП) (фирма "Aldrich", США), янтарный ангидрид ("Sigma"), 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота) ("Sigma") и 2-меркаптоэтанол ("Sigma") использовали без дополнительной очистки. Бензол абсолютизовали кипячением над металлическим натрием в течение 3–4 ч с последующей перегонкой. 1,4-Диоксан выдерживали в течение 2 суток над гранулированной щелочью для удаления примеси пероксидов, перегоняли над щелочью, после чего абсолютизовали кипячением с обратным холодильником над металлическим натрием в течение 10–12 ч и перегоняли. ДМСО и ДМФА абсолютизовали выдерживанием над оксидом бария в течение 24 ч с последующей вакуумной перегонкой на водяной бане.

Синтез гемисукцината плюроника P85 проводили по ранее описанной методике [33]. 2 г очищенного плюроника P85 (M_r , 4500, 0.88 ммоля гидроксильных групп) растворяли в 7 мл абсолютного бензола и отгоняли азеотроп водя–бензол при пониженном давлении. После упаривания всего растворителя процедуру повторяли дважды для удаления следов воды из препарата полимера. Затем сухой полимер растворяли в 5 мл абсолютного диоксана и добавляли 110 мг (1,1 ммоля) янтарного ангидрида, 110 мг (0.89 ммоля) ДМАП и 0.124 мл (0.89 ммоля) триэтиламина. Реакционную смесь инкубировали 24 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании, после чего удаляли растворитель упариванием в вакууме. Остаток растворяли в 4 мл этанола, содержащего 1.78 ммоля соляной кислоты, необходимой для перевода карбоксильных групп в кислую форму. Затем плюроник очищали методом ГПХ на Сефадексе LH-20 в среде этанола. Плюроник в этих условиях элюируется вслед за исключенным объемом. Фракции, содержащие плюроник, концентрировали в вакууме и высушивали в вакуум-экскаторе над хлористым кальцием. Количество полимера определяли гравиметрически, а количество карбоксильных групп определяли с помощью pH-метрического титрования. В типичных экспериментах выход полимера составлял 500–600 мг (25–30% от теоретического), и препарат содержал около 1.8–1.9 моля карбоксильных групп на цепь полимера.



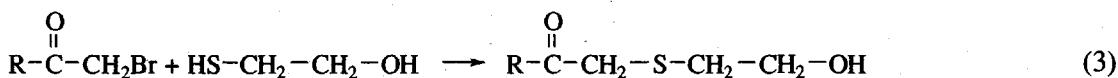
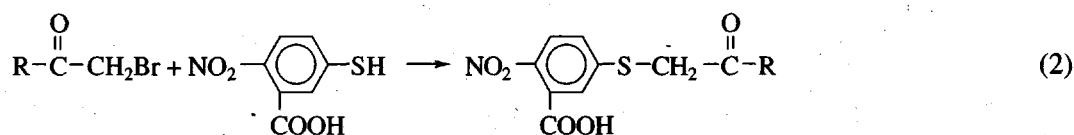
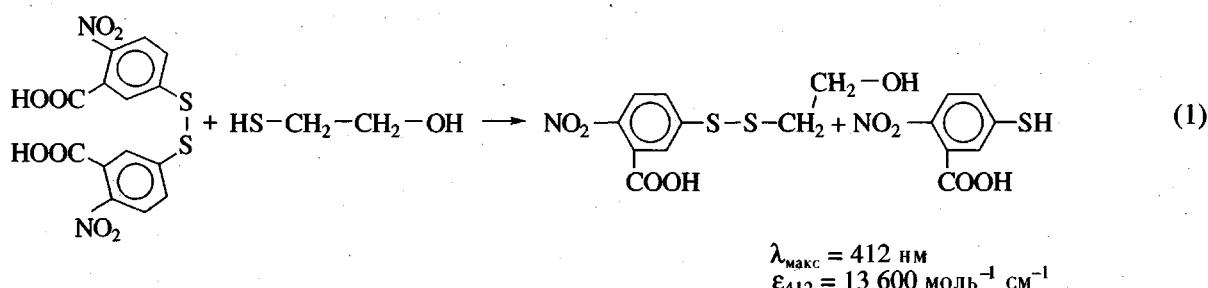
Бромацетилирование плюроника осуществляли следующим образом. 2 г плюроника P85 (0.88 ммоля OH-групп) тщательно осушали путем растворения в 7 мл абсолютного бензола и упариванием азеотропа. Процедуру повторяли 3 раза, после чего полимер растворяли в 5 мл абсолютного диоксана. К полученному раствору добавляли 2 г безводного карбоната натрия и 293 мг бромацетилхлорида в 2 мл абсолютного диоксана. Добавление хлорангидрида проводили небольшими порциями по 0.1 мл в течение 40 мин при постоянном перемешивании, следя за тем, чтобы температура не поднималась выше 35°C. Повышение температуры приводит к образованию побочных продуктов желто-коричневого цвета. Образующийся в ходе реакции диоксид углерода отводили из реакционного сосуда через хлоркальциевую трубку. Через 30 мин после добавления всего бромацетилхлорида реакционную смесь охлаждали в

бане со льдом и добавляли по каплям 5 мл этанола при постоянном перемешивании. Растворитель и образовавшийся этилбромацетат удаляли на роторном испарителе, а полимер растворяли в этаноле и очищали с помощью ГПХ на колонке с Сефадексом LH-20 (2 × 65), используя 90%-ный этанол в качестве элюента. Фракции, содержащие полимер, объединяли, концентрировали на роторном испарителе, и количество полимера определяли гравиметрически. Выход полимера составлял 25–30% от теоретического (500–600 мг).

Содержание бромацетильных групп в полимере определяли спектрофотометрически, проводя хромогенную реакцию между модифицированным плюроником, 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ) и 2-меркаптоэтанолом. На первой стадии меркаптоэтанол вступает в реакцию с

ДТНБ с образованием хромофорного продукта, имеющего максимум поглощения при 412 нм с коэффициентом экстинкции 13 600 моль⁻¹ см⁻¹ [34] (реакция (1)). Затем 5-тио-2-нитробензойная кислота реагирует с содержащимся в смеси галоидным алкилом с образованием неокрашенного продукта (реакция (2)).

Кроме того, галоидный алкил может алкилировать и исходный 2-меркаптоэтанол (реакция (3)), также уменьшая окраску реакционной смеси. Количество содержащегося в образце галоидного алкила определяли по калибровочной кривой, проводя аналогичную реакцию с бромуксусной кислотой в качестве эталона.



0.1 мл 0.2 мМ раствора 2-меркаптоэтанола в 0.1 М фосфатном буфере с pH 7.0 смешивали с 0.1 мл буфера, содержащего 0.01–0.2 мМ бромуксусной кислоты (в качестве эталона) или бромацетилированный плюроник, содержащий неизвестное количество бромацетильных групп. Затем ко всем растворам прибавляли 0.01 мл 10 мМ раствора 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) в 1.5 М NaCl и выдерживали образцы 18 ч при 25°C. Затем растворы фотометрировали в 96-лучочных планшетах для иммуноферментного анализа с использованием многоканального фотометра Titertek Multiscan Plus фирмы "Labsystems" (Финляндия). Содержание бромацетильных групп рассчитывали по калибровочной кривой, измеряемой в том же эксперименте.

Присоединение доксорубицина к гемисукцинату плюроника проводили с помощью метода активированных эфиров. 1 г сукцинилированного плюроника (0.4 ммоля карбоксильных групп) тщательно осушали путем азеотропной отгонки воды, как описано ранее, после чего растворяли в 2 мл сухого ДМФА. К раствору добавляли 120 мг N,N-дициклогексилкарбодииамида ("Sigma", США) (0.6 ммоля) и 69 мг N-гидроксисукцинимида (0.6 ммоля) и реакционную смесь выдерживали в течение суток при комнатной температуре. За-

тем кристаллы дициклогексилмочевины удаляли декантацией, а к раствору прибавляли 2 мл раствора доксорубицина гидрохлорида в ДМСО (50 мг/мл, 0.17 ммоль), содержащего 10 мг дизопропилэтиламина. Третичный амин добавлялся в качестве основания, переводящего доксорубицин в аминную форму. Ацилирование аминогруппы доксорубицина заканчивалось через 18–24 ч при комнатной температуре, после чего конъюгат очищали от не присоединившегося доксорубицина с помощью ГПХ на Сефадексе LH-20 (колонка 2 × 65 см), используя 90%-ный этанол в качестве элюента. Выход конъюгата на этой стадии составлял около 70%, причем в составе конъюгата на полимерную цепочку приходилось, как правило, 0.20–0.25 остатка доксорубицина.

Содержание доксорубицина в составе конъюгата определяли на УФ-спектрофотометре, по измерению оптической плотности растворов при 490 нм. Поскольку коэффициент экстинкции доксорубицина зависит от полярности микроокружения, спектрофотометрическое определение его концентрации в присутствии мицелл плюроника не вполне корректно: мицеллы могут частично захватывать доксорубицин изменяя полярность его микроокружения. Поэтому определение содержания доксорубицина в составе конъюгата

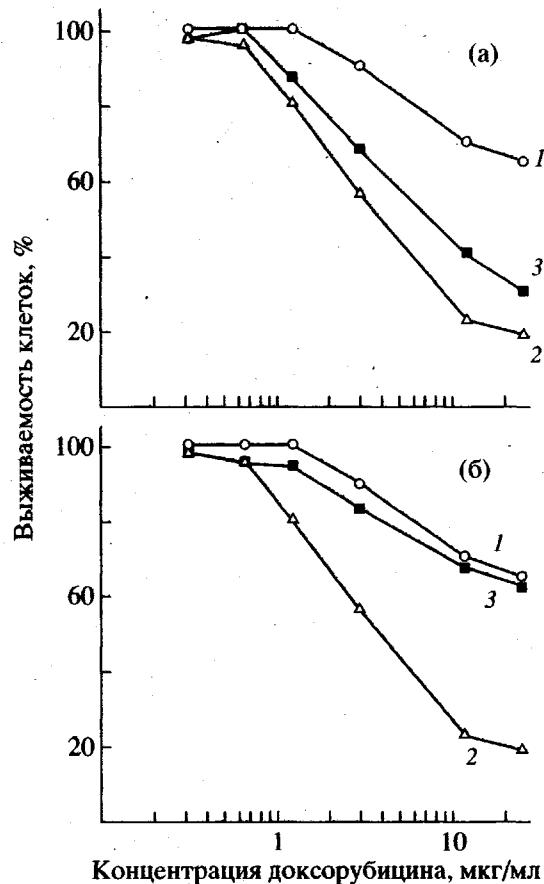


Рис. 1. Цитотоксичность конъюгатов доксорубицина с плюроником (1, 2) и свободного доксорубицина (3) по отношению к клеткам карциномы яичника человека, чувствительным к действию свободного доксорубицина. 1 – K1, 2 – K2, а – линия SKOV3, б – линия SKVLB, обладающая множественной лекарственной устойчивостью.

проводили, растворяя конъюгат в 95%-ном этаноле, исключив тем самым образование мицелл. В контрольных экспериментах было продемонстрировано, что коэффициент экстинкции доксорубицина в этаноле (он составил $25133 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$) не зависит от содержания плюроника в растворе.

Конъюгирование доксорубицина с бромацетилированным плюроником осуществляли, алкилируя первичную аминогруппу доксорубицина бромацетильным остатком, присоединенным к цепи плюроника. 1 г плюроника, содержащего 1.8 бромацетильных групп на полимерную цепь, тщательно осушали с помощью азеотропной отгонки воды с абсолютным бензолом, как описано выше. Высушенный плюроник растворяли в 3 мл абсолютного ДМСО и добавляли 2 мл раствора доксорубицина гидрохлорида (50 мг/мл, 0.17 ммоль) и 20 мг N,N-дизопропилэтамина. Реакционную

смесь выдерживали 12 ч в темноте при комнатной температуре, после чего конъюгат отделяли от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси с помощью ГПХ на Сефадексе LH-20, используя 95%-ный этанол в качестве элюента. Концентрацию полимера и количество доксорубицина, приходящегося на полимерную цепь, определяли аналогично тому, как было описано выше для сукцинилированного плюроника. Выход конъюгата на этой стадии составлял 60–70%, причем на полимерную цепь приходилось 0.28–0.35 моля доксорубицина в составе конъюгата.

Цитотоксичность конъюгатов определяли на культурах клеток. Клетки карциномы яичника человека, чувствительные к действию свободного доксорубицина (линия SKOV3), и клетки, обладающие множественной лекарственной устойчивостью (линия SKVLB), культивировали в среде RPMI-1640 ("Sigma") с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Клетки высевали в лунки стерильного 96-луночного пластикового планшета в количестве 200000 на лунку за 24 ч до начала эксперимента. Затем в культуральную среду вносили растворы свободного доксорубицина и его конъюгатов с плюроником в физиологическом растворе. Концентрацию антибиотика варьировали от 2 до 25 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 1 ч в стерильных условиях, после чего отмывали от лекарства свежей питательной средой, и оставляли в среде на 3 суток для проявления цитотоксического эффекта. Затем оставшиеся живые клетки окрашивали метил-тетразолием синим, согласно работе [35]. В каждую лунку добавляли по 0.1 мл раствора красителя (0.4 мг/мл), и клетки инкубировали 4 ч при 37°C , после чего экстрагировали из клеток окрашенный продукт с помощью ДМСО, внося его по 0.1 мл на лунку. Растворы фотометрировали при 490 нм с помощью плашечного фотометра Titertek Multiscan Plus фирмы "Labsystems" (Финляндия). Выживаемость опухолевых клеток рассчитывали в процентах по отношению к контрольным клеткам, не обработанным лекарством.

Общую токсичность полученных конъюгатов исследовали в экспериментах на мышах линии BALB/c (самки, возраст 4 месяца) по стандартной методике [36, 37]. Количество животных в каждой группе было не менее 6 особей. Растворы конъюгатов и свободного доксорубицина в стерильном физиологическом растворе (из расчета 0.2 мл/20 г живого веса) вводили в хвостовую вену. Концентрацию растворов варьировали от 0.1 до 2 мг/мл, что соответствует дозам от 1 до 20 мг/кг живого веса. Далее в течение 4 недель фиксировали

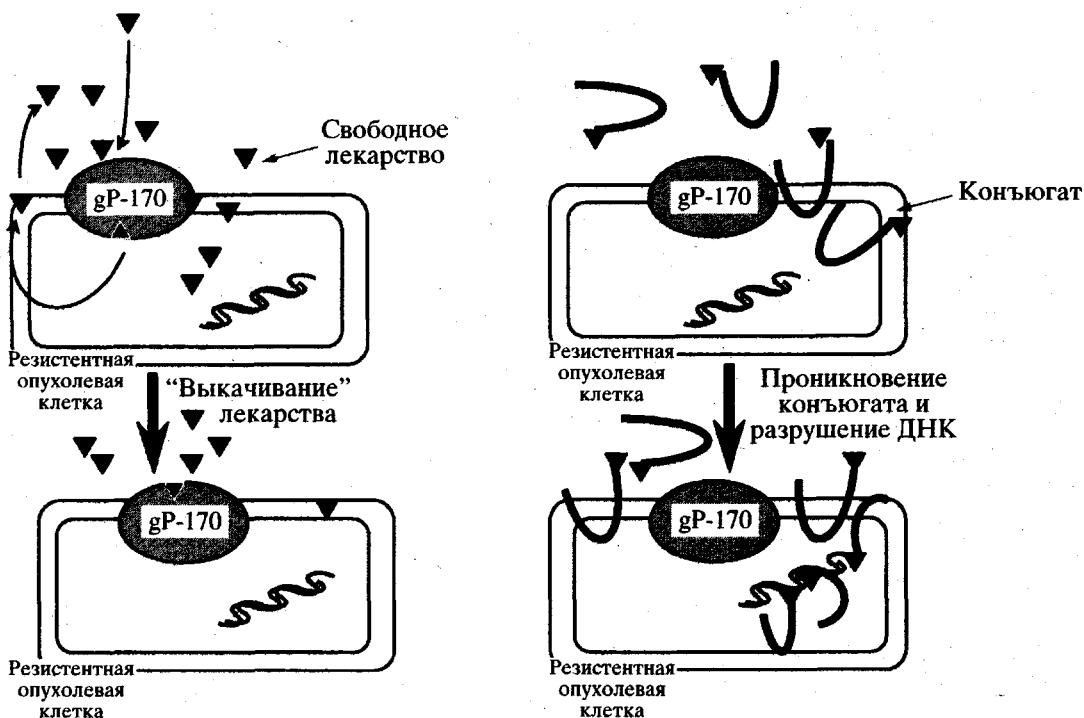


Рис. 2. Схематическое представление предполагаемого механизма действия конъюгата доксорубицина с плюроником на опухолевые клетки, резистентные по отношению к действию доксорубицина.

количество выживших особей в каждой группе. Данные обрабатывали с помощью пробит-метода, и строили кривые зависимости количества погибших животных от дозы лекарства, нормированной на вес животного.

Конъюгаты K1 и K2 обнаруживают различную цитотоксичность по отношению к клеткам карциномы яичника человека SKOV3, чувствительным к действию свободного доксорубицина (рис. 1а). K1 оказывается значительно менее токсичным по отношению к этим клеткам, чем свободный доксорубицин. Такой результат хорошо согласуется с данными Катаоки с сотр., обнаружившими резкое падение цитотоксичности доксорубицина, иммобилизованного через амидную связь на блок-сополимере аспарагиновой кислоты и этиленоксида [30, 31]. Цитотоксичность K2 оказывается близкой цитотоксичности свободного доксорубицина. Таким образом, присоединение доксорубицина к плюронику через вторичную аминогруппу не изменяет его цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам. Это, вероятно, связано с тем, что вторичная аминогруппа в конъюгате не препятствует образованию комплекса доксорубицина с ДНК, ответственного за физиологическое действие антибиотика.

Свободный доксорубицин (кривая 3) значительно (по крайней мере, в 10 раз) менее токсичен

для клеток, устойчивых к лекарствам, чем для чувствительных клеток (рис. 1б). Конъюгирование его с плюроником через амидную связь не изменяет его цитотоксичность по отношению к резистентным клеткам. В то же время конъюгирование доксорубицина с плюроником путем алкилирования аминогруппы (конъюгат K2 – кривая 2) приводит к значительному увеличению его цитотоксичности по отношению к клеткам, устойчивым к лекарственным препаратам. Можно предположить, что молекула полимера ‘экранирует’ лекарство, делая его недоступным для белковых насосов, выбрасывающих свободное лекарство из клеток (рис. 2).

Чтобы выяснить специфичность цитотоксичности K2 по отношению к опухолевым клеткам, мы сравнили общую токсичность свободного доксорубицина и конъюгата K2 для мышей линии BALB/c (рис. 3). Оказалось, что токсичность конъюгата K2 значительно ниже, чем токсичность свободного антибиотика: присоединение доксорубицина к плюронику делает его совершенно безвредным для организма в дозах, соответствующих 100%-ной гибели животных, получавших свободный антибиотик. Таким образом, синтезированный в работе конъюгат специфически токсичен по отношению к опухолевым клеткам, причем его



Рис. 3. Общая токсичность свободного доксорубицина (1) и его конъюгата с плюроником K2 (2) для мышей линии BALB/c.

применение позволяет преодолеть лекарственную устойчивость к поливалентной терапии рака.

Авторы выражают глубокую признательность И.Н. Топчиевой за большую помощь в обсуждении результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmolka I.R. // J. Am. Oil Soc. 1977. P.110.
2. Mortensen K., Brown W. // Macromolecules. 1993. V. 26. № 16. P. 4128.
3. Alexandridis P., Holzwarth J., Hatton T. // Macromolecules. 1994. V. 27. № 9. P. 2414.
4. Mortensen K., Pedersen J. // Macromolecules. 1993. V. 26. № 4. P. 805.
5. Miyazaki S., Ohkawa Y., Takada M., Attwood D. // Chem. Pharm. Bull. 1992. V. 40. № 8. P. 2224.
6. Bodmeier R., Paeratakul G. // Pharm. Res. 1989. V. 6. № 8. P. 725.
7. Dix J.A., Verkman A.S. // Biochemistry. 1990. V. 29. № 7. P. 1949.
8. Slepnev V.I., Kuznetsova L.E., Gubin A.N., Batrakova E.V., Alakhov V.Yu., Kabanov A.V. // Biochem. Int. 1992. V. 26. № 4. P. 587.
9. Kabanov A.V., Slepnev V.I., Kuznetsova L.E., Batrakova E.V., Alakhov V.Yu., Melik-Nubarov N.S., Sveshnikov P.G., Kabanov V.A. // Biochem. Int. 1992. V. 26. № 6. P.1035.
10. Медико-биологические аспекты применения эмульсий перфторированных углеводородов / Под ред. Иваницкого Г.Р., Белоярцева Ф.Ф. Пущино, 1983. С. 9.
11. Gever R.P. // Artif. Cells Artif. Organs. 1988. V. 16. № 1. P. 31.
12. Omyanagy H., Saitoh Y., Uchida T., Watanabe M., Yamouchi K., Yokoyama K., Mitsuno T. // Biomaterials. 1992. V. 20. № 24. P. 941.
13. Kabanov A.V., Batrakova E.V., Melik-Nubarov N.S., Fedoseev N.A., Dorodnich T.Yu., Alakhov V.Yu., Chekhonin V.P., Nazarova I.R., Kabanov V.A. // J. Controlled Release. 1992. V. 22. № 1. P. 141.
14. Alakhov V.Y., Moskaleva E.Y., Batrakova E.V., Kabanov A.V. // Bioconjugate Chem. 1996. V. 7. № 2. P. 209.
15. Venne A., Li S., Mandeville R., Kabanov A., Alakhov V. // Cancer Res. 1996. V. 56. № 11. P. 3626.
16. Loe D.W., Sharom F.J. // Br. J. Cancer. 1993. V. 68. № 2. P. 342.
17. Danesi R., Bernardini N., Agen C., Costa M., Zaccaro L., Pieracci D., Malvaldi G., Del Tacca M. // Cancer Chemother Pharmacol. 1992. V. 29. № 2. P. 261.
18. Farquhar D., Newman R.A., Zuckerman J.E., Andersson B.S. // J. Med. Chem. 1991. V. 34. № 4. P. 561.
19. Acton E.M., Tong G.L., Taylor D.L., Filippi J.A., Wolgemuth R.L. // J. Med. Chem. 1986. V. 55. № 10. P. 1225.
20. Pratesi G., Casazza A.M., Di Marco A. // Cancer Treat. Rep. 1978. V. 62. № 1. P.105.
21. Vecchi A., Cairo M., Mantovani A., Sirohi M., Spreadfico F. // Cancer Treat. Rep. 1978. V. 62. № 1. P. 111.
22. Parker L.M., Hirst M., Israel M. // Cancer Treat. Rep. 1978. V. 62. № 1. P. 119.
23. Acton E.M., Tong G.L., Taylor D.L., Filippi J.A., Wolgemuth R.L. // J. Med. Chem. 1986. V. 29. № 7. P. 1225.
24. Willner D., Trail P.A., Hofstead S.J., King H.D., Lasch S.J., Braslawsky G.R., Greenfield R.S., Kaneko T., Firestone R.A. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. № 4. P. 521.
25. Trail P.A., Willner D., Lasch S.J., Henderson A.J., Hofstead S., Casazza A.M., Firestone R.A., Hellström I., Hellström K.A. // Science. 1991. V. 261. № 1. P. 212.
26. Shih L.B., Goldenberg D.M., Xuan H., Lu H.W.-Z., Mattes J., Hall T.C. // Cancer Immunol. Immunother. 1994 V. 38. № 1. P. 92.
27. Shih L.B., Goldenberg D.M., Xuan H., Lu H.W.-Z., Sharkey R.M., Hall T.C. // Cancer Res. 1991. V. 51. № 12. P. 4192.
28. Lau A., Bürubü G., Ford C.H., Gallant M. // Bioorg. Med. Chem. 1995. V. 3. № 4. P. 1305.
29. Lau A., Bürubü G., Ford C.H. // Bioorg. Med. Chem. 1995. V. 3. № 4. P. 1299.
30. Yokoyama M., Miyauchi M., Yamada N., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K., Inoue S. // Cancer Res. 1990. V. 50. № 6. P. 1693.
31. Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Ekimoto H., Shiba-zaki C., Kataoka K. // Cancer. Res. 1991. V. 51. № 11. P. 3229.

32. Niedle S. // Topics in Antibiotic Chemistry. Ed. by Sammes P.G. Chichester: Ellis Horwood, 1978. V. 2. P. 230.
33. Zalipsky S., Gilon C., Zilkha A. // Eur. Polym. J. 1983. V. 19. P. 1177.
34. Ellman G.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70.
35. Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Pauli K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. // Cancer Res. 1988. V. 48. № 20. P. 4827.
36. Лакин К.М., Крылов Ю.Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. М.: Наука, 1981.
37. Блохин Н.И., Переводчикова Р.И. Химиотерапия опухолевых заболеваний. М.: Медицина, 1984.

Synthesis and Biological Activity of the Functional Block-Copolymers Based on Pluronic P85-Doxorubicin Conjugates

N. S. Melik-Nubarov*, T. Yu. Dorodnykh*, E. V. Batrakova**, M. Yu. Kozlov*,
Yu. G. Suzdal'tseva*, A. V. Kabanov**, V. Yu. Alakhov***, and S. A. Arzhakov*

*Department of Chemistry, Moscow State University,
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

**Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Nebraska Medical Center,
600 South 42nd Street Omaha, NE 68198-6025 USA

***Institute Armand-Frappier, University of Quebec, 531 Boulevard des Prairies,
Building 18, Immunology Research Center, Laval, Quebec H7N 4Z3, Canada

Abstract—Two types of the conjugate of ethylene oxide (A)–propylene oxide (B) block copolymer (ABA type, pluronic P85) with the antitumor antibiotic doxorubicin were synthesized. Conjugate K1 was obtained by acylating the amino groups of doxorubicin with N-hydroxysuccinimide ester of pluronic P85 hemisuccinate. Conjugate K2 was synthesized by alkylating the amino group of the drug with a bromoacetyl residue attached to the pluronic. The cytotoxicity of the K1 and K2 conjugates was studied on the human ovary carcinoma cell cultures SKOV3 and SKVLB. The SKOV3 cell line is sensitive to doxorubicin, and the SKVLB is a multi-drug-resistant derivative of the former line, with the cell surface containing a gP-170 protein effectively eliminating drugs from the cell. It was found that the K1 conjugate possesses a much lower cytotoxicity with respect to the cells of both types as compared to the free doxorubicin. At the same time, K2 showed a much more pronounced cytotoxicity than the free antibiotic toward stable cells, while its activity toward sensitive cells was comparable to that of the free drug. Experiments on mice of the BALB/c line showed extremely low general toxicity of the K2 conjugate. These results show good prospects for using K2 in the therapy of multi-drug-resistant tumors.