

© Коллектив авторов, 2002

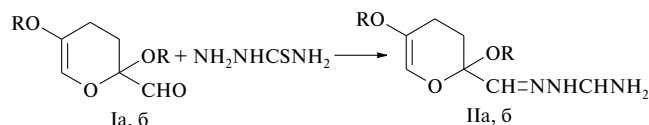
Н. А. Кейко, Л. Г. Степанова, М. Г. Воронков, Г. И. Потапова,
Н. О. Гудртов, Е. М. Трещалина

СИНТЕЗ, ДНК-ИНГИБИРУЮЩАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОСЕМИКАРБАЗОНА 2-ФОРМИЛ-2,5-ДИМЕТОКСИ-2,3-ДИГИДРО-4Н-ПИРАНА, ЕГО ЭТИЛЬНОГО АНАЛОГА И МЕДНОГО КОМПЛЕКСА

Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН;
Институт канцерогенеза Российского онкологического центра АМН РФ, Москва

Известно, что тиосемикарбазоны гетероциклических альдегидов проявляют противоопухолевую активность и являются ингибиторами синтеза ДНК [1 – 3].

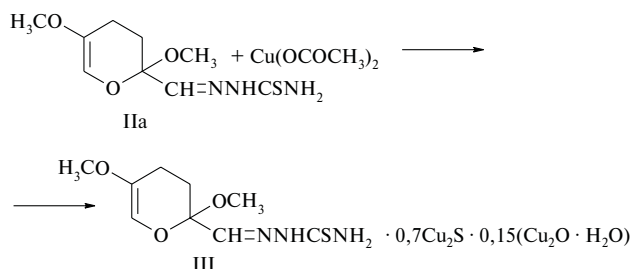
С целью расширения арсенала новых противоопухолевых средств нами получены тиосемикарбазоны циклодимеров 2-алкоксиакролеинов — тиосемикарбазоны 2-формил-2,5-диалкокси-2,3-дигидро-4Н-пиранов (IIa, б):



R = CH₃ (а); C₂H₅ (б)

Димеры 2-алкоксиакролеинов (Ia, б), являясь циклическими виниловыми эфирами, легко гидролизуются в кислой среде, образуя сложную смесь продуктов; поэтому их тиосемикарбазоны IIa, б удалось получить только в водно-спиртовой среде при поддержании pH среды в интервале 8 – 12. Выходы составляют 70 – 90 %. Строение полученных тиосемикарбазонов доказано данными элементного анализа и УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии (табл. 1).

Поскольку комплексные соединения тиосемикарбазонов с солями металлов проявляют более выраженное противоопухолевое действие при относительно меньшей токсичности, более липофильны, легко проникают в клетку и могут являться депо-формой цитотоксического лиганда [4], нами синтезирован медный комплекс тиосемикарбазона 2-формил-2,5-диметокси-2,3-дигидро-4Н-пирана (IIa) — комплекс (III):



Синтез основан на взаимодействии эквимольных количеств тиосемикарбазона IIa с ацетатом меди в во-

дно-спиртовой среде (1:1). Выход комплекса составил всего 30 %, т.к. комплексообразование сопровождается восстановлением двухвалентной меди до одновалентной под действием исходного тиосемикарбазона. Такая окислительно-восстановительная реакция при получении медных комплексных соединений тиосемикарбазонов наблюдалась ранее [5]. На основании данных элементного анализа, ИК- и УФ-спектроскопии, ЭПР и ЯМР комплексному соединению III приписана структура IIa · 0,7 Cu₂S · 0,15 (Cu₂O · H₂O). По данным ЭПР, комплексное соединение III как производное одновалентной меди диамагнитно.

Для определения центров координации проведен сравнительный анализ ИК-спектров лиганда IIa и его комплексного соединения с медью III, а также дейтерированного производного последнего. Полосы валентных колебаний групп NH и NH₂ при 3340, 3320 и 3200 см⁻¹, наблюдаемые в ИК-спектре IIa, сохраняют свое положение и в спектре комплекса III. Наблюдаемое сильное уширение этих полос в спектре III можно объяснить наличием в комплексе молекул воды. Сравнение спектра комплекса III и его N⁴ дейтеропроизводного позволило идентифицировать колебания δ NH₂ (при 1580 см⁻¹); эта полоса в комплексе остается неизменной по сравнению со спектром лиганда. С другой стороны, в результате комплексообразования полоса валентных колебаний ν_{C=N} смещается от 1570 до 1600 см⁻¹, что свидетельствует о взаимодействии неподеленной пары электронов атома азота группы C=N с атомом меди. Кроме того резкое падение интегральной интенсивности полос при 800 и 900 см⁻¹ в спектре комплекса, вклад в которые дает колебание ν_{C=S}, свидетельствует о координации атома меди с группой C=S [6]. Очевидно, что молекулы тиосемикарбазона IIa при комплексообразовании проявляют бидентатность.

Экспериментальная химическая часть

ПМР-спектры получены на приборе Tesla 487В с рабочей частотой 80 МГц с ГМДС в качестве внутреннего стандарта. ИК-спектры снимали на приборе Specord IR-75. УФ-спектры снимали на приборе Specord

Спектральные характеристики соединений Па, Пб и Пш

Спектр	Па	Пб	Пш
ПМР, δ , м.д. (CHCl ₃)	2,00(CH ₂), 6,12(CH=), 7,52(CH=N), 3,42(OCH ₃), 8,47(NH), 7,77 и 7,82(NH ₂)	2,03(CH ₂), 6,12(CH=), 7,52(CH=N), 3,60(OCH ₃), 1,15(CH ₃), 11,3(NH), 8,22 и 7,52(NH ₂)	2,09(CH ₂), 6,12(CH=), 7,82(CH=N), 3,40(OCH ₃), 11,3(NH), 7,37(NH ₂).
ИК (KBr), ν_{\max} , см ⁻¹	870 – 909 (C = S), 1570 – 1600 (C = N), 3200, 3320, 3450 (NH, NH ₂)	860 – 900 (C = S), 1535 – 1600 (C = N), 3240, 3280, 3450 (NH, NH ₂)	900 (C = S), 1580(C = N), 3200, 3320, 3450 (NH, NH ₂)
УФ(этанол) λ_{\max} , нм	229, 276, 344	265, 338	227, 256, 277, 416

UV VIS. ЭПР-спектры получены на ЭПР-спектрометре “Рубин” (9,14 ГГц) при температуре 77°C, растворитель ДМСО, в качестве эталона использовался Mn²⁺ в MgO иДФПГ.

Тиосемикарбазон 2-формил-2,5-диметокси-2,3-дигидро-4Н-пирана (Па). Растворяют 2,3 г (0,025 моль) тиосемикарбазида в 220 мл водно-спиртовой смеси, 7:3. Прибавлением щелочи доводят рН среды до 9 – 10, нагревают до 60°C и добавляют 3,1 г (0,018 моль) 2-формил-2,5-диметокси-2,3-дигидро-4Н-пирана (Ia). Реакционную смесь нагревают при 50°C в течение 10 мин, охлаждают и получают Па: выход 3,2 г (72 %), т.пл. 120°C (из C₂H₅ОН). C₉H₁₅N₃O₃S. Спектральные данные приведены в табл. 1.

Тиосемикарбазон 2-формил-2,5-диэтокси-2,3-дигидро-4Н-пирана (Пб). Растворяют 2,0 г (0,022 моль) тиосемикарбазида в 200 мл водно-спиртовой смеси. Прибавлением щелочи доводят рН среды до 9 – 10, нагревают до 60°C и добавляют 4,5 г (0,025 моль) 2-формил-2,5-диэтокси-2,3-дигидро-4Н-пирана (Iб). Реакционную смесь нагревают при 60°C в течение 17 мин, охлаждают и получают выход 5,5 г (90 %), т.пл. 153°C (из C₂H₅ОН). C₁₁H₁₉N₃O₃S. Спектральные данные приведены в табл. 1.

Медный комплекс тиосемикарбазиона 2-формил-2,5-диметокси-2,3-дигидро-4Н-пирана (Пш). К раствору 5,6 г (0,022 моль) Па в 150 мл водного этанола (1:1) медленно прибавляют раствор 4,5 г (0,022 моль) ацетата меди в 30 мл воды. После упаривания реакционной смеси при 20°C наполовину выпадает осадок, который промывают водой, эфиром и получают Пш: выход 2,6 г (30 %), т.разл. 170°C. C₉H₁₅S_{1,7}Cu_{1,7}N₃O₄. Спектральные данные приведены в табл. 1.

Таблица 2
ДНК-ингибирующее действие соединения Пш *in vitro*

Соединение	Доза, мкг/мл	% торможения синтеза ДНК	
		3 ч	24 ч
Соединение Пш	100	99	гибель
	50		гибель
	15		62
	10		88
	5		38
6-Меркаптопурин	1		20
	10		99
	1		97

Экспериментальная биологическая часть

Острая токсичность. ЛД₅₀ соединений Па и Пб при внутрибрюшинном введении определяли по методу Першина на 80 беспородных мышках массой 25 г и ЛД₅₀ соединения Пш – по методу Кербера на мышках линии SHK.

Установлено, что ЛД₅₀ соединений Па, Пб и Пш составляет соответственно 200, 1000 и 62,5 мг/кг.

ДНК-ингибирующее действие. ДНК-ингибирующее действие изучали *in vivo* на мышках линии C₃H_А с быстрорастущей гепатомой 22 А и *in vitro* (для соединения Пш) — на культуре клеток почки зеленой мартышки CV-1, контролем служил 6-меркаптопурин. В опытах *in vivo* мышам соединение Ia вводили внутрибрюшинно однократно в дозах 80 – 100 мг/кг в воде, Пб — 100 мг/кг в 1,5 % этаноле или в суспензии 1 % крахмала и Пш — 40 мг/кг в 1 % твине-80 за 2, 4 и 6 ч (I и Пб) и за 3, 6, 9 и 24 ч (Пш) до исследования. За 30 мин до забоя мышам вводили двойную метку предшественников — ¹⁴С-тимидина и ³Н-аденозина. Для оценки избирательности действия наряду с опухолевыми клетками определяли торможение синтеза ДНК в тканях селезенки и толстой кишки.

Установлено, что через 2 ч после введения соединения Пб включение ¹⁴С-тимидина и ³Н-аденозина в ДНК клеток гепатомы подавляется на 63 % и через 6 ч — на 80 %. В такой же степени угнетается и синтез РНК, определяемый по включению ³Н-аденозина в РНК. В аналогичных условиях соединение Па через 2 ч после введения вызывает торможение синтеза ДНК от 55 % до 71 % (в зависимости от дозы). В связи с заметной токсичностью действие соединения Ia невозможно было изучать более длительное время. Через 9 и 24 ч после введения соединения Пш ингибирует включение ¹⁴С-тимидина в опухолевые клетки соответственно на 90 и 74 %, тогда как в клетках селезенки и тонкой кишки торможение синтеза ДНК в течение суток не превышает 47 %. Таким образом, при появлении медного иона в составе соединения Пш наблюдается повышение эффективности и избирательности действия.

Изучение механизма действия соединения Пш (как ингибитора синтеза ДНК) показало, что этот комплекс увеличивает число одностранных разрывов в макромолекуле ДНК и ослабляет взаимодействие ДНК-белок в ядрах клеток.

Результаты эксперимента с соединением III *in vitro* представлены в табл. 2.

Противоопухолевая активность соединения III. Исследование проводили на мышцах линии СВА, С57В1, С₃Н_А, SHK и гибридах BDF обоего пола с различными прививаемыми опухолями: рак шейки матки (РШМ-5), эпидермоидная карцинома легкого (оп. Льюис). Соединение IIIа суспензировали в 1 % крахмальном клейстере и вводили животным внутривентриально и в желудок, лечение проводили в однократном и пятидневном режиме с интервалом введения 24 ч. Опытные группы состояли из 6 – 8 мышей, контрольные — из 8 – 10 мышей. Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухолей (ТРО) на 1 и 5 дни после инокуляции опухоли и увеличению продолжительности жизни мышей (УПЖ) и выражали в процентах к не леченному контролю. Значительным считали ТРО ≥ 50 и УПЖ ≥ 25.

Установлено, что пятидневный курс лечения является оптимальным: соединение III в дозах 20 – 25 мг/кг при пятикратном введении подавляет рост опухоли РШМ-5 и опухоли Льюиса на 99 % (на следующий день после окончания курса лечения) без

гибели мышей. Выраженная противоопухолевая активность соединения III сохраняется не только при внутривентриальном введении, но и при его введении в желудок в том же режиме: в дозах до 35 мг/кг ТРО РШМ составляет 81 %.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения соединения III.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 99 – 03 – 33057).

ЛИТЕРАТУРА

1. F. A. French and E. J. Blanz, *J. Med. Chem.*, **17**(2), 172 (1974).
2. L. A. Saryan, F. Ankel, C. Kriahnanurti, et al., *J. Med. Chem.*, **22**, 1218 – 1221 (1979).
3. Г. И. Потапова, Н. О. Гудратов, Р. П. Алехина и др., *Хим-фарм. журн.*, **18**(7), 785 (1984).
4. N. G. Petering, and G. J. Van Gieesen, in: *The Biochemistry of Copper*, New York (1966), pp. 197 – 209.
5. C. G. Macarovici, M. Neamtu, and J. Grecu, *Ann. Chim.*, **7**, 365 – 372 (1972).
6. T. J. Lane, A. Gamaguchi, J. Y. Angliang, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3824 – 3826 (1959).

Поступила 08.01.02