

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-8-20-23
© Коллектив авторов, 2019

С. В. Никитин, Л. П. Коваленко*, А. Г. Ребеко, Р. В. Журиков,
Е. А. Иванова, А. Д. Дурнев

СИНТЕЗ, ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО 5-ОКСИПИРИМИДИНА

ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва
* e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru

Осуществлен синтез 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина (СНК-411) и его соли (СНК-578). В опытах на мышах-самцах C57BL/6 на модели меланомы B16 изучено противоопухолевое и антиметастатическое действие нового производного 5-оксипиримидина СНК-578. Стандартная прививочная доза составила $5 \cdot 10^6$ опухолевых клеток на мышь. СНК-578 вводили внутривентриально (в/в) в дозах 10 и 25 мг/кг в течение 2 недель со 2 по 15 дни развития меланомы B16. В качестве позитивного контроля и для выявления аддитивного эффекта от совместного однократного применения доксорубина и курсового введения СНК-578 мышам вводили доксорубин в дозе 4 мг/кг на 2-й день развития опухоли. Совместное курсовое в/в введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг и однократное в/в введение доксорубина в дозе 4 мг/кг выявило достоверное уменьшение роста опухоли, что выразилось в уменьшении объема опухоли в 2,4, 1,9 и 1,5 раза на 11, 15 и 21 дни опыта, по сравнению с группой активного контроля, не получавшей препараты СНК-578 обладает выраженной антиметастатической активностью в дозах 10 и 25 мг/кг при монотерапии и при совместном введении с доксорубином в дозе 4 мг/кг. Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) при введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг составил 75,8 %, в дозе 25 мг/кг – 92,3 %. Наиболее выраженный антиметастатический эффект был обнаружен при совместном в/в введении СНК-578 в течение 14 дней в дозе 10 мг/кг и однократном введении доксорубина в дозе 4 мг/кг. У 6 из 9 мышей на 21 день развития меланомы B16 метастазы отсутствовали, у 3 обнаружили по 1, 2 и 3 очень мелкие метастазы, подавление метастазирования — на 98,9 %.

Ключевые слова: 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин (СНК-411); хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин (СНК-578); ИИМ — индекс ингибирования метастазирования.

За последние 10 лет прирост по онкологическим заболеваниям, по данным ВОЗ, составил около 15 %. Онкологические заболевания уносят каждый год не менее 300 тыс. жизней только в России, в течение следующих 5 – 7 лет, по прогнозам ВОЗ, смертность из-за онкологических заболеваний выйдет на первое место в мире [1]. В настоящее время, кроме классических подходов (хирургии, химио- и лучевой терапии), наиболее приоритетным направлением является создание таргетных средств лечения раковых заболеваний. Однако им присуща специфическая токсичность в виде энцефалопатии (CRES) и цитокинового шторма (CRS). Побочные эффекты, как правило, бывают обратимы, но в ряде случаев могут быть жизнеугрожающими и даже приводить к смерти [2]. В связи с многообразием различных форм рака, уровнем нарушений иммунного гомеостаза, связанных с возрастными и генетическими особенностями больных, в настоящее время активно развиваются различные направления иммуноонкологии, в частности — поиск новых соединений, подавляющих активацию альтернативного пути иммунного ответа [3].

В отделе химии ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” осуществлен синтез 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина (СНК-411, патент RU 2518889 C2) и его соли (СНК-578, заявка на патент РФ 2018126602, 19.07.2018). В проведенных ранее исследованиях было показано [4, 5], что СНК-411 вызывает увеличение количества естественных киллерных клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, обладает противовоспалительными свойствами, выражено уменьшая содержание биомаркера опухолевой прогрессии ИЛ-4 [6], провоспалительного ИЛ-6, связующего звена через STAT3 между воспалением и стимуляцией метастазирования многих видов рака [7]. СНК-411 при внутривентриальном (в/в) введении в дозах 25 и 50 мг/кг или в дозе 100 мг/кг *per os* значительно ингибирует рост карциномы легкого Lewis (LLC) у мышей C57BL/6, обладает определенными цитотоксическими свойствами, в концентрации 10^{-5} М значительно увеличивает гибель клеток линии K-562, индуцированную мононуклеарами периферической крови человека [8]. Однако СНК-411 отличается незначительной растворимостью (растворение при температуре

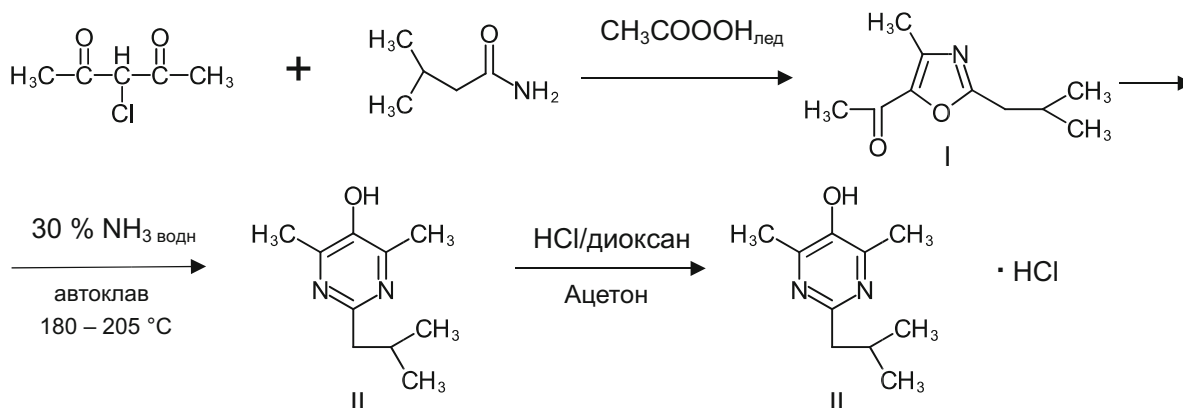


Схема синтеза СНК-578.

+ 70 °С). Для получения препарата с улучшенными технологическими характеристиками, более выраженной противоопухолевой и антимагистатической активностью было синтезировано новое соединение — хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридин (СНК-578).

Синтез СНК-578 (II) основан на том, что амид изовалериановой кислоты взаимодействует в ледяной уксусной кислоте с β-хлорацетилацетоном с образованием соответствующего оксазола (I), который без дополнительной очистки взаимодействует с избытком 30 % водного раствора аммиака в автоклаве при температуре 180 – 205 °С в течение 10 – 12 ч с образованием соединения II (схема) [9]

К раствору соединения II в ацетоне прибавляют хлористый водород в диоксане до pH 2 – 3 и получают хлоргидрат III (схема) [10]. Строение соединений II, III подтверждено спектрами ЯМР ¹H и данными элементного анализа.

Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР ¹H записаны на приборе BRUKER AM-300 с рабочей частотой 300 МГц в ДМСО (внутренний стандарт — тетраметилсилан). Температуры плавления определяли на приборе OptiMelt MPA100 и не корректировали. Результаты элементных анализов на С, Н и Cl соответствуют вычисленным значениям.

2-Изобутил-4-метил-5-ацетилоксазол (I). Смесь 15,15 г (0,15 моль) амида изовалериановой кислоты, 21,5 г (0,16 моль) 3-хлорацетилацетона и 45 мл ледяной уксусной кислоты нагревают при температуре 150 – 160 °С в течение 12 ч, охлаждают, отфильтровывают выпавший осадок, отгоняют уксусную кислоту и остаток разгоняют с дефлегматором 15 см, собирая фракцию, кипящую при температуре 115 – 120 °С/20 мм рт. ст. Выход 8 г (тех.).

2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридин (II). Смесь 11,4 г (0,063 моль) I нагревают на масляной бане с десятикратным избытком 33 % водного раствора аммиака в автоклаве при температуре 180 – 205 °С в течение 10 ч, охлаждают реакционную массу, затем выливают раствор в колбу, упаривают в вакууме водоструйного насоса и перекристаллизовывают из воды с

активированным углем. Выход 7,0 г (62 %) II. $T_{пл}$ 118 – 120 °С (из H₂O). C₁₀H₁₆N₂O₁. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 0,84 (д, 6H, J 6,6 Гц (CH₃)₂); 2,10 (м, 1H, J₁ 6,99 Гц; J₂ 6,62 Гц, CH); 2,31 (с, 6H, (CH₃)₂); 2,53 (д, 2H, J 7,0 Гц, CH₂); 8,90 (с, 1H, OH).

Хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридина (III). К 3,6 г (0,002 моль) II в 30 мл сухого ацетона прибавляют насыщенный раствор HCl в диоксане до pH 2 – 3 и нагревают до полного растворения вещества, кипятят 5 мин, охлаждают, выпавший осадок отфильтровывают, снова кипятят в сухом ацетоне, охлаждают, отфильтровывают и сушат. Получают 3,2 г (73,9 %) продукта. $T_{пл}$ 152 – 154 °С. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 0,91 (д, 6H, J 6,7 Гц, (CH₃)₂); 2,18 (м, 1H, J₁ 7,2 Гц; J₂ 6,7 Гц, CH); 2,57 (с, 6H, (CH₃)₂); 2,82 (д, 2H, J 7,2 Гц, CH₂); 10,7 (с, 1H, OH).

Экспериментальная биологическая часть

Работа выполнена на 50 мышах-самцах линии С57BL/6 массой 18 – 20 г, полученных из питомника “Столбовая”. Животных содержали в виварии ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” при 12-часовом световом режиме на стандартном сбалансированном брикетированном корме со свободным доступом к пище и воде при естественном освещении и температуре воздуха 20 – 21 °С. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях) и правилами работы с животными, утвержденными этической комиссией ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”.

В качестве экспериментальной модели злокачественного роста была использована модель меланомы В16 [6], штаммы опухолевых клеток получены из банка клеточных культур НИИ ЭДнТО РОНЦ имени Н. Н. Блохина. Взвесь опухолевых клеток меланомы В16 имплантировали мышам подкожно в область подмышечной впадины по 50 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на мышь. Стандартная прививочная доза составляла 5 · 10⁶ клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считали нулевым днем разви-

тия опухоли [5]. В качестве позитивного контроля для верификации используемой модели применяли доксорубин, который вводили однократно внутрибрюшинно (в/б) в дозе 4 мг/кг на 2-й день развития опухоли. СНК-578 вводили в/б в дозах 10 и 25 мг/кг в течение 2 недель со 2 по 15 дни развития меланомы В16. В ранее проведенных экспериментах *in vitro* на линии клеток К-562 при совместном введении СНК-411 и доксорубина был выявлен аддитивный эффект от их совместного введения [8], поэтому было изучено влияние совместного курсового введения СНК-578 и однократного в/б введения доксорубина в дозе 4 мг/кг.

Животных рандомизировали в следующие группы:

- 1) активный контроль (В16), 1 % раствор крахмала;
- 2) В16 и доксорубин в дозе 4 мг/кг;
- 3) В16 и СНК-578 в дозе 10 мг/кг;
- 4) В16 и СНК-578 в дозе 10 мг/кг + доксорубин в дозе 4 мг/кг;
- 5) В16, СНК-578 в дозе 25 мг/кг.

Противоопухолевый эффект регистрировали на 11, 15 и 21 сут развития опухоли. Расчет объема опухоли проводили после измерения 3 ее размеров по формуле:

$$V = A \cdot B \cdot C,$$

на 11, 15 а также 21 сут развития меланомы (7 сут после окончания 2-недельного введения СНК-578). Торможение роста (ТРО %) опухоли вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО \%} = [(V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}}] \cdot 100 \text{ \%}.$$

Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) определяли по формуле:

$$\text{ИИМ} = [(A_k \cdot B_k) - (A \cdot B) / A_k \cdot B_k] \cdot 100 \text{ \%},$$

где A_k и A — частота метастазирования в легких у мышей контрольной и опытной группы; B_k и B — среднее число метастазов в легких в контрольной и опытной группах. В случае большого количества метастатических узлов оценивали степень метастатического поражения по общепринятой шкале D. Tarin и J. E. Price

(1979), позволяющей дифференцировать тяжесть поражения в зависимости от количества метастазов и их размеров.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10. Результаты выражали в виде средней арифметической и ее средней ошибки, проверку данных на нормальность распределения выборок определяли по критерию Шапиро — Уилка, статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента и критерия Манна — Уитни.

Результаты и их обсуждение

На фоне в/б введения СНК-578 (10 мг/кг, в/б, 14 дней) мышам С57BL/6 достоверного снижения роста опухоли во все сроки наблюдения (11, 15 и 21 сут) не обнаружено (табл. 1). Введение доксорубина уменьшало объем опухоли во все сроки наблюдения, ТРО на 21 день составило 33 %, однако полученные различия также не были значимы по сравнению с контролем. Совместное курсовое в/б введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг и однократное в/б введение доксорубина в дозе 4 мг/кг выявило достоверное уменьшение роста опухоли, что выразилось в уменьшении объема опухоли в 2,4, 1,9 и 1,5 раза на 11, 15 и 21 дни опыта, по сравнению с группой активного контроля, не получавшей препараты. ТРО на 21 день развития меланомы В16 достигал 34 %. При введении СНК-578 в дозе 25 мг/кг объем опухоли был в 1,6 раза значимо ниже, по сравнению с контролем, на 11 день развития опухоли.

Влияние СНК-578 на процесс метастазирования в легких мышей оценивали на 21 сут после инокуляции меланомы В16 и забоя животных. После вскрытия метастазы в легких мышей изучали под лупой с 8-кратным увеличением (Magnifier Lamp 8608 E-D XB с кольцевой люминесцентной подсветкой). Частота метастазирования у животных контрольной группы составила 100 %. В контроле у мышей выявили метастазы различных размеров и сливные узлы из метастазов (табл. 2).

Таблица 1

Влияние СНК-578 при 14-дневном внутрибрюшинном введении и совместно с однократным введением доксорубина на рост меланомы В16 у мышей линии С57BL/6

Группа мышей с меланомой В16, $n \geq 9$	Рост объема опухоли меланомы В16			ТРО%, %, на 21 сут развития меланомы В16
	11 сут	15 сут	21 сут	
Контроль В16	869,7 ± 68,7	2752,5 ± 273,9	4709,4 ± 647,5	—
Доксорубин, 4 мг/кг	754,0 ± 42,6	2169,7 ± 399,5	3160,8 ± 647,6	33
СНК-578, 10 мг/кг	716,1 ± 167,8	2281,2 ± 126,1	4675,5 ± 775,0	—
СНК-578, 10 мг/кг + доксорубин 4 мг/кг	315,2 ± 95,5*	1206,1 ± 162,6*#@\$	3113,4 ± 274,7*	34
СНК-578, 25 мг/кг	549,0 ± 113,6*	2082,9 ± 304,8	3265,3 ± 325,2	31

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Манна — Уитни;

$p < 0,05$ по сравнению с группой “Доксорубин, 4 мг/кг”, критерий Манна — Уитни;

@ $p < 0,05$ по сравнению с группой “СНК-578, 10 мг/кг”, критерий Манна — Уитни;

\$ $p = 0,054$ по сравнению с группой “СНК-578, 25 мг/кг”, критерий Манна — Уитни.

Показатели метастазирования меланомы В16 при курсовом введении соединения СНК-578 и совместно с однократным введением доксорубина

Группа мышей с меланомой В16, $n \geq 9$	Среднее число метастазов ($M \pm m$)	Степень поражения легких метастазами, %					ИИМ, %, на 21 сут развития меланомы В16	
		LCP		HCP				
		0	1	2	3	4		5
Контроль В16	18,1 ± 3,1	-	14,3	50	-	35,7	-	-
Доксорубин 4 мг/кг	3,6 ± 0,8*	14,3	71,5	7,1	-	7,1	-	83,0
СНК-578, 10 мг/кг	5,0 ± 1,5*	12,5	75,0	12,5	-	-	-	75,8
СНК-578, 10 мг/кг + доксорубин 4 мг/кг	0,6 ± 0,3*	66,7	33,3	-	-	-	-	98,9
СНК-578, 25 мг/кг	1,8 ± 0,7*	22,2	77,8	-	-	-	-	92,3

Примечание: $n \geq 9$ — количество животных в группах на 7 день после окончания введения препаратов;

* $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой по непарному t -критерию Стьюдента и угловому преобразованию Фишера.

Согласно полученным данным, новое производное 5-оксипиримидина — СНК-578 — обладает выраженной антиметастатической активностью в дозах 10 и 25 мг/кг при монотерапии и при совместном применении с доксорубином в дозе 4 мг/кг (табл. 2). ИИМ при введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг составил 75,8 %, в дозе 25 мг/кг — 92,3 %. При введении СНК-578 в дозе 25 мг/кг и при совместном введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг с доксорубином метастазы в легких были выявлены только 1 степени LCP или отсутствовали. Максимальный антиметастатический эффект был обнаружен при совместном в/б введении СНК-578 в течение 14 дней в дозе 10 мг/кг и однократном введении доксорубина в дозе 4 мг/кг. У 6 из 9 мышей метастазы отсутствовали, у 3 обнаружили по 1, 2 и 3 очень мелкие метастазы, подавление метастазирования — на 98,9 %.

Таким образом, новое производное 5-оксипиримидина СНК-578 при совместном введении с доксорубином значительно подавляет рост опухоли на 11, 15 и 21 сут ее развития, обладает выраженным антиметастатическим действием при курсовом введении в до-

зах 10 и 25 мг/кг отдельно и в сочетании с доксорубином.

Работа выполнена в рамках Госзадания по теме № 0521-2019-0004.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. П. Голивец, Б. С. Коваленко, *Мед. и фармац.*, **1**(4(6)), 79 – 86 (2015).
2. В. А. Чубенко, *Практ. онкол.*, **11**(3), 192 – 202 (2010).
3. J. Colgan, M. Asmal, M. Neagu, *Immunity*, **21**, 189 – 201 (2004).
4. О. С. Кузнецова, А. В. Таллерова, С. В. Никитин, Л. П. Коваленко, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **78**(4), 6 – 9 (2015).
5. О. С. Кузнецова, А. В. Таллерова, С. В. Никитин, Л. П. Коваленко, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **160**(10), 488 – 491 (2015).
6. Hao-Wei Wang, J. A. Joyce, *Cell Cycle*, **9**, 4824 – 4835 (2010).
7. K. Taniguchi, M. Karin, *Seminars Immunol.*, **26**, 54 – 74 (2014).
8. О. С. Кузнецова, А. В. Таллерова, А. А. Соколовская, *Вестник ВГУ. Сер.: Хим. Биол. Фармац.*, **1**, 142 – 146 (2015).
9. A. Dornow, H. Hell, *Chem. Ber.*, **93**, 1998 – 2001 (1960).
10. Заявка на патент РФ 2018126602, 19.07.2018 (2018).

Поступила 14.02.19

SYNTHESIS, ANTITUMOR AND ANTIMETASTATIC ACTIVITY OF 5-OXYPYRIMIDINE DERIVATIVES

S. V. Nikitin, L. P. Kovalenko, A. G. Rebeko, R. V. Zhurikov, E. A. Ivanova*, and A. D. Durnev

V. V. Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

* e-mail: iwanowaea@yandex.ru

New 5-oxypyrimidine derivatives 2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-oxypyrimidine (compound SNK-411) and its salt (SNK-578) have been synthesized and their antitumor and antimetastatic effects were evaluated on transferred B16 melanoma model in male C57Bl/6 mice. The standard vaccine dose was $5 \cdot 10^6$ tumor cells per mouse. SNK-578 at doses of 10 and 25 mg/kg was administered intraperitoneally for two weeks, on days 2 to 15 of B16 melanoma development. Doxorubicin at a dose of 4 mg/kg was injected intraperitoneally development as a positive control on day 2 of B16 melanoma induction and to evaluate the additive effect of its combination with a course of SNK-578 at a dose of 10 mg/kg. Combined intraperitoneal administration of the course of SNK-578 at a dose of 10 mg/kg and a single dose of 4 mg/kg of doxorubicin significantly reduced tumor growth, which resulted in a decrease in the tumor volume by a factor of 2.4, 1.9 and 1.5 on days 11, 15, and 21 respectively, as compared to the control group that did not receive drugs. SNK-578 has a pronounced antimetastatic effect at both doses of 10 and 25 mg/kg as monotherapy and in combination with doxorubicin at a dose of 4 mg/kg. The metastasis inhibition index with SNK-578 was 75.8% at a dose of 10 mg/kg and 92.3% at a dose of 25 mg/kg. The most pronounced antimetastatic effect was observed for the combined intraperitoneal administration of SNK-578 at a dose of 10 mg/kg (as a 14-days course) and doxorubicin at a dose of 4 mg/kg (single dose). In this case, 6 out of 9 mice did not have metastases on day 21 of B16 melanoma development and the remaining 3 mice had 1, 2 and 3 very small metastases, so that the degree of metastasis suppression was 98.9 %.

Keywords: 2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-oxypyrimidine; SNK-411); 2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-oxypyrimidine hydrochloride; (SNK-578); metastasis inhibition index.