



УДК 547.785.5+547.431.4

© 2010

Ю. І. Губський, О. В. Вельчинська, Е. О. Коваленко,
Н. І. Шарикіна, академік НАН України В. С. Підгорський

Оригінальні антиметаболіти пуринового обміну — похідні імідазолу та бензімідазолу, їх молекулярні комплекси з бактерійними лектинами

*Описано новий препаративний метод отримання гетероциклічних біспохідних імідазолу та бензімідазолу з фторотаном при каталізі 18-краун-6-комплексом. Виявлено високий протипухлинний ефект молекулярного комплексу біспохідного бензімідазолу з позаклітинним лектином сапрофітного штаму бактерій роду *Bacillus* (*B. poyutuxa* 102 KDU): гальмування росту пухлини лімфосаркоми Пліса сягало 82,01%.*

Одним з перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби є створення нових антиметаболітів пуринового обміну, здатних впливати на структуру й функції нуклеїнових кислот та малих активних молекул [1]. Дослідження у цьому напрямку є надзвичайно актуальними, що підтверджується численними роботами [2, 3]. Останнім часом значно підвищився інтерес дослідників до синтезу нових похідних бензімідазолу та імідазолу і вивчення їх біологічної активності [4]. Так, показано, що при введенні в положення 1 молекули бензімідазолу замісників ароматичної або аліфатичної будови можна отримати сполуки широкого спектра біологічної дії [5].

Введення галоген(фтор)вмісних фармакофорів у гетероциклічну молекулу сприяє підвищенню розчинності сполук у ліпідах, внаслідок чого зростає ефективність лікарських засобів, оскільки полегшується їх транспорт в організмі [6]. Інтерес до фторвмісних фрагментів у нових молекулах викликаний також підсиленням антиметаболітних властивостей цих сполук.

Описано метод введення до аліфатичного ланцюга або ароматичного кільця фармакофорної групи $-\text{CF}_2\text{CHBrCl}$ при використанні доступного реагенту та лікарського засобу фторотану з метою синтезу біологічно активних сполук з поліфторалкоксигрупами [7, 8]. Взаємодія фторотану з основою супроводжується елімінуванням фтористого водню та генеруванням проміжного продукту 2-бром-1,1-дифтор-2-хлоретилену, який безпосередньо реагує з молекулами спиртів при каталізі основою. Дана реакція дає можливість визначити нову стратегію для синтезу селективно поліфункціональних молекул, хімічна будова яких дозволяє введення в молекулу нових фармакофорних фрагментів.

Раніше було встановлено, що позаклітинні лектини сапрофітних бактерій з унікальною специфічністю до сіалових кислот здатні розпізнавати тонкі відмінності в їх структурі та здійснювати селективну протипухлинну дію [9, 10]. Розроблено основи для конструювання на базі бактерійних лектинів ефективних лікарських засобів з принципово новим механізмом дії.

Мета проведеного нами дослідження полягала в означенні преформованих пуринів, їх синтезі, вивченні хімічних і фізико-хімічних характеристик, створенні молекулярних комплексів синтезованих сполук з бактерійними лектинами та аналізі їх біологічних властивостей, а саме гострої токсичності та протипухлинної дії.

Об'єктами дослідження були нові гетероциклічні біспохідні, синтезовані на основі бензімідазолу або імідазолу та фторотану; бактерійний лектин сапрофітного штаму *Bacillus poytuxa* 102 KDU (далі лектин **102**) з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України і молекулярний комплекс синтезованої сполуки на основі бензімідазолу з бактерійним лектином.

Абсолютні розчинники одержували таким способом: ацетонітрил переганяли над P_2O_5 , діетиловий ефір — над металевим натрієм, диметилформамід та бензол — у вакуумі. Індивідуальність синтезованих сполук контролювали методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol-254 у системі ацетонітрил-гексан 2 : 1. ІЧ-спектри записували на спектрофотометрі UR-20 ("Charles Ceise Hena", Німеччина).

Газорідинну хроматографію (ГРХ) проводили на газорідинному хроматографі "Perkin Elmer" з УФ-детектором ("Perkin", Німеччина). Спектри 1H ЯМР записували на приладах "Bruker WP-200" ("Bruker", Швейцарія), "Varian T-60" ("Varian", США) з робочою частотою 200–132 МГц у DMSO- d_6 з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту.

$N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(імідазол) (**I**). Приготування розчину № 1. 0,47 г гідроксиду калію (0,008 моль) та 0,047 г дибензо-18-краун-6-ефіру, 40 мл сухого бензолу перемішували при 60 °С близько 15 хв до утворення на стінках хімічного реактора білого полімерного нальоту, тобто утворення калієвого комплексу з дибензо-18-краун-6-ефіром. Отриманий розчин охолоджували до кімнатної температури, додавали до нього краплями розчин 1,57 г (0,008 моль) фторотану в 30 мл діетилового ефіру. Приготування розчину № 2. 0,76 г (0,016 моль) імідазолу розчиняли в 20 мл сухого бензолу при 60 °С в окремому хімічному посуді. Гарячий розчин № 2 додавали краплями через ділильну лійку до розчину № 1, перемішували при 80–90 °С протягом 18 год, фільтрували в гарячому стані, охолоджували, відганяли простою перегонкою розчинники. Залишок — осад промивали 10 мл холодної води, 10 мл гарячого ацетонітрилу та сушили у вакуумі водоструминного насосу. Кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 1,06 г (35%). Т. пл. 107–110 °С. Знайдено, %: С 34,99; Н 2,57; N 20,39. $C_8H_6BrClN_4$. Обчислено, %: С 35,1; Н 2,29; N 20,48. ІЧ-спектр (KBr), cm^{-1} : 550–690 (C–C1, C–Br), 3065–3080 (Heterocycl.). 1H ЯМР: 7,298; 7,750 (4H, м., 4CH); 8,957 (2H, д., 2CH).

Аналогічно синтезували сполуку $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (**II**) із фторотану (0,003 моль) та бензімідазолу (0,006 моль) при перемішуванні та нагріванні реакційної суміші протягом 11 год при 80–90 °С. Залишок — осад кип'ятили з 30 мл ацетонітрилу, фільтрували, промивали водою, ацетонітрилом, ефіром, потім сушили у вакуумі водоструминного насосу. Синтезована сполука — кристалічний порошок кремового забарвлення, нестійкий до дії гарячого органічного розчинника; при перекристалізації розкладається до вихідного бензімідазолу. Вихід 0,6 г (53%). Т. пл. 222–225 °С. Знайдено, %: С 51,5; Н 3,0; N 14,65. $C_{16}H_{10}BrClN_4$. Обчислено, %: С 51,43; Н 2,7; N 14,9. ІЧ-спектр (KBr),

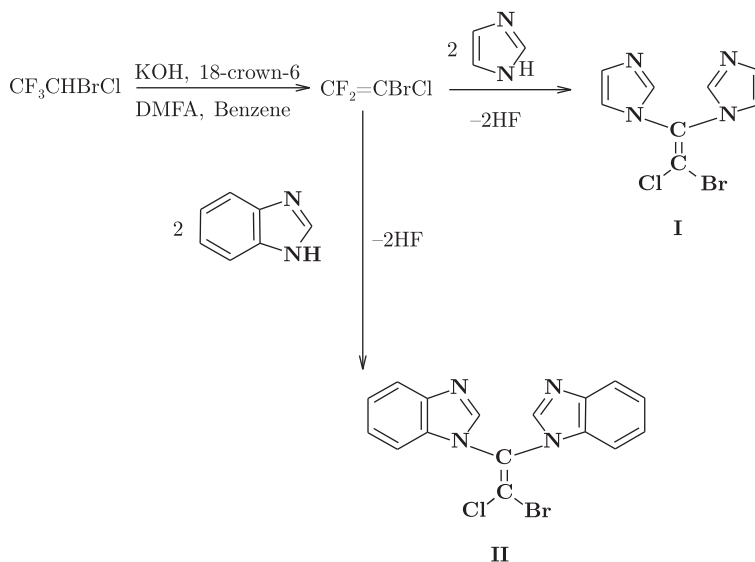


Схема 1. Біспохідні імідазолу та бензімідазолу

cm^{-1} : 550–850 (C–Cl, C–Br), 650–900 (Ph), 1450 (*cis*-C=C–), 1600–1680 (*trans*-C=C–), 3000–3100 (Ph). ^1H ЯМР: 7,301–8,96 (10H, м., 2Ph, 2 Heterocycles, –N=CH–).

Культивування бактерій проводили на модифікованому середовищі Гаузе, лектин одержували з культуральної рідини як описано раніше [10].

Молекулярний комплекс біспохідного бензімідазолу з бактерійним лектином **102** отримували механічним перемішуванням двох компонентів у фізіологічному розчині в співвідношенні 1 : 1.

Для визначення середньотоксичної дози (LD_{50}) синтезованої сполуки, бактерійного лектину та молекулярного комплексу використовували експрес-метод В.Б. Прозоровського [11]. Дослідження проводили на білих нелінійних мишах-самцях масою ($22,0 \pm 2,0$) г; шлях введення — підшкірний.

Вивчення протипухлинної активності здійснювали згідно з рекомендаціями Фармакологічного центру МОЗ України на моделях експериментального пухлинного росту. Препарати вводили в дозах, які відповідали $1/4$ – $1/6$ LD_{50} . Одержані результати оброблено статистично [12].

За новим розробленим нами методом синтезу взаємодією фторотану як фторвмісного синтону та імідазолу або бензімідазолу в молярному співвідношенні 1 : 2 у системі розчинників (бензол — диметилформамід — діетиловий ефір) в умовах міжфазового каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром у лужному середовищі синтезовано нові біспохідні з фармакофорною групою =C=CBrCl (**I**, **II**) (схема 1).

В ІЧ-спектрах сполук **I**, **II** ідентифіковано сигнали зв'язків C–Cl, C–Br при 550–850 cm^{-1} , інтенсивні сигнали *cis*- і *trans*-C=C– груп при 1450–1680 cm^{-1} , сигнали гетероциклічних фрагментів при 3065–3080 cm^{-1} . Співвідношення інтегральних інтенсивностей сигналів у ^1H ЯМР-спектрах сполук **I**, **II** підтверджує відсутність протона при атомі $\text{N}_{(1)}$, а також наявність протонів ароматичних та гетероциклічних фрагментів при 7,301–8,96 м. д.

5-фторурацил, який має здатність у процесі метаболізму утворювати інтермедіати, що включаються до структури ДНК, РНК, гальмують активність тимідилатсинтетази, яка

забезпечує синтез ДНК та РНК його попередниками, знаходиться в центрі уваги пошуку нових сполук із зазначеною спрямованістю дії [13]. Для подальших досліджень біологічних властивостей відібрано біспохідне бензимидазолу сполуку **II**, як найбільш близьку за хімічною будовою до пурина, та її молекулярний комплекс з лектином **102**. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук у літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил.

Практичний інтерес до потенційних лікарських засобів зумовлений їх постійною дією на макроорганізм. Дослідження глибоких перетворень чутливих клітин під впливом цих речовин є важливим аспектом фармакології. Визначення одного з головних фармакологічних індексів гетероциклічних біспохідних — гострої токсичності показало, що сполука **II** та її молекулярний комплекс з лектином **102** належить до малотоксичних: ЛД₅₀ їх дорівнює 282 та 235 мг/кг відповідно (табл. 1). Препарат порівняння також належить до малотоксичних сполук і має середньотоксичну дозу 375 мг/кг. Токсичність сполуки **II** та її молекулярного комплексу з лектином **102** перевищує токсичність 5-фторурацилу в 0,75 та 0,62 раза відповідно. При введенні вищевказаних хімічних речовин у дослідних тварин спостерігалися тонічні та клоніко-тонічні судоми впродовж 1–2 год, блювота і після 3–5 год — тремор.

Препарат бактерійного лектину **102** виявляв токсичні властивості, аналогічні таким сполуки **II** та її молекулярного комплексу з лектином **102**; за показниками середньотоксичних доз він належить до малотоксичних (див. табл. 1). При вивченні клінічної картини впливу лектину в токсичних дозах на організм тварин відзначено появу тонічних і клонічних судом та парез задніх кінцівок.

Встановлено деяку закономірність у виявленні токсичних властивостей для лектину **102**, сполуки **II** та їх молекулярного комплексу. Так, при з'єднанні малотоксичних речовин (сполука **II** та лектин **102**) загальна токсичність їх молекулярного комплексу дещо (у 0,88 раза) зростала.

Протипухлинну активність біспохідного **II**, лектину **102** та їх молекулярного комплексу оцінювали за відсотком гальмування росту пухлини на лімфосаркомі Пліса. За контроль використовували, як і в дослідях токсичності, 5-фторурацил, який виявляє активність при іноперабельній та рецидивній пухлині шлунка, товстої та прямої кишки, пухлин молочної та підшлункової залоз, яєчників [13]. Під час вивчення протипухлинної активності значний інтерес становило похідне загального анестетика фторотану та бензимидазолу (**II**). Згідно із зауваженнями клініцистів, фторотан є найзручнішим лікарським засобом, який дає позитивні результати при операційних втручаннях у онкологічних хворих [14]. Саме молекулярний комплекс сполуки **II** з лектином **102** та лектин **102** було вивчено в онкофармакологічних експериментах. Для вказаного молекулярного комплексу відмічено значну протипухлинну дію відносно ліфосаркоми Пліса (82,01%).

За даними вивчення протипухлинної активності бактерійних лектинів щодо пухлин різного генезу, виражена здатність гальмування росту експериментальних пухлин притаман-

Таблиця 1. Параметри гострої токсичності гетероциклічного біспохідного **II**, бактерійного лектину **102** та їх молекулярного комплексу

Препарат	ЛД ₅₀ , мг/кг
Сполука II	282
Лектин 102	248
Сполука II + лектин 102	235
5-фторурацил (контроль)	375

Таблиця 2. Протипухлинна активність відносно лімфосаркоми Пліса бактерійного лектину **102**, його молекулярного комплексу з гетероциклічним біспохідним **II**

Препарат	Доза, мг/кг	Середня маса пухлини, г		Гальмування росту пухлини, %
		Контроль	Дослід	
Лектин 102	20,0	42,0 ± 2,77	21,0 ± 0,18	50,0
Сполука II + лектин 102	35,0	13,9 ± 1,93	2,5 ± 1,3	82,01
5-фторурацил (контроль)	—	—	—	55,0*

* За даними [11].

на лектину **102** на лімфосаркомі Пліса — 50,0%, що дорівнювало критерію значущості (табл. 2). Для молекулярного комплексу сполуки **II** з лектином **102** відмічено стабільну та виражену протипухлинну активність і високий відсоток первинного вилікування тварин: гальмування росту вказаного типу пухлини становило 82,01% і перевищувало протипухлинну активність 5-фторурацилу в 1,49 раза для лімфосаркоми Пліса (див. табл. 2).

Таким чином, висока протипухлинна активність бактерійного лектину та створеного на його основі молекулярного комплексу з гетероциклічним біспохідним дозволяє розглядати ці сполуки як потенційні лікарські протипухлинні засоби і відкриває нові перспективи для подальших досліджень у цьому напрямку онкофармакології.

1. Преображенская М. Н. Поиски противоопухолевых препаратов среди компонентов нуклеиновых кислот // Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. М. Менделеева. — 1973. — № 6. — С. 643–656.
2. Noordhuis P., Holwerda U. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthetase inhibition human colorectal cancer // Ann. oncol. — 2004. — **15**. — P. 1025–1032.
3. Adjei A. A review of pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer // Clin. Pharmacol. — 1999. — **48**. — P. 265–277.
4. Orjales A., Mosquera R., Labeage L., Rodes R. New 2-piperazinylbenzimidazole derivatives as 5-HT3 antagonists. Synthesis and pharmacological evaluation // J. Med. Chem. — 1997. — **40**, No 4. — P. 586–593.
5. Мнджоян А. Л., Тер-Захарян Ю. З. Биологические свойства химических соединений. — Ереван: Изд-во АН АрмССР, 1962. — Вып. 1. — 246 с.
6. Ягупольский Л. М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями. — Киев: Наук. думка, 1988. — С. 90–105.
7. Герус И. И., Колычева М. Т., Ягупольский Ю. Л., Кухарь В. П. 1-Алкокси(арилокси)-1,1-дифтор-2-хлор-2-бромэтаны // Журн. орган. химии. — 1989. — **25**, вып. 9. — С. 2020. — 2021.
8. Вельчинская Е. В., Кузьменко И. Й., Ильченко А. Я. Гетероциклические соединения с фармакофорной галогенозамещенной группой I. 2-бром-1,1-дифтор-2-хлорэтирование гетероциклических соединений с двумя гетероатомами // Химия гетероцикл. соединений. — 1997. — № 7 (361). — С. 967–971.
9. Коваленко Э. А. Внеклеточные лектины бактерий // Микробиол. журн. — 1990. — **52**, № 3. — С. 92–99.
10. Подгорский В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А. Лектины бактерий. — Киев: Наук. думка, 1992. — 203 с.
11. Прозоровский В. Б., Прозоровский В. П., Демченко В. М. Экспресс-метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки // Фармакология та токсикология. — 1978. — **41**, № 4. — С. 407–509.
12. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США Под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина, А. Голдина, А. Кляйна. — Москва: Медицина, 1979. — 296 с.
13. Longey D. B., Harkin D. P., Jonson P. G. 5-fluorouracil – mechanisms of action and clinical strategies // Nature Rev. Cancer. — 2003. — **3**. — P. 330–338.
14. Brody G. L., Sweet R. B. Halothane anesthesia as a possible cause of massive hepatic necrosis // Anesthesiology. — 1963. — **24**. — P. 29–37.

Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ

Надійшло до редакції 15.10.2009

Yu. I. Gubskiy, O. V. Welchynska, E. O. Kovalenko, N. I. Sharykina,
Academician of the NAS of Ukraine **V. S. Pidgorskyy**

**Original antimetabolites of purine exchange — derivatives of imidazole
and benzimidazole, their molecular complexes with bacterial lectins**

*A new convenient method for the preparation of heterocyclic bis-derivatives of imidazole and benzimidazole with ftorotan with 18-crown-6-complex as catalyst is described. A strong antitumor effect of the molecular complex of bis-derivative of benzimidazole with saprophytic strains Bacillus genus (*B. polymyxa* 102 KDU) extracellular lectins has been discovered: the growth decrease of the lymphosarcoma Pliss tumor mass was 82.01%.*