

УДК 577.181.7:542.913:616-006:577.164.1

В. А. Бачериков

Кафедра общей и клинической фармакологии,
ОМИ Международного гуманитарного университета,
Фонтанская дорога, 23А, г. Одесса, 65049, Украина
E-mail: valeriy_bacherikov@yahoo.com

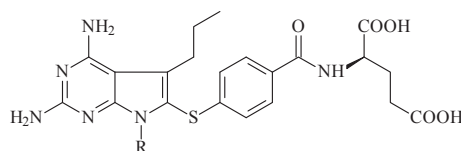
**АНТИФОЛАТЫ ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ХИМИОТЕРАПИИ.
ЧАСТЬ II.**

В обзоре рассмотрены структуры основных противораковых антифолатов, их внутриклеточные ферментные цели, механизмы их противоопухолевого действия. Подробно обсуждены фолатные антиметаболиты, полученные в последнее десятилетие и тенденции в поиске высокоэффективных ингибиторов метаболических путей фолиевой кислоты. Рассмотрены достоинства и ограничения антифолатов, которые могут быть использованы в дизайне новых препаратов противоопухолевой химиотерапии.

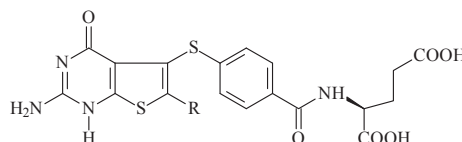
Ключевые слова: антифолаты, антиметаболиты, противораковая химиотерапия.

В первой части этого обзора [1] мы рассматривали перспективную стратегию дизайна и синтеза классических и неклассических антифолатов, разработанную группой А. Gangjee. Эта стратегия заключается в том, что одновременно исследуется группа соединений, имеющая одинаковый птеридиновый фрагмент или его аналог к которому присоединяется заместитель несущий остаток глутаминовой кислоты, т. е. классические антифолаты, и группа соединений не имеющая в своем составе глутаминового остатка, т.е. неклассические антифолаты. Предполагается, что неклассические антифолаты, являясь более липофильными соединениями, легче проникают в клетки посредством простой диффузии и не требуют особых транспортных систем.

В первой части данного обзора были также рассмотрены классические аналоги N-[4-[(2,4-диамино-5-пропил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-ил)сульфанил]бензоил]-L-глутаминовой кислоты (**22**, Рис. 1) и N-[4-[(2-амино-6-метил-4-оксо-3,4-дигидроптериено[2,3-d]пиримидин-5-ил)сульфанил]бензоил]-L-глутаминовой кислоты (**23а**, Рис. 1).



22: N-[4-[(2,4-Диамино-5-пропил-7Н-пирроло [2,3-d]пиримидин-6-ил)сульфанил]бензоил]-L-глутаминовая кислота



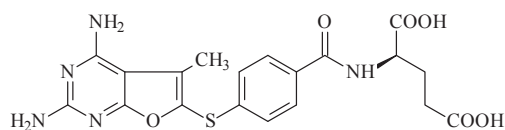
23а: N-[4-[(2-Амино-6-метил-4-оксо-3,4-дигидроптериено [2,3-d]пиримидин-5-ил)сульфанил]бензоил]-L-глутаминовая кислота; R = CH₃
23b: R = C₂H₅.

Рис. 1. Активные антиметаболиты, полученные подбором заместителей у C5 и C6.

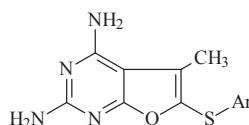
Наиболее активными неклассическими антифолатами группы этил-замещенных аналогов **22** и **23** оказались соединения с электроноакцепторными заместителями в бензольном ядре – 4-нитрофенил аналог ($IC_{50}=0.26 \mu M$) и 4-бромфенил-производное ($IC_{50}=0.26 \mu M$). Изучение взаимоотношений структура-свойство для группы этих неклассических антифолатов выявило предпочтительность электроноакцепторного заместителя в пара-положении бензольного ядра для эффективного ингибирования человеческого ДГФР [2].

Дальнейшая стратегия в синтезе фолатных антиметаболитов была нацелена на поиск соединений обладающих высокой ингибирующей активностью одновременно против обоих ферментов, дигидрофолат редуктазы [ДГФР, ЕС:1.5.1.3] и тимидилат синтазы [ТС, ЕС:1.5.1.3 2.1.1.45].

Поиск соединений обладающих двойственной ингибирующей активностью против ТС–ДГФР среди 2,4-диамино-фуро[2,3-d]пиримидинов привел к синтезу N-[4-[(2,4-диамино-5-метил-фуро[2,3-d]пиримидин-6-ил)тио]бензоил]-L-глутамовой кислоты (**24**, Рис 2) и близких неклассических аналогов [3]. Соединение **24** было первым из группы классических 2,4-диамино-фуро[2,3-d]пиримидиновых антифолатов, которые обладают двойной ТС–ДГФР ингибирующей активностью, и которая была в 1,5 раза сильнее, по сравнению с активностью клинически используемых пеметрекседа (**28**, Рис. 4) и 5 раз более эффективнее, чем таковая ралтитрекседа **18**¹ [3].



24: N-[4-[(2,4-Диамино-5-метил-фуро[2,3-d]пиримидин-6-ил)тио]бензоил]-L-глутамовая кислота



25: 2,4-Диамино-5-метил-6-(1-арилтио)-фуро[2,3-d]пиримидин; Ar = 1-Naf, 2-Naf, 2',6'-dimethylphenylsulfanyl, 4'-methoxyphenylsulfanyl, etc.

Рис. 2. Классические и неклассические антифолаты с фуро[2,3-d]пиримидин-тиоарилловым фрагментом в молекуле.

Соединения этой группы, относящиеся к неклассическим антифолатам (**25**, Рис. 2) были не активны по отношению к человеческим и *E. coli* ТС и ДГФР со значениями $IC_{50} > 2 \times 10^{-5}$ М. Однако, многие из полученных соединений **25** были активны и избирательно ингибировали ДГФР патогенных *P. carinii*, *T. gondii*, и *M. avium* [3].

В поисках эффективных фолатных антиметаболитов были синтезированы и исследованы соединения с более жесткой молекулярной структурой, чем в соединениях **23**, классические антиметаболиты, содержащие в составе молекулы трициклический бензо[4,5]тиено[2,3-d]пиримидиновый остов, соединенный с бензоил или изоиндолил глутаматным фрагментом (соединения **26**, **27**, Рис. 3) [4].

¹ Формулы 18, 28 см. в Части I [1] данного обзора.

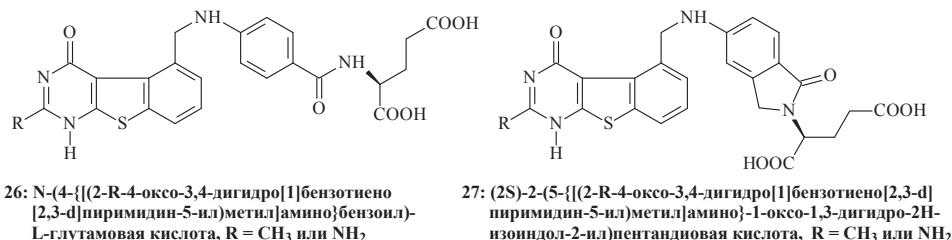


Рис. 3. Классические антифолаты с бензо[4,5]тиено[2,3-d]пиримидинамино-арилглутамовым фрагментом в молекуле.

Оказалось, что соединения с метильной группой у C2 ингибируют только фермент ТС. Замещение метильной на amino группу увеличивает эффективность ингибирования ТС ($IC_{50} = 0.26-0.8 \mu M$) и приводит к возникновению высокой ингибирующей эффективности по отношению к ДГФР ($IC_{50} = 0.09-0.1 \mu M$) [4].

Рентгенографическое исследование кристаллической структуры тройственного комплекса **26**, НАДФН и человеческого ДГФР показало, что также как и в случае других высокоактивных антифолатов, трициклические производные связываются с активным центром фермента в «фолатной» ориентации [4].

Прогресс в химиотерапии рака антиметаболитами ускорился после обнаружения новых классов антифолатов, нацеленных на α -фолатные рецепторы (α -ФР), ассоциированных с двунаправленной транспортной системой переноса циркуляторного 5-метилтетрагидрофолата [5, 6] (*reduced-folate carrier* (RFC) system, *система переноса восстановленного фолата*, СПВФ), также способной переносить антифолаты.

При раковом заболевании наблюдается сверхэкспрессия ФР и белков СПВФ клетками опухоли, что позволяет использовать высокую избирательность соответствующих препаратов для лечения заболевания [7].

Противораковые препараты и антиметаболиты такого типа чаще всего являются многоцелевыми антифолатами, ингибирующим ТС, ДГФР, ГАРФТ, ключевые фолат-зависимые ферменты метаболических путей биосинтеза пуриновых и тимидиновых нуклеотидов и транспортируются фолатными транспортными системами клеток.

После поступления в клетку, препараты данного типа должны эффективно превращается в полиглутаматные формы с помощью фермента ФПС, что увеличивает их концентрацию и $T_{1/2}$, что в свою очередь, увеличивает продолжительность их действия. Считается, что полиглутаминированные производные лучше удерживаются в клетках и поэтому являются более сильными ингибиторами целевых ферментов.

Препаратами, транспортируемыми СПВФ являются МТК **3**¹, ратлитрексед **18**, пеметрексед (**28**), плевитрексед (**29**, BGC9331) и соединения (**30**, BGC638, BGC945, см. Рис. 4) [8, 9]. Причем недавно было обнаружено, что соединение **28** ингибирует также серин гидроксиметил трансферазу (СГМТ), фермент катализирующий превращение тетрагидрофолата в N⁵,N¹⁰-метилтен-тетрагидрофолат и глицин [10].

¹ Формулу 3 см. в Части I [1] данного обзора.

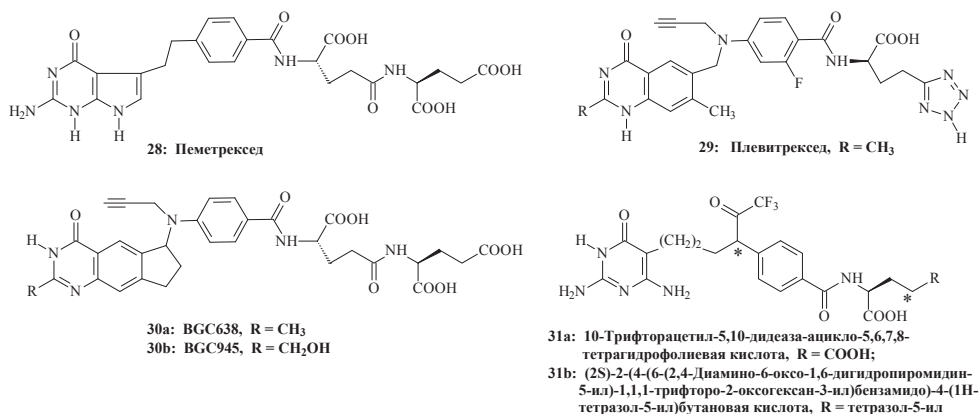


Рис. 4. Антиметаболиты активные к α -ФР и белкам СПВФ.

Соединение **31a** (Рис. 4) и его аналоги обладают высокой способностью ингибировать ГАРФТ [11, 12], один из ключевых ферментов синтеза пуринов «*de novo*», катализирующего первую стадию одноуглеродного переноса формила, где в качестве кофактора участвует формил тетрагидрофолат [13]. Отмечено, что активность этой группы соединений не зависит от уровня экспрессии полиглутамат синтазы и полиглутаминирования [12].

Асимметрический синтез изомеров другой группы классических аналогов **31** с такими заместителями у C10, как SCH₃, OCH₃ или OH и изучение их биологической активности показали [14], что оба диастереоизомера подавляют рост опухолевых клеток путем ингибирования ГАРФТ, однако из-за наличия в молекуле глутаматного фрагмента активность этих соединений коррелировала со способностью к внутриклеточному полиглутаминированию с помощью ФПГС, но не зависела от транспорта переносчиком восстановленного фолата.

Ряд классических 6-замещенных пирроло[2,3-d]пиримидиновых антифолатов с углеродным мостиком от одного до шести атомов углерода между гетероциклическим ядром и бензоил-L-глутаматным фрагментом (соединения **32**, Рис. 5) проявили низкую субстратную активность по отношению к СПВФ и соответственно низкую способность подавлять рост СПВФ экспрессирующих клеток [15, 16, 17]. Эти соединения проявили высокое сродство к связыванию с α - и β -формами ФР соответствующих ФР-экспрессирующих раковых клеток. Было обнаружено, что соединения **32**, а также их близкие аналоги с тиеноиловым заместителем в боковой цепи [18] ингибировали рост опухолевых клеток КВ, а в качестве их главной внутриклеточной мишени был идентифицирован ГАРФТ [17, 18].

Изучение активности этих соединений в ингибировании пролиферации клеток СНО и HeLa, экспрессирующих протонно-связанный фолатный переносчик (ПСФП)¹ или СПВФ показало, что только соединения **32** с углеродным мостиком с двумя, тремя и четырьмя атомами проявили существенное ингибирование пролиферации, причем соединение с мостиком в два атома углерода было в 10 раз более эффективно, чем остальные производные [17, 19].

¹ proton-coupled folate transporter (PCFT) англ.

Близкие по структуре классические 6-замещенные тиено[2,3-d]пиримидиновые антифолатовые ингибиторы (**33**, Рис. 3) исследовали на подавление роста раковых клеток KB и IGROV1, экспрессирующих ФР, а также клеток СНО, которые экспрессируют ФР, но не белки СПВФ и ПСФП [20]. Было обнаружено, что механизм противоопухолевой активности состоял в двойном ингибировании ферментов ГАРТ и, вероятно, рибонуклеотид формил трансферазы (РНФТ, ЕС 2.1.2.3.), катализирующего образование 5-формамидо-1-(5-фосфо-D-рибозил)имидазол-4-карбоксамид. Эти соединения были субстратами клеточного транспорта, регулируемого ФР, но не СПВФ и ПСФП, что указывало на отсутствии прямой зависимости между экспрессией и количеством ФР по сравнению с таковыми для ПСФП, и что резко отличало их от соединений **32** [20].

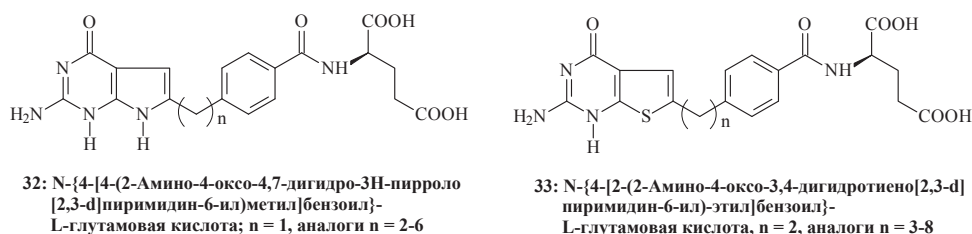


Рис. 5. Структуры активных 6-замещенных пирроло[2,3-d]пиримидинов и тиено[2,3-d]пиримидиновых антифолатов.

Из этих результатов следовало, что пирроло[2,3-d]пиримидиновый фрагмент антифолатов больше способствует ингибированию РНФТ, а введение тиофеноилового кольца в боковую цепь еще более улучшало ингибирующие свойства анти-метаболитов, а также позволило выделить из этого ряда ведущее соединение **34** (n=1, Рис.6) [18].

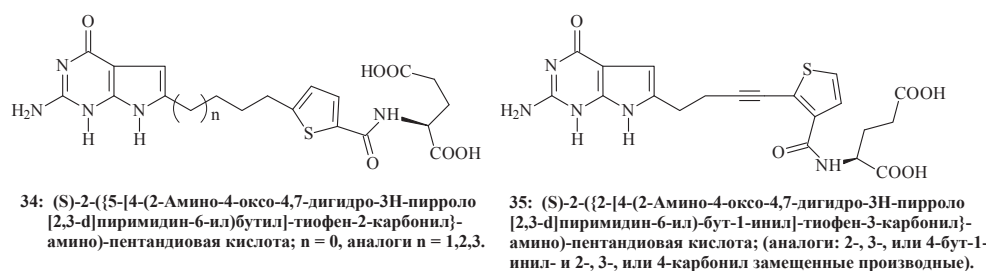


Рис. 6. Наиболее активные представители пирроло[2,3-d]пиримидин-тиофеноиламид-L-глутаминовых антифолатов.

Тем не менее, исследователи отмечают, что недостаток селективности по отношению к транспортерам фолата является главной причиной токсичности и неудач химиотерапии при клиническом использовании антифолатов. В этой

связи предпринимаются усилия по дальнейшему синтезу производных в ряду пирроло[2,3-d]пиримидин-тиеноиловых антифолатов, что иногда приводит к обнаружению еще более активных соединений. Среди этих производных, соединение **34** с цепочкой из трех метиленовых фрагментов ($n=0$, Рис. 6) оказалось наиболее активным [21].

Однако, исследованные недавно соединения с более жесткой цепочкой между 2-амино-4-оксо-4,7-дигидро-3H-пирроло[2,3-d]пиримидиновым фрагментом и тиофеноиламидо-глутаматным заместителем, а именно бут-1-иниловым заместителем при различном замещении тиофенового кольца (**35**, Рис. 6) не подавляли рост исследованных раковых клеток, хотя и ингибировали ФР экспрессирующие клетки RT16 CHO [22].

Заключение

В последнее десятилетие дизайн, синтез и исследования в области противораковой активности фолатовых антиметаболитов перешли на качественно новый уровень. Тенденции в поиске новых препаратов сфокусировались на нескольких направлениях. Это прежде всего поиск препаратов способных эффективно ингибировать как ТС так и ДГФР в наномолярных дозах и с наименьшим уровнем токсичности. Из других параметров также контролировалась возможность возникновения резистентности и мультирезистентности к используемым препаратам. Исследования ферментов из различных источников и их взаимодействия с антиметаболитами с помощью рентгеновской кристаллографии, в сочетании с молекулярным моделированием, исследованиями в области количественных взаимоотношений структура – свойство, направленный органический синтез привели к созданию сотен активных препаратов, некоторые из которых достигли рынка или проходят клинические испытания. В круг влияния на метаболизм теперь включены препараты взаимодействующие с фолатными рецепторами и системами транспорта фолата.

Большое значение в поиске новых антифолатов имеют также дальнейшие открытия в области ключевых метаболических путей фолиевой кислоты, что позволяет определить точные биологические цели воздействия и предложить новые перспективы для открытия противораковых лекарств.

Литература

1. Бачериков В.А. Антифолаты для противораковой химиотерапии. Часть I. // Вісник Одеського національного університету. Хімія. – 2013. – Vol. 18 (3). – P. 1- 20.
2. Gangjee A., Li W., Kisliuk R.L., Cody V., Pace J., Piraino J., Makin J. Design, synthesis, and X-ray crystal structure of classical and nonclassical 2-amino-4-oxo-5-substituted-6-ethylthieno[2,3-d]pyrimidines as dual thymidylate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors and as potential antitumor agents. // J. Med. Chem. – 2009. – Vol. 52 (15). – P. 4892-4902.
3. Gangjee A., Jain H.D., Phan J., Guo X., Queener S.F., Kisliuk R.L. 2,4-Diamino-5-methyl-6-substituted arylthio-furo[2,3-d]pyrimidines as novel classical and nonclassical antifolates as potential dual thymidylate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. – 2010. – Vol. 18 (2). – P. 953-961.
4. Zhang X., Zhou X., Kisliuk R.L., Piraino J., Cody V., Gangjee A. Design, synthesis, biological evaluation and X-ray crystal structure of novel classical 6,5,6-tricyclic benzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidines as dual thymidylate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. – 2011. – Vol. 19 (11). – P. 3585-3594.
5. Kamen B.A., Smith A.K. A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2004. – Vol. 56 (8). – P. 1085-1097.

6. Low P.S., Henne W.A., Doorneweerd D.D. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. // *Acc. Chem. Res.* – 2008. – Vol. 41 (1). – P. 120-129.
7. Kelemen L.E. The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? // *Int. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 119 (2). – P. 243-250.
8. Theti D.S., Jackman A.L. The role of alpha-folate receptor-mediated transport in the antitumor activity of antifolate drugs. // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10 (3). – P. 1080-1089.
9. Gibbs D.D., Theti D.S., Wood N., Green M., Raynaud F., Valenti M., Forster M.D., Mitchell F., Bavetsias V., Henderson E., Jackman A.L. BGC 945, a novel tumor-selective thymidylate synthase inhibitor targeted to alpha-folate receptor-overexpressing tumors. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65 (24). – P. 11721-11728.
10. Daidone F., Florio R., Rinaldo S., Contestabile R., di Salvo M.L., Cutruzzola F., Bossa F., Paiardini A. In silico and in vitro validation of serine hydroxymethyltransferase as a chemotherapeutic target of the antifolate drug pemetrexed. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 46 (5). – P. 1616-1621.
11. Zhang Y., Desharnais J., Marsilje T.H., Li C., Hedrick M.P., Gooljarsingh L.T., Tavassoli A., Benkovic S.J., Olson A.J., Boger D.L., Wilson I.A. Rational design, synthesis, evaluation, and crystal structure of a potent inhibitor of human GAR Tfase: 10-(trifluoroacetyl)-5,10-dideazaacyclic-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid. // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42 (20). – P. 6043-6056.
12. DeMartino J.K., Hwang I., Xu L., Wilson I.A., Boger D.L. Discovery of a potent, nonpolyglutamatable inhibitor of glycinamide ribonucleotide transformylase. // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49 (10). – P. 2998-3002.
13. Warren L., Buchanan J.M. Biosynthesis of the purines. XIX. 2-Amino-N-ribosylacetamide 5'-phosphate (glycinamide ribotide) transformylase. // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 229 (2). – P. 613-626.
14. DeMartino J.K., Hwang I., Connelly S., Wilson I.A., Boger D.L. Asymmetric synthesis of inhibitors of glycinamide ribonucleotide transformylase. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51 (17). – P. 5441-5448.
15. Gangjee A., Zeng Y., McGuire J.J., Mehraein F., Kisliuk R.L. Synthesis of classical, three-carbon-bridged 5-substituted furo[2,3-d]pyrimidine and 6-substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidine analogues as antifolates. // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47 (27). – P. 6893-6901.
16. Gangjee A., Yang J., McGuire J.J., Kisliuk R.L. Synthesis and evaluation of a classical 2,4-diamino-5-substituted-furo[2,3-d]pyrimidine and a 2-amino-4-oxo-6-substituted-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine as antifolates. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 14 (24). – P. 8590-8598.
17. Deng Y., Wang Y., Cherian C., Hou Z., Buck S.A., Matherly L.H., Gangjee A. Synthesis and discovery of high affinity folate receptor-specific glycinamide ribonucleotide formyltransferase inhibitors with antitumor activity. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51 (16). – P. 5052-5063.
18. Wang L., Cherian C., Desmoulin S.K., Polin L., Deng Y., Wu J., Hou Z., White K., Kushner J., Matherly L.H., Gangjee A. Synthesis and antitumor activity of a novel series of 6-substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidine thienoyl antifolate inhibitors of purine biosynthesis with selectivity for high affinity folate receptors and the proton-coupled folate transporter over the reduced folate carrier for cellular entry. // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53 (3). – P. 1306-1318.
19. Desmoulin S.K., Wang Y., Wu J., Stout M., Hou Z., Fulterer A., Chang M.-H., Romero M.F., Cherian C., Gangjee A., Matherly L.H. Targeting the Proton-Coupled Folate Transporter for Selective Delivery of 6-Substituted Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidine Antifolate Inhibitors of De Novo Purine Biosynthesis in the Chemotherapy of Solid Tumors. // *Molecular Pharmacology.* – 2010. – Vol. 78 (4). – P. 577-587.
20. Deng Y., Zhou X., Kugel Desmoulin S., Wu J., Cherian C., Hou Z., Matherly L.H., Gangjee A. Synthesis and biological activity of a novel series of 6-substituted thieno[2,3-d]pyrimidine antifolate inhibitors of purine biosynthesis with selectivity for high affinity folate receptors over the reduced folate carrier and proton-coupled folate transporter for cellular entry. // *J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 52 (9). – P. 2940-2951.
21. Wang L., Desmoulin S.K., Cherian C., Polin L., White K., Kushner J., Fulterer A., Chang M.H., Mitchell-Ryan S., Stout M., Romero M.F., Hou Z., Matherly L.H., Gangjee A. Synthesis, biological, and antitumor activity of a highly potent 6-substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidine thienoyl antifolate inhibitor with proton-coupled folate transporter and folate receptor selectivity over the reduced folate carrier that inhibits beta-glycinamide ribonucleotide formyltransferase. // *J. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 54 (20). – P. 7150-7164.
22. Wang L., Cherian C., Kugel Desmoulin S., Mitchell-Ryan S., Hou Z., Matherly L.H., Gangjee A. Synthesis and Biological Activity of 6-Substituted Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine Thienoyl Regioisomers as Inhibitors of de Novo Purine Biosynthesis with Selectivity for Cellular Uptake by High Affinity Folate Receptors and the Proton-Coupled Folate Transporter over the Reduced Folate Carrier. // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55 (4). – P. 1758-1770.

Стаття надійшла до редакції 18.08.13

В. А. Бачеріков

Кафедра загальної та клінічної фармакології,
ОМІ Міжнародного гуманітарного університету
Фонтанський шлях, 23А, м. Одеса, 65049, Україна
E-mail: valeriy_bacherikov@yahoo.com

**АНТИФОЛАТИ ДЛЯ ПРОТИРАКОВОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ.
ЧАСТИНА II**

Резюме

В огляді розглянуто структури основних протипухлинних антифолатів, їх внутрішньоклітинні ферментні цілі, механізми їх протипухлинної дії. Детально обговорено фолатні антиметаболіти, отримані в останнє десятиліття і тенденції в пошуку високоефективних інгібіторів метаболічних шляхів фолієвої кислоти. Розглянуто переваги і обмеження антифолатів, які можуть бути використані в дизайні нових препаратів протипухлинної хіміотерапії.

Ключові слова: антифолати, антиметаболіти, протипухлинна хіміотерапія.

V. A. Bacherikov

Department of General and Clinical Pharmacology,
OMI International Humanitarian University
Fontans'ka road, 23A, Odessa, 65049, Ukraine
E-mail: valeriy_bacherikov@yahoo.com

**ANTIFOLATES FOR ANTICANCER CHEMOTHERAPY.
PART II**

Summary

In the review the structure of the basic antifolate antagonists, their intracellular enzyme targets, and their mechanisms of antitumor activity were considered. Folate antimetabolites, which were discovered in the last decade and trends in finding powerful inhibitors of folic acid metabolic pathways, were discussed in details. The advantages and limitations of antifolates that can be used for the design of new drugs for antitumor chemotherapy were considered.

Keywords: antifolates, antimetabolites, antitumor chemotherapy.