

УДК 547.854.4.547.832.5.547.834.2.613

СИНТЕЗ 9-МЕТОКСИ-10-ЗАМЕЩЕННЫХ 5-ДЕАЗАФЛАВИНОВ, БЕНЗО[b]ПИРИМИДО[5,4-g][1,8]НАФТИРИДИН-2,4-ДИОНОВ НА ОСНОВЕ 6-АМИНОУРАЦИЛОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Мелик-Оганджян Р.Г., Овсепян Т.Р., Караханян Г.С., Израелян С.Г., Арсенян Ф.Г., Нерсисян Л.Э., Агаронян А.С.

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения, Институт тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна, Ереван, e-mail: tag.hovsepyan@mail.ru

Реакцией аннелирования 6-аминозамещенных урацилов 2,3-диметоксибензальдегидом и 2-хлор-7-метил(метокси)хинолин-3-карбальдегидами синтезированы новые 9-метокси-10-замещенные 5-деазафлавины-пиримидо[4,5-b]хинолин-2,4(3H,10H)-дионы и 9,12-замещенные бензо[b]пиримидо[5,4-g][1,8]нафтиридин-2,4-дионы. Исследованы их противоопухолевые свойства на модели саркома 180. Для сравнительной оценки биологической активности изучено также воздействие названных гетероциклических систем на уровень метилирования опухолевой ДНК в условиях *in vitro* на модели саркома 180. Согласно полученным данным большинство изученных веществ вызывает заметное ингибирование уровня метилирования опухолевой ДНК. Установлена некоторая корреляция между *in vitro* и *in vivo* данными.

Ключевые слова: 6-аминоурацил, аннелирование, 5-деазафлавин, 1,8-нафтиридин, опухолевая ДНК, саркома 180

SYNTHESIS OF 9-METHOXY-10-SUBSTITUTED 5-DEAZAFLAVINS, BENZO [B] PYRIMIDO[5,4-G][1,8]NAPHTHYRIDINE-2,4-DIONES ON THE BASIC OF 6-AMINOURACILS AND STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES

Melik-Ohanjanyan R.G., Hovsepyan T.R., Karakhanyan G.S., Israyelyan S.G., Arsenyan F.G., Nersesyan L.E., Aharonyan A.S.

The Scientific and Technological Centre of Organic and Pharmaceutical Chemistry NAS RA A.L. Mnjoyan Institute of Fine Organic Chemistry, Yerevan, e-mail: tag.hovsepyan@mail.ru

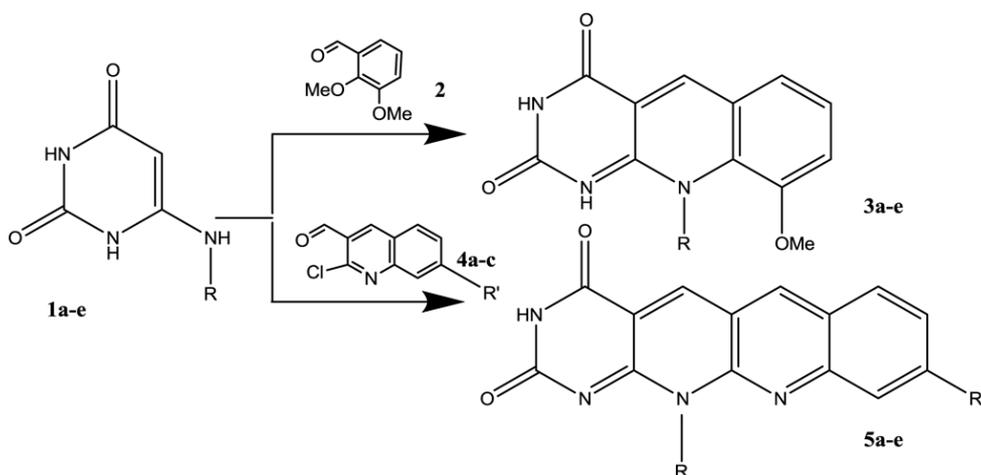
By annulation reaction of 6-aminouracils with 2,3-dimethoxybenzaldehyde and 2-chloro-7-methyl(methoxy)quinoline-3-carbaldehydes the new 9-methoxy-10-substituted 5-deazaflavins-pyrimido[4,5-b]quinolin-2,4(3H,10H)-diones and 9,12-substituted benzo[b]pyrimido[5,4-g][1,8]naphthyridin-2,4-diones were synthesized. Their antitumor properties on sarcoma 180 model were studied. For the comparative evaluation of biological activity also studied the impact of these heterocyclic systems on the level of methylation of tumor DNA *in vitro* conditions on sarcoma 180 model. According to obtained dates the most of the studied substances causes a marked inhibition of methylation level of tumor DNA. Some correlation between *in vitro* and *in vivo* dates determined.

Keywords: 6-aminouracil, annulation, 5-deazaflavin, 1,8-naphthyridine, tumor DNA, sarcoma 180

Возрастающий интерес к созданию новых производных 5-деазафлавина-пиримидо [4,5-b]хинолин-2,4(3H,10H)диона обусловлен тем, что они признаны как новый класс таргетно действующих противоопухолевых агентов, обладающих широким спектром ингибирующей активности в отношении ряда опухолевых штаммов [4, 6]. Продолжая ранее начатые исследования по изысканию новых эффективных противоопухолевых средств среди производных 5-деазафлавина и бензо[b]пиримидо[5,4-g][1,8] нафтиридина[1,2] в настоящей работе осуществлен синтез ряда новых производных названных гетероциклических систем, изучены их противоопухолевые свойства и воздействие на уровень метилирования опухолевой ДНК. Синтез проведен по схеме (рисунок).

С целью уточнения роли заместителя в положении 10 на биологическую активность

9-метокси-5-деазафлавина в качестве исходных соединений были выбраны различные 6-алкил-, фенил-, бензиламинозамещенные урацилы 1a-e, полученные обработкой 6-хлорурацила соответствующими алкил- или ариламинами [1,4,6]. Циклоконденсация последних с 2,3-диметоксибензальдегидом по разработанному нами методу привела к намеченным 5-деазафлавином 3a-e [1,2]. Реакцией аннелирования тех же 6-аминозамещенных урацилов 1a-e 2-хлор-7-метил(или метокси)хинолин-3-карбальдегидами, синтезированными методом Вильсмейера [8], получены 12-или 9,12-замещенные бензо[b]пиримидо[5,4-g][1,8]нафтиридин-2,4-дионы 5a-e. Последние представляют интерес в качестве структурной основы многих биологически активных соединений [6,7]. Гетероциклизация протекает при кипячении 6-аминозамещенных урацилов 1a-e с альдегидами 4a-c в ДМФА в течение 8-10 ч.



1,3a-e, R=Me(a), (CH₂)₃OH(b), Ph(c), C₆H₅-2-OH-5-CH₃(d), Bn(e).

4a-c, R=H(a), R'=CH₃(b), R'=OCH₃(c).

5a-e, R=(CH₂)₃OH, R'=H(a); R=Bn, R'=H(b); R=Me, R'=9-Me(c);
R=(CH₂)₃OH, R'=9-Me(d); R=Ph, R'=9-OMe (e)

Чистота и строение синтезированных соединений подтверждены методами ТСХ, ЯМР¹H и элементным анализом.

Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР ¹H регистрировали на спектрометре Varian Mercury-300VX с рабочей частотой 300 МГц, внутренний стандарт – ТМС. Температуры плавления определяли на микронагревательном столике «Voetius 72/2064». Ход реакций контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системах хлороформ–этанол, 4:1 или диоксан–бензол, 3:1, проявление УФ облучением.

9-Метокси-10-замещенные 5-дезафлавины 3a-e описаны нами в работе [2].

Тетрагидробензо[b]пиримидо[5,4-g][1,8]нафтиридин-2,4-дионы (5a-e). Общая методика. Смесь 1 ммоль соответствующего урацила 1a-e, 1 ммоль 2-хлорхинолин-3-или 2-хлор-7-метил(метокси)хинолин-3-карбальдегида 4 в 20 мл ДМФА кипятят 8-10 ч. Конец реакции контролируют методом ТСХ. Отгоняют растворитель, твердый остаток дважды промывают метанолом, затем диэтиловым эфиром и сушат на воздухе.

12-(3-Гидроксипропил)-2,3,4,12-тетрагидробензо[b]пиримидо[5,4-g][1,8]нафтиридин-2,4-дион (5a). Выход 47%, т.пл. > 360 °С. Спектр ЯМР¹H, б, м.д.: 1.95-2.05 м (2H, CH₂), 3.58 тд. (2H, CH₂OH, J₁, 6.4, J₂, 5.2 Гц), 4.58 т (1H, OH, J 5.2 Гц), 4.91 т (2H, NCH₂, J 7.0 гц), 7.65 дд (1Наром., J₁ 9.0, J₂ 2.4 Гц), 7.95-8.21 м (3Наром.), 9.03 с (1H, =CH), 9.15 с (1H, =CH),

11.21 уш.с (1H, NH). Найдено, %: С 63.57; Н 4.62; N 17.38. С₁₇H₁₄N₄O₃. Вычислено, %: С 63.34; Н 4.37; N 17.38.

1,2-Бензил-2,3,4,12-тетрагидробензо[b]пиримидо[5,4-g][1,8]нафтиридин-2,4-дион (5b). Выход 52%, т.пл. 346–347 °С. Спектр ЯМР¹H, б, м.д.: 6.08 с (2H, NCH₂), 7.21-7.48 м (5Наром.), 7.65 т (1Наром.), 7.91-8.08 м (2Наром.), 8.18 д (1Наром., J 9.1 Гц), 9.07 с (1H, =CH), 9.24 с (1H, =CH), 11.27 уш.с (1H, NH). Найдено, %: С 71.33; Н 3.64; N 15.53. С₂₁H₁₄N₄O₂. Вычислено, %: С 71.17; Н 3.98; N 15.81.

9,12-Диметил-2,3,4,12-тетрагидробензо[b]пиримидо[5,4-g][1,8]нафтиридин-2,4-дион (5c). Выход 71%, т.пл. 343–345 °С. Спектр ЯМР¹H, б, м.д.: 2.59 с (3H, CH₃), 4.03 с (3H, NCH₂), 7.42 дд (1Наром., J₁ 9.1, J₂ 2.4 Гц), 7.80-8.29 м (2Наром.), 9.02 с (1H, =CH), 9.21 с (1H, =CH). Найдено, %: С 65.47; Н 7.39; N 19.02. С₁₆H₁₂N₄O₂. Вычислено, %: С 65.74; Н 7.58; N 19.16.

9-Метил-12-(3-гидроксипропил)-2,3,4,12-тетрагидробензо[b]пиримидо[5,4-g][1,8]нафтиридин-2,4-дион (5d). Выход 63%, т.пл. > 360 °С. Спектр ЯМР¹H, б, м.д.: 1.92-2.03 м (2H, CH₂), 2.59 с (3H, CH₃), 3.55 тд (2H, CH₂OH, J₁ 6.4, J₂ 5.2 Гц), 4.61 т (1Наром., J₁ 9.0, J₂ 2.4 Гц), 4.91 т (2H, NCH₂, J 7.0 гц), 7.51 дд (1Наром., J₁ 9.0, J₂ 2.4 гц), 7.85 д (1Наром., J 2.4 гц), 8.09 д (1Наром., J 9.0 Гц), 9.02 с (1H, =CH), 9.18 с (1H, =CH), 11.21 уш.с. (1H, NH). Найдено, %: С 64.35; Н 5.41; N 16.37. С₁₈H₁₆N₄O₃. Вычислено, %: С 64.08; Н 5.07; N 16.60.

9-Метокси-12-фенил-2,3,4,12-тетрагидробензо[*b*]пиримидо[5,4-*g*][1,8]нафтири-дин-2,4-дион (5e). Выход 65%, т.пл > 300°C. Спектр ЯМР¹H, б, м.д.: 3.90 с (3H, OCH₃), 6.89 д (1Наром., J 2.0 Гц), 7.25 дд (1Наром., J₁ 9.0, J₂ 2.0 Гц), 7.32-7.65 м (5Наром), 8.09 д (1Наром., J 9.0 Гц), 9.09 с (1H, =CH), 9.15 с (1H, =CH), 11.17 с (1H, NH). Найдено, %: С 68.35; Н 3.57; N 15.32. С₂₁Н₁₄N₄O₃. Вычислено, %: С 68.10; Н 3.81; N 15.13.

Экспериментальная биологическая часть

Уровень метилирования ДНК определяли на модели перевиваемой опухоли мышцей саркоме 180, извлеченной после забоя животных методом передозировки эфирного наркоза. К опухолевому гомогенату добавляли 3x10⁶М раствора исследуемых веществ (на 10г опухоли 12,5мл раствора). В качестве растворителя использовали 0,5% раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). После инкубации в термостате при 37°C, в течение 24 ч экстрагировали ДНК фенольно-хлороформным методом [9], затем осуществляли кислотный гидролиз ДНК до азотистых оснований: гуанин (Г), цитозин (Ц), 5-метилцитозин (5МЦ), аденин (А), тимин (Т). С помощью тонкослойной хроматографии в растворителе н-бутанол:вода:аммиак (60:10:0,1) проводили спектрофотометрию элюатов всех оснований.

Противоопухолевую активность 9-метокси-10-замещенных 5-дезафлавинов 3а-е и бензопиримидонафтиридинов 5а-е изучали на модели саркома 180 согласно [3]. Соединения вводили животным в виде взвеси в КМЦ в дозе 125 мг/кг, спустя 48 ч после перевивки опухоли, внутрибрюшинно, ежедневно, в течение 6 дней. Контрольные животные в те же сроки экс-

перимента получали эквивалентный объем растворителя (КМЦ). Через 24 ч после последней инъекции животных забивали, определяли процент торможения роста опухоли по отношению к контролю, согласно общеизвестной формуле [3]. В опытах использовали 70 белых беспородных мышей обоего пола с исходным весом 20-24 г.

Полученные данные обрабатывали статистически согласно методу Стьюдента-Фишера.

Опухолевая ДНК, выделенная в ходе эксперимента, принадлежит к АТ-типу. Количество (Г+Ц+МЦ) в них составляет 41,7-44,2 моль%. Нуклеотидный состав ДНК соответствует правилам Чаргаффа.

Согласно полученным данным, четкое различие между образцами ДНК из опухолевой ткани после воздействия соединений 3а-е и 5а-е обнаруживается только в отношении содержания 5-МЦ. Из приведенных в таблице данных следует, что большинство изученных веществ вызывает заметное ингибирование уровня метилирования опухолевой ДНК. При этом наибольшим деметилирующим действием среди 5-дезафлавинов 3а-е обладали производные, содержащие гидроксипропил-, бензил-, 2,4-замещенный фенил- и фенил- фрагменты в структуре (3b, 3e, 3d, 3c). Они угнетали метилирование ДНК соответственно на 63,3; 58,3; 49,2 и 41,7% (P < 0,05). Среди бензопиримидонафтиридинов 5а-е относительно эффективными оказались 3-гидроксипропил- и 9,12-диметилзамещенные аналоги 5а и 5с, которые ингибировали уровень метилирования ДНК соответственно на 50,8 и 45,8% (P < 0,05). Деметилирующая способность соединений может быть обусловлена их влиянием на аномально метилированные гены, приводящие к торможению роста опухоли [5].

Нуклеотидный состав опухолевой ДНК

Соединение	Содержание оснований в ДНК, мол. %						Угнетение уровня метилирования, %
	Г	Ц	5-МЦ ± ζ	А	Т	Г+Ц+5-МЦ	
Саркома 180	21,81	20,61	1,20 ± 0,03	28,19	28,19	43,62	
3а	20,85	19,85	1,00 ± 0,02 P < 0,05	29,15	29,15	41,7	-
3b	21,98	21,54	0,44 ± 0,02 P < 0,05	28,02	28,02	43,96	63,3
3c	21,15	20,45	0,70 ± 0,04 P < 0,05	28,85	28,85	42,3	41,7
3d	21,31	20,70	0,61 ± 0,03 P < 0,05	28,69	28,69	42,62	49,2
3e	21,47	20,97	0,50 ± 0,05 P < 0,05	28,53	28,53	42,94	58,3
5а	22,06	21,47	0,59 ± 0,04 P < 0,05	27,94	27,94	44,12	50,8
5b	21,58	20,56	1,02 ± 0,05 P < 0,05	28,43	28,43	43,16	15
5c	21,59	20,94	0,65 ± 0,01 P < 0,05	28,41	28,41	43,18	45,8
5d	21,61	20,75	0,86 ± 0,02 P < 0,05	28,39	28,39	43,22	28,3
5e	21,99	20,89	1,10 ± 0,02 P < 0,05	28,01	28,01	43,98	-

В химиотерапевтических экспериментах некоторые производные 5-деазафлавина 5a-e и бензопиримидонафтиридина 5a-e проявили слабую или умеренную противоопухолевую активность в отношении саркомы 180, угнетая ее рост на 32-50% ($P < 0,05$). При сравнительной оценке полученных результатов установлена некоторая корреляция между *in vitro* и *in vivo* данными. Так, 3-гидроксипропилзамещенный аналог 5-деазафлавина (3b), обладающий выраженным деметилирующим действием в опытах *in vitro* (63,3%), в *in vivo* условиях также проявляет наибольшую противоопухолевую активность (ингибирование роста саркомы 180 на 50%, $P < 0,05$). Аналогичным образом соединение 3e с относительно меньшим деметилирующим действием (58,3%), обладало слабой терапевтической активностью (торможение роста опухоли на 30,5%, $P < 0,05$). В отличие от производных 5-деазафлавина аналоги бензопиримидонафтиридинов с умеренными деметилирующими свойствами (5a и 5c) в химиотерапевтических опытах не проявили достоверное противоопухолевое действие.

Выводы

На основе полученных результатов можно сделать следующие выводы:

Осуществлен синтез новых 9,12-замещенных бензо[b]пиримидо[5,4-g][1,8]нафтиридин-2,4-дионов. Изучением протопухолевых свойств описанных соединений и их воздействия на уровень метилирования опухолевой ДНК в условиях *in vitro* показано, что большинство из них проявляют значительное ингибирование уровня метилирования опухолевой ДНК и слабую

или умеренную противоопухолевую активность. Установлена корреляция методов *in vitro* и *in vivo* данными, что указывает на перспективность поиска более эффективных соединений в этих рядах.

Список литературы

1. Мелик-Оганджян Р.Г., Овсепян Т.Р., Израелян С.Г., Тамазян Р.А., Айвазян А.Г., Паносян Г.А. // ЖОрХ. 2014, т. 50, Вып. 8. С. 1178-1181 [Melik-Ohanjanyan R.G., Hovsepian T.R., Israelyan S.G., Tamazyan R.A., Ayvazyan A.G., Panosyan G.A. // Russ. J. Org.Chem. 2014, Vol.50, N 8, p. 1161-1163. DOI 10.1134/S1070428014080156].
2. Мелик-Оганджян Р.Г., Овсепян Т.Р., Израелян С.Г., Караханян Г.С., Минасян Н.С. // ЖОрХ. 2015, т.51, Вып.10. С. 1475-1478 [Melik-Ohanjanyan R.G., Hovsepian T.R., Israelyan S.G., Karakhanyan G.S., Minasyan N.S. // Russ. J. Org.Chem. 2015, Vol.51, N 10, p. 1444-1448. DOI 10.1134/151070428015100152].
3. Софьина З.П., Сыркин А.Б., Голдин А., Кляйн А. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Москва, Медицина, 1980.
4. Ali H.I., Tomita K., Akaho E., Kambara H., Miura S., Hayakawa H., Ashida N., Kawashima Y., Yamagishi T., Ikaya H., Yoneda F., Nagamatsu T. // Bioorg. Med. Chem. 2007, Vol.15. P. 242-256.
5. Azad Nilofer, Zahnow A. Cinthia, Rudin M. Charles, Baylin B. Stephen. The future of epigenetic therapy in solid tumors – lessons from the past. Nat Rev Clin Oncol. 2013, V.10, N5, p. 256-266.
6. El-Gazzaz A.B.A., Hafez H.N., Nawwaz G.A.M. New acyclic nucleosides analogues as potential analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-microbial derived from pyrimido[4,5-b]quinoline // Eur.J.Med. Chem. 2009, Vol. 44, p. 1427-1436.
7. He Z., Milburn G., Danel A., Puchala A., Tomasik P., Rasaha D. // J. Mater. Chem. 1997. Vol. 7. p. 2323-2325.
8. Meth-Cohn O., Narine B., Tarnowski B., A. Yersatile New Synthesis of Quinolines and Related Fused Pyridines. Part 5. The Synthesis of 2-Chloroquinoline-3-karbaldehydes // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1981, 1520-1530.
9. Vanyushin B.F., Masin F.N., Vasiliev V.R., A.N. Belozersky. The content of 5-methylcytosine in animal DNA: the species and tissue specificity. Biochim. et Biophys. Acta, 1973, V. 299, p. 397-400.