

Э. Лукевиц, И. Сегал, И. Биргеле, А. Заблочкая

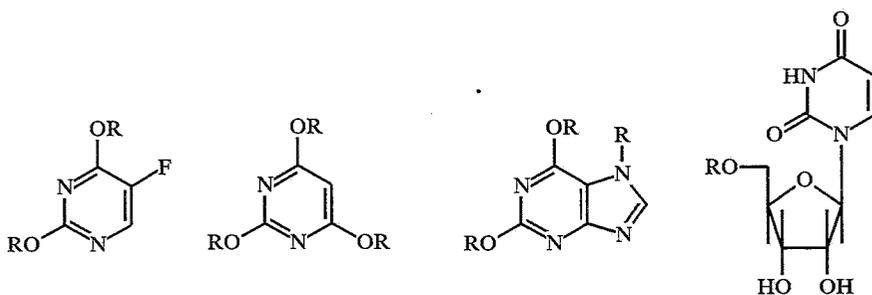
СИЛИЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

5*. ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИАЛКИЛСИЛИЛПРОИЗВОДНЫХ НЕКОТОРЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЙ

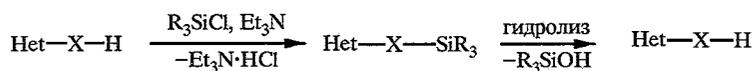
С помощью спектроскопии ЯМР ^1H исследована кинетика реакции десилилирования триорганилсилилпроизводных некоторых биологически активных гетероциклических оснований и уридина. Установлена корреляция между относительными скоростями десилилирования и стерическим окружением атома кремния. Обнаружено, что трис(*трет*-бутилдиметилсилил)барбитуровая кислота по тестам локомоторной активности и мускульного тонуса, влиянию на процессы памяти и тесту Порсолта обладает большей седативной активностью по сравнению с барбитуровой кислотой. 5'-*О*-*трет*-Бутилдиметилсилилуридин, в отличие от уридина, проявляет противоопухолевую активность, подавляя развитие фибросаркомы легких человека (HT-1080) и мышинных фибробластов.

Вследствие гидролитической лабильности связей Si—N и Si—O [2] триорганилсилильные производные биологически активных веществ являются наиболее удобными при использовании их в качестве пролекарственных средств [3]. Побочные продукты гидролиза, триорганилсиланолы и дисилоксаны, как правило, являются малотоксичными веществами [4]. Возможность регулирования скорости десилилирования посредством варьирования заместителей у атома кремния представляет собой характерную особенность этих соединений.

Нами синтезированы N- и O-триорганилсилилированные производные биологически активных гетероциклических оснований (5-фторурацила, барбитуровой кислоты, ксантина) и уридина и исследовано их гидролитиче-



R = Me₃Si, Et₃Si, (*i*-Pr)₃Si, *t*-BuMe₂Si, Me₂TxSi (Tx = Me₂CHMe₂C)



Het—X—H 5-фторурацил, барбитуровая кислота, ксантин
X = O, N

* Сообщение 4 см. [1].

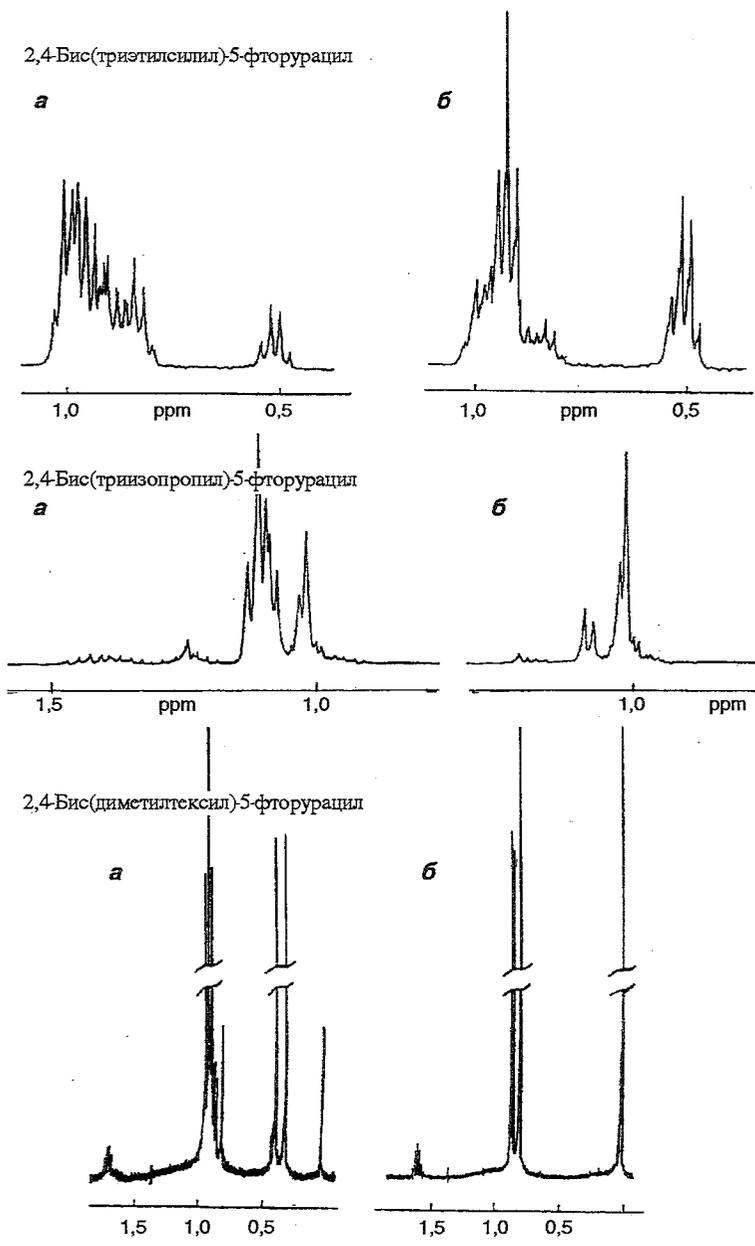


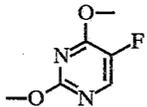
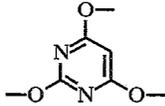
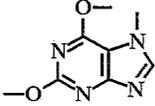
Рис. 1. Спектры ЯМР ^1H (δ 0...1,5 м.д.) триалкилсилильных производных 5-фторурацила:
a — время t_1 , *b* — время t_2 , $t_2 > t_1$

ское десилилирование (схема) с помощью ЯМР ^1H контроля триорганилсилильной спектральной области.

Триорганилсилилирование осуществлялось триорганилхлорсиланами в кипящем бензоле в присутствии триэтиламина [5]. 5'-*O*-*трет*-Бутилдиметилсилилуридин получен силилированием уридина *трет*-бутилдиметилхлорсиланом в тетрагидрофуране в присутствии 1,4-диазабцикло[2.2.2]октана и нитрата серебра [6].

Гидролитическое десилилирование проводилось в системе диоксан — вода. Постепенное понижение интенсивности сигналов в силильной области спектра ЯМР ^1H исследуемого соединения сопровождалось увеличением интенсивности сигнала продукта гидролиза, триалкилсиланола, в той же

Результаты кинетического исследования реакции гидролиза
($T = 37 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$)*

Соединение Het-X-SiR ₃ ²		k, c^{-1}	$\tau_{1/2}, \text{мин}$
	R = Et	$5,09 \cdot 10^{-3}$	2,27
	R = <i>i</i> -Pr	$4,12 \cdot 10^{-3}$	2,81
	R ₃ = TxMe ₂	$3,64 \cdot 10^{-3}$	3,18
	R = Et	$3,93 \cdot 10^{-3}$	2,94
	R = <i>i</i> -Pr	$2,62 \cdot 10^{-3}$	4,40
	R ₃ = TxMe ₂	$9,76 \cdot 10^{-3}$	11,08
	R = Et	$4,26 \cdot 10^{-3}$	2,72
	R = <i>i</i> -Pr	$3,12 \cdot 10^{-3}$	3,70
	R ₃ = TxMe ₂	$1,47 \cdot 10^{-3}$	7,83

* Расчеты проведены с использованием следующих зависимостей:

$$a \gg b, k = \frac{1}{t_a} \cdot \ln \frac{b}{b-x}, k' = ka, \tau_{1/2} = \frac{0,6931}{k'}$$

a, b — начальные концентрации реагирующих веществ (b — [Het—X—SiR₃], a — [H₂O]);
 $a - x, b - x$ — текущие концентрации реагирующих веществ; k — константа скорости реакции.

$\tau_{1/2}$ — время полупревращения.

² X = O, N.

области (рис. 1). Реакция гидролиза силилированных гетероциклических аминов была охарактеризована зависимостью $\ln(C_0/C_t)$ от t (C_0 — относительная начальная концентрация, C_t — относительная концентрация субстрата в момент измерения t) (рис. 2), позволившей вычислить константу скорости реакции псевдопервого порядка (k') и время полупревращения ($\tau_{1/2}$) (табл. 1).

Нами установлено, что относительная скорость гидролиза зависит от пространственного окружения атома кремния, влияющего на скорость атаки его ионом гидроксила. Уменьшение скорости гидролиза наблюдалось в следующем порядке силильных заместителей: Me₃Si- > Et₃Si- > *i*-Pr₃Si- >

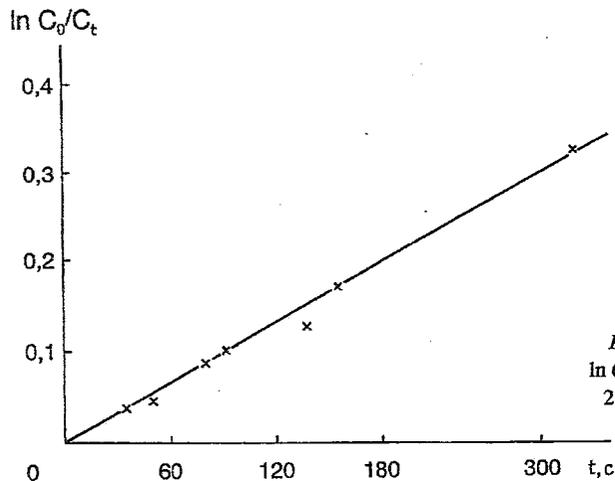


Рис. 2. Зависимость параметров $\ln C_0/C_t$ от t для реакции гидролиза 2,4,6-трис(диметилтексилсидил)барбитуровой кислоты

Токсичность и психотропная активность барбитуровой кислоты (В)
и 2,4,6-трис(*трет*-бутилдиметилсилил)барбитуровой кислоты (В—Si)

Тест	ED ₅₀ , мг/кг (или % по отношению к контролю, 100%)	
	В	В—Si
LD ₅₀	2740	3250
Труба	274	258
Подтягивание на перекладине	>500	355
Гипоксическая гипоксия	112	118
Фенаминовая гиперактивность	78/89	78*/100
Коразоловые судороги	108/164*	126*/149*
Условный рефлекс пассивного избегания	103,8	140,8*
Ретроградная амнезия	83,3	100,0
Порсолта	76*	80*

* Различия по отношению к контролю статистически достоверны при $P \leq 0,05$.

TxMe₂Si-, что согласуется с литературными данными [7, 8] по уменьшению скорости гидролиза триалкилсилилпроизводных эфедрина, норэфедрина и метилэфедрина с увеличением объема органических радикалов, связанных с атомом кремния.

Электронная природа самих гетероциклических систем также оказывает существенное влияние на скорость гидролиза. Так, последняя уменьшается при переходе от силилпроизводных 5-фторурацила к ксантину и далее к барбитуровой кислоте.

Поскольку силилирование соединений повышает их липофильность, триорганилсилилированные пролекарственные средства могли бы быть использованы для лечения патологических процессов, требующих внутриклеточного воздействия препаратов или проникновения их через

Таблица 3

Противоопухолевая активность* 5'-O-*трет*-бутилдиметилсилилуридина
на культурах клеток НТ-1080 (фибросаркома легких человека)
и NiH 3Т3 (мышинные фибробласты)*²

Концентрация, мкг/мл	Погибшие клетки, %			
	НТ-1080		NiH 3Т3	
	CV	MTT	NR	MTT
100	84	96	88	95
25	26	18	41	41
6,3	48	-5	10	28
1,6	63	-3	10	18
0,4	69	-2	-19	10

* CV — кристаллический фиолетовый; NR — нейтральный красный; MTT — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид.

² Уридин в этих тестах не проявляет цитотоксичности.

гематоэнцефалический барьер [9]. Эффективность этого процесса зависит от скорости гидролиза силилированного соединения.

Нами проведено исследование влияния 2,4,6-трис(*трет*-бутилдиметилсилил)барбитуровой кислоты на центральную нервную систему и изучена противоопухолевая активность 5'-*O*-*трет*-бутилдиметилсилилуридина. *трет*-Бутилдиметилсилильные группы, временно блокирующие гидрофильные функции и не претерпевающие моментальный гидролиз, были выбраны по принципу коммерческой доступности *трет*-бутилдиметилхлорсилана. Проведено сравнение результатов биологического тестирования с данными, полученными для несилилированных предшественников.

В результате исследования найдено, что силилированная и несилилированная барбитуровые кислоты обнаруживают седативное действие (табл. 2), проявляющееся в тестах локомоторной активности и мускульного тонуса и несколько сильнее выраженное при применении 2,4,6-трис(*трет*-бутилдиметилсилил)барбитуровой кислоты. По тесту «подтягивания на перекладине» силилированная барбитуровая кислота активнее несилилированной в 1,5 раза. Барбитуровая кислота и ее силилированный продукт являются антагонистами коразола, увеличивающими порог коразоловых судорог. Барбитуровая кислота, однако, проявила большую активность в тонической фазе (108/164), а силилированная — в клонической (126/149).

На процессы памяти наиболее заметное влияние оказала 2,4,6-трис(*трет*-бутилдиметилсилил)барбитуровая кислота, полностью (100%) предупреждавшая ретроградную амнезию и в 2 раза увеличившая латентный период обучения; показатели для барбитуровой кислоты ниже (соответственно 83,3% , 1,4 раза). Силилированная барбитуровая кислота проявляет несколько большую, по сравнению с несилилированной, антистрессовую активность в тесте Порсолта. Оба соединения малотоксичны; показатель острой токсичности силилированной барбитуровой кислоты в 1,2 раза ниже.

5'-*O*-*трет*-Бутилдиметилсилилуридин, в отличие от уридина, проявляет противоопухолевую активность (табл. 3), подавляя развитие фибросаркомы легких человека (НТ-1080) и мышинных фибробластов (NiH 3Т3), а также опухолевых клеток на 84...96% при концентрации 100 мкг/мл и на 70% (НТ-1080, CV-тест) при концентрации 0,4 мкг/мл.

Таким образом, сравнительное изучение силилированных барбитуровой кислот и уридина и их несилилированных предшественников свидетельствует о том, что показатели психотропной активности 2,4,6-трис(*трет*-бутилдиметилсилил)барбитуровой кислоты все же превосходят полученные для барбитуровой кислоты по большинству проведенных тестов. 5'-*O*-*трет*-Бутилдиметилсилилуридин активен в тестах на противоопухолевую активность при полном отсутствии активности в них уридина.

В результате сильной модификации лекарственных средств [3] может наблюдаться либо сохранение типа биологической активности [10], как в случае барбитуровой кислоты, либо его изменение [11], как в случае уридина. При сохранении типа биологической активности ее уровень может изменяться, по-видимому, вследствие относительной устойчивости связей Si—O, Si—N. Незначительное отличие 2,4,6-трис(*трет*-бутилдиметилсилил)барбитуровой кислоты от несилилированного предшественника в тестах психотропной активности указывает на то, что выбранная триалкилсилильная группа в данном случае не является оптимальной. Тем не менее для силилмодифицированных соединений, проявляющих биологическую активность даже на уровне своих несилилированных предшественников и обладающих, как правило, более низкой токсичностью, терапевтический индекс выше, а эффективная доза в пересчете на действующее вещество по массе меньше, чем несилилированного соединения, что является явным преимуществом по сравнению с дорогостоящими, более токсичными и вызывающими привыкание препаратами.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что О- и N-триалкилсилильные группы с успехом могут быть использованы при конструировании (про)лекарственных средств.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ПМР сняты на приборе Bruker WH-90/DS в диоксане-D₈. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан.

Общая методика определения скорости гидролиза силилированных гетероциклических оснований. Силилированные гетероциклические основания (15...20 ммоль) помещают в ампулу ЯМР и растворяют в диоксане (0,6 мл). После добавления 0,4 мл воды и быстрого перемешивания регистрируют изменения в спектральной области δ 1,5...0,0 м. д. через определенные промежутки времени. За начальную концентрацию исходного соединения C_0 принимали сумму интенсивностей сигналов исходного соединения и продукта гидролиза. Понижающееся значение интенсивности сигнала исходного соединения принимали за концентрацию соединения в момент времени t , C_t . Константу скорости реакции гидролиза псевдопервого порядка (k') и время полупревращения ($\tau_{1/2}$) вычисляли по зависимости $\ln(C_0/C_t)$ от t . Скорость гидролиза определяли при постоянных температуре ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) и давлении.

Цитотоксическую активность соединений оценивали по общепринятым методикам [12—14] по эффективной концентрации (мкг/мл), подавляющей рост клеток на 50%. Нейротропную активность соединений изучали на мышцах линии BALB/c и беспородных крысах-самцах. Масляный раствор исследуемого вещества вводили внутривентриально за 30 мин до постановки опыта [15]. Экспериментальные данные обрабатывали статистически экспресс-методом [16]. Острую токсичность соединений определяли в опытах на беспородных крысах-самцах при внутривентриальном введении.

Авторы выражают благодарность д-ру мед. наук С. Германе и канд. биол. наук И. Шестаковой (ИОС) за проведение биологического эксперимента, а также выражают благодарность Совету по науке ЛР (грант N 717) за оказанную финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лукевиц Э., Германе С., Сегал И., Заблоцкая А. // ХГС. — 1997. — № 2. — С. 270.
2. LeVier R. R., Chandler M. L., Wendel S.R. // Biochemistry of Silicon and Related Problems / G.Bendz and I.Lindqvist, Eds. — New York: Plenum, 1978. — P. 479.
3. Лукевиц Э., Заблоцкая А. // Металлоорг. химия. — 1993. — Т. 6. — С. 263.
4. LeVier R. R., Chandler M. L., Wendel S.R. // Biochemistry of Silicon and Related Problems / G.Bendz and I.Lindqvist, Eds., — New York: Plenum, 1978. — P. 485.
5. Nishimura T., Shimizu B., Iwai I. // Chem. Pharm. Bull. — 1963. — Vol. 11. — P. 1470.
6. Nakimelani G. H., Proba Z. A., Ogilvie K.K. // Can. J. Chem. — 1982. — Vol. 60. — P. 1106.
7. Beckett A. H., Taylor D. C., Gorrod J. W. // J. Pharm. Pharmacol. — 1975. — Vol. 27. — P. 588.
8. Воронков М. Г., Зелчан Г. И., Лукевиц Э. Я. Кремний и жизнь. — Рига: Зинатне, 1978. — 587 с.
9. Peng G. W., Marquez V. E., Driscoll J. S. // J. Med. Chem. — 1975. — Vol. 18. — P. 846.
10. Grzybowska J., Teodorczyk J., Piekos R., Put A. // Sci. Pharm. — 1983. — Vol. 51. — P. 301.
11. Camarasa M. J., Perez-Perez M. J., San-Felix A., Balzarini J., De Clercq E. // J. Med. Chem. — 1992. — Vol. 35. — P. 2721.
12. Freshney R. I. // Culture of animal cells. — New York: Wiley-liss, 1994. — P. 296.
13. Fast D. I., Lynch R. C., Leu R. W. // J. Leuk. Biol. — 1992. — P. 255.
14. Riddel R. I., Clotthiew R. H., Balls M. // Fd. Chem. Toxicol. — 1986. — Vol. 24. — P. 469.
15. Lukevics E., Segal I., Zablotskaya A., Germane S. // Molecules. — 1997. — Vol. 2. — P. 180.
16. Прозоровский В. В., Прозоровская М. П., Демченко В. М. // Фармакология и токсикология. — 1978. — № 4. — С. 497.