

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 I

*Посвящаю памяти моего учителя  
профессора Андрея Ивановича Греня*

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.

Открытие роли фолиевой кислоты (**1**) в клеточном метаболизме привело к пониманию того, что антагонисты фолиевой кислоты могут служить лекарствами для лечения бактериальных инфекций и злокачественных новообразований.

Фолиевая кислота (**1**) также известна как витамин B<sub>9</sub> или фолацин, и в живых организмах существует в виде аниона фолата. Молекула **1** состоит из гетероциклического фрагмента птеридина соединенного с остатком п-аминобензойной кислоты, в свою очередь присоединенный пептидной связью с α-аминогруппой остатка глутаминовой кислоты, которых может быть несколько.

Все живые клетки используют производные фолиевой кислоты для биосинтеза тимидина, пуринов и метионина (Схема 1).

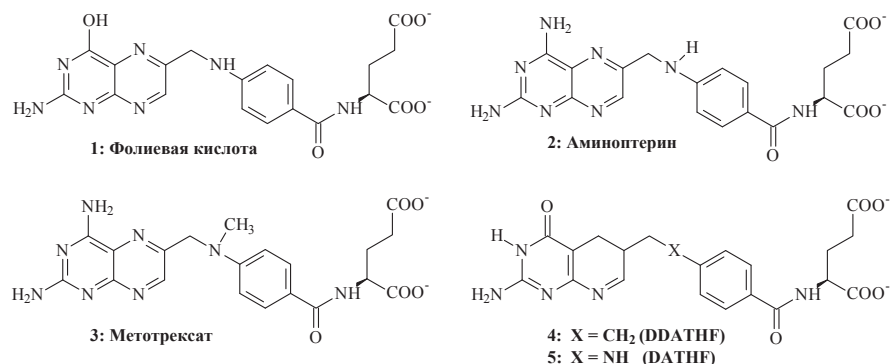


Рис. 1. Фолиевая кислота и некоторые первичные фолатные антиметаболиты.

Метаболизм фолата является одним из важнейших внутриклеточных процессов, связанных с воспроизводством, и нарушения этих метаболических путей приводят к клеточной смерти.

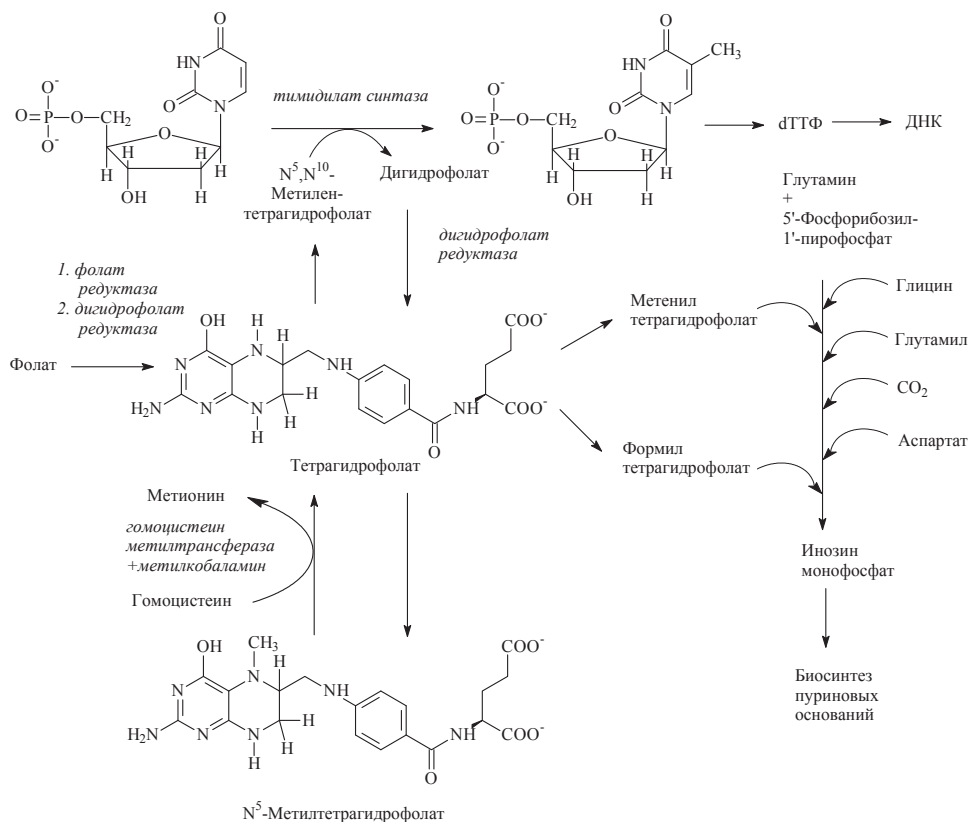


Схема 1. Метаболизм фолиевой кислоты.

Фолиевая кислота (1), ее восстановленные формы – дигидро– и тетрагидрофолиевые кислоты, а также ее одноуглеродные производные являются субстратом и коферментами дигидрофолат редуктаза–тимидилат синтазы [ДГФР-ТС, EC:1.5.1.3 2.1.1.45] [1], серин гидроксиметилтрансферазы [EC:2.1.2.1] [2], фоллипוליглутамил синтазы [EC:6.3.2.17] [3, 4],  $\gamma$ -глутамил гидролазы [EC:3.4.19.9] [5], глицинамид рибонуклеотид формилтрансферазы (ГАРФТ, EC:2.1.2.2) [6, 7], фосфорибозилглицинамид формилтрансферазы (ФРГАФТ, EC:6.3.4.13) [8, 9], или фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамид формил трансферазы (ФРАИКФТ, EC:2.1.2.3) [8] (Схема 1).

Многие ферменты метаболических путей фолатов хорошо изучены и их структуры расшифрованы. Дигидрофолат редуктаза (ДФР), тимидилат синтаза (ТС) до настоящего времени остаются главными целями ингибиторов и синтетических антифолатов [10], также как и  $\alpha$ -фолатные рецепторы ( $\alpha$ -ФР) [11, 12].

Исследование и разработка антифолатов для химиотерапии рака, является одним из основных направлений в создании противоопухолевых препаратов.

Многие антифолаты, ингибирующие метаболические пути в которых участвуют коферментные формы тетрагидрофолатов, нашли применение в качестве антибактериальных, антималярийных и противоопухолевых антибиотиков. Открытие аминоптерина (АП, **2**) и метотрексата (МТК (*MTX*), **3**), проявивших высокую противораковую активность [13], инициировало интенсивные исследования по синтезу многочисленных т.н. классических антифолатов, т.е. соединений имеющих в молекуле *para*-аминобензоил-1-глутаматный фрагмент [14].

Детальное изучение метаболического пути тетрагидрофталево́й кислоты привело к дизайну и синтезу производных **4** (Лометрексол) и **5** в которых атом N<sup>5</sup> замещен на атом углерода, молекулы которых проявили высокую способность ингибировать биосинтез тимина [15, 16].

Сравнение активности **3** при химиотерапии немелкоклеточного рака легкого с эффективностью других цитостатиков проведено в работе [17]. К сожалению, были обнаружены существенные проблемы, связанные с клиническим использованием этих препаратов, в частности для **3** такие как: (1) высокие уровни токсичности для костного мозга и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [18], (2) индуцированная резистентность к препарату, сопровождающееся повышением уровня целевого фермента ДГФР-ТС [15, 19], и (3) снижение транспорта препарата [20, 21]. Наиболее распространенной причиной возникшей резистентности считалось нарушение мембранного транспорта **3** [22, 23].

ДГФР и ТС все также оставались целью улучшенных ингибиторов [24]. Чтобы уменьшить проблемы, связанные с применением первых антифолатов, были синтезированы различные молекулы со структурными изменениями в птеридиновом кольце (например, деазааминоптеридины **4**, **5**), с различными заместителями в фенильном кольце и другие изостерические аналоги тетрагидрофолата [22, 25].

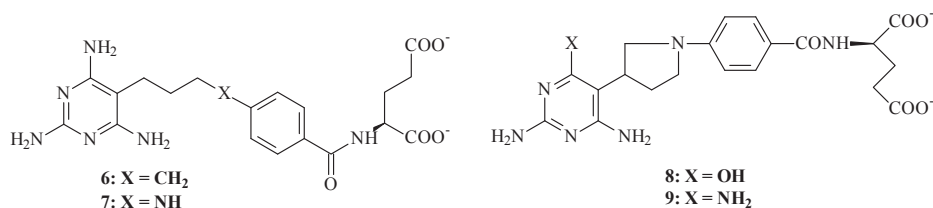


Рис. 2. Биоизостерические и конформационно-подвижные антифолаты.

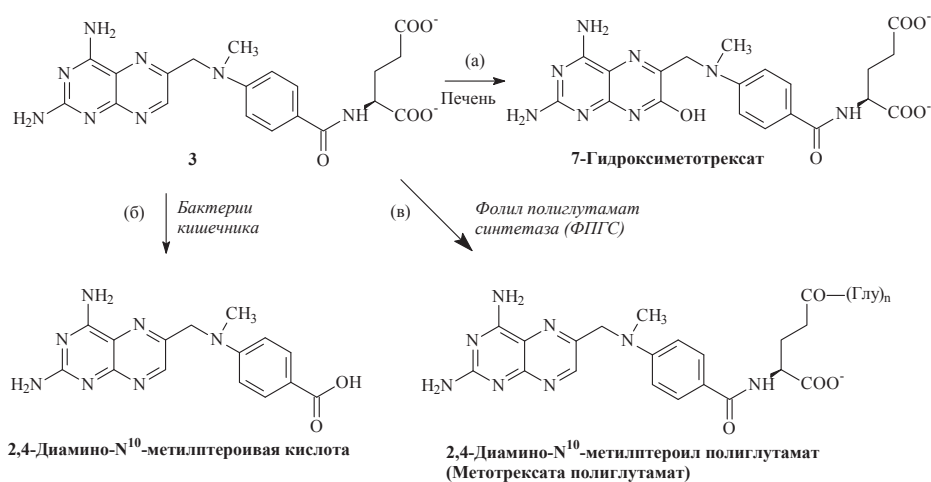
Характерными примерами являются антифолаты **6** – **9** (Рис. 2), структуры которых имеют разные степени подвижности и биоизостерические различия в птеридиновом ядре.

Замещенные 5-деазаацетилтетрагидрофолаты **6** и **7** и их аналоги проявляли близкие IC<sub>50</sub><sup>1</sup> при ингибировании роста клеток MCF-7 и активность против ГАРФТ. Эти агенты существенно ингибировали рост клеток культуры 38 или HCT-116 карциномы кишечника *in vivo*, что коррелировало с изменением константы Михаэлиса (K<sub>m</sub>) ФПГС под воздействием этих производных [26].

Соединения **8** и **9** проявили себя как эффективные ингибиторы ФПГС и ДГФР и задерживали рост культуры SCC25 карциномы (*Squamous-cell carcinoma*) плоских клеток человека [27].

Многочисленные производные, так называемые неклассические антифолаты, молекулы не несущие остатка глутаминовой кислоты, тем не менее проявляли высокую активность. Эти соединения были разработаны и синтезированы ввиду их предполагаемой более высокой липофильности. Предполагалось, что эти агенты смогут проходить через клеточные мембраны посредством простой диффузии, что должно увеличить их эффективность.

Можно заключить, что классические аналоги будут использовать те же самые клеточные транспортные системы что и сама фолиевая кислота или, например, **3**, и метаболизироваться до полиглутамат производных (Схема 2), а неклассические липофильные антифолаты не требовательны к транспортным системам и не будут превращаться в полиглутаматы [28].



Соединениями, принадлежащими к группе неклассических препаратов, являются производными пиридо[2,3-d]пиримидина [29,30,31,32], например пиритрексим (**10**, РТХ) [33] и триметриксат (**11**, ТМҚ) [34], а также пиридина, такие как триметоприм (**12**, ТМР) [35], пириметамин (**13**, РУР) [36] и метоприм (**14**, DDMP) [37].

Достижения в исследовании антифолатов были внимательно проанализированы в литературе начиная с конца 1970-х. На основе изучения взаимодействий ингибиторов и дигидрофолат редуктазы было показано значительные отличия в строении бактериального фермента и фермента млекопитающих [38].

Ряд антифолатов группы 2,4-диамино-5-метил-5-дезаптеридинов проявили высокий уровень активности и селективность против *T. gondii* как ингибиторы микробного ДГФР. Эти соединения были  $10^3$ -раз более селективно ингибировали фермент *T. gondii*, чем гомологи **10**, и были в 60 раз более селективны чем **11** [39]. Было также обнаружено, что **12** в 10 раз эффективнее ингибировал ДГФР *Pneumocystis carinii*, чем тот же фермент млекопитающих [37]. Соединения **10** и **11** и их аналоги, наоборот, были более активны в ингибировании ДГФР млекопитающих, хотя и не проявили высокой селективности [39]. Обнаружение антимаболической активности привело к тому, что многие из аналогов этих соединений нашли применение как антимикробные и противораковые препараты [40,41,42].

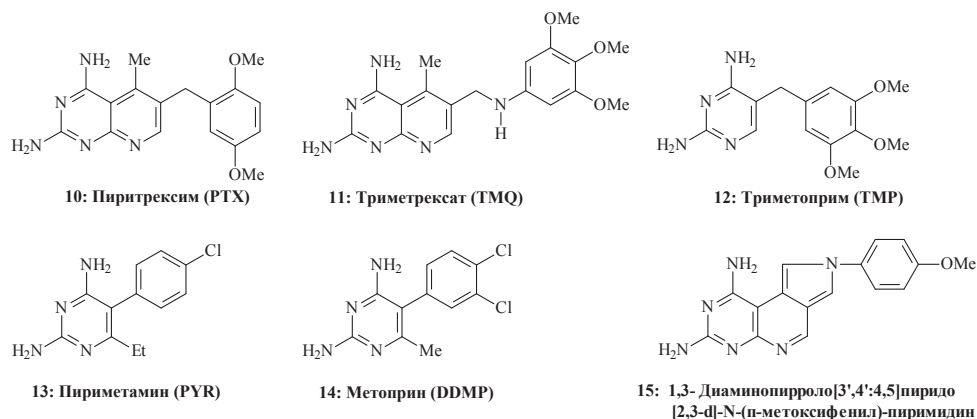


Рис. 3. Неклассические антифолаты.

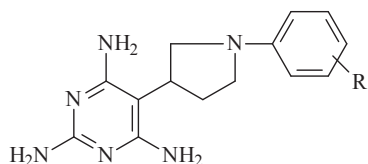
Соединения **10**, **11** и **12** клинически испытывались для лечения связанных со СПИД оппортунистических инфекций [43, 44, 45, 46], причем, на основе большого числа данных, было предложено применять в качестве препарата второй линии терапии СПИД-ассоциированной пневмонии, вызванной *Pneumocystis jirovecii* комплексный препарат **12**+Сульфаметоксазол (TMP-SMX) [46]. Соединения **10** и **11** также участвовали в фазе II клинических испытаний и проявили высокую активность при лечении рака мочевого пузыря [47]. Антималарийную активность проявили соединение **13** и его производные [36], а их близкий аналог **14** при совместном применении с фолиновой кислотой проявил активность терапевтического уровня против эпидермоидных твердых опухолей головного мозга, шеи и легких [37, 48]. Однако было обнаружено возникновение устойчивости к **14** без возникновения кросс-резистентности к **3** [49]. Распределение **14** в тканях организма крыс, зараженных птичим вирусом саркомы, было изучено в работе [50]. Недавние исследования **14** в качестве ингибитора гистамин-N-метилтрансферазы показали, что ингибирование путей метаболизма гистамина может индуцировать усиление своеобразной двигательной активности эпилептических крыс и спровоцировать их стереотипное поведение [51].

Производные 1,3-диаминопирроло[3',4':4,5]пиридо[2,3-d]-N-(p-метоксифенил)пиримидина (**15**) были активны против клеток HL-60 лейкемии. Хотя эксперименты с этими соединениями были затруднены из-за их слабой растворимости, тем не менее было показано, что ДГФР также является ферментом-мишенью этих препаратов [52, 53]. Дальнейшим развитием этих исследований явились синтез и изучение противораковой активности стереохимически более подвижных производных 5-(N-фенилпирролидин-3-ил)-2,4,6-триаминопиримидина (**16**) and 2,4-диамино-5-(N-фенилпирролидин-3-ил)-6(5H)-оксопиримидина (**17**) [54].

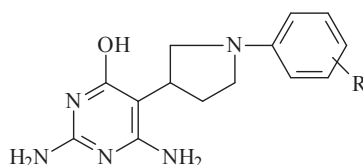
Способность соединений **16** и **17** ингибировать рост новообразований была изучена на различных видах опухолевых клеток, таких как аденокарцинома кишечника человека COLO205, карцинома легких H23 и адриамицин резистентных клетках H23/0.3, T-клетках лейкемии MOLT-4 и острой лимфоцитарной лейкемии CCRFC5M, и промиелоцитарных клетках лейкемии HL-60. В двух группах соеди-

нений, 2,4,6-триаминопиримидиновые производные **16** оказались более активны чем 2,4-диамино-6(5Н)-оксопиримидиновые аналоги **17**.

Галогензамещенные 5-(4-фторо- и 4-хлорофенил)-2,4,6-триаминопиримидины оказались более активны, чем **3**, в подавлении резистентных клеток H23/0.3 и ингибировали ДГФР и другие метаболические пути фолиевой кислоты [54].



**16:** 5-(N-фенилпирролидин-3-ил)-2,4,6-триаминопиримидины



**17:** 2,4-диамино-5-(N-фенилпирролидин-3-ил)-6(5Н)-гидроксипиримидины

Рис. 4. Неклассические фенилпирролидинамино- и окси-пиримидины.

Различные аспекты зависимости структуры и активности синтетических антифолатов были также подробно исследованы в последующие годы [55, 56, 57].

Для ряда диаминопиримидиновых производных, таких как **12** и его близких аналогов были рассмотрены вероятные причины высокого сродства к ферменту и значительной селективности [55].

Пристальному изучению были подвергнуты механизмы ингибирования ферментов-мишеней фолатавыми антиметаболитами. Изучение термодинамических параметров связывания соединений **3**, **11**, **12** и дигидрофолатредуктазы различных организмов, как прокариотов, так и эукариотов, показало заметные различия в селективности препаратов в отсутствии и присутствии НАДФН [56].

Авторы показали, что в присутствии НАДФН молекулы **12** проявляли большую аффинность к бактериальному ДГФР, в противоположность **3** и **11**, высокая активность которых не зависела от происхождения фермента. Авторы также предположили, что эффект НАДФН имел энтальпийную природу, кофермент не индуцировал селективность, а только усиливал уже имеющуюся. Противоположно, антифолаты **3** и **11**, в отсутствие НАДФН проявляли более сильную аффинность к эукариотическому ферменту, которая ослаблялась в присутствии никотинамидного кофермента и таким образом селективность к ферменту понижалась [56].

В обзоре [57] рассмотрены большинство известных механизмов взаимодействия ДГФР и молекул антифолатов.

Несмотря на то, что большое число ранее синтезированных классических и неклассических антифолатов были исследованы в клинике, к 2003 году только метотрексат **3** закрепился в клиническом использовании и противоопухолевой терапии [58]. В работе подведены итоги исследования многочисленных синтезированных антифолатов, которые условно можно отнести к двум направлениям: поиску соединений с более широким спектром действия к различным новообразованиям или поиску терапевтически более селективных антифолатов. Исследование механизмов цитотоксичности на примере различных антифолатов показало, что как ингибирование синтеза dТМФ, так и ингибирование синтеза пуринов *de novo* последовательно приводит к ингибированию репликации ДНК и клеточной смерти.

Было также показано, что ингибирование других метаболических путей фолиевой кислоты не столь необходимо для гибели клетки и влияние препарата на тот или иной метаболический путь зависит от вида клеток [58].

Прогресс в исследованиях антифолатов с 1994 по 2004 рассмотрен в работе И. Комписа, Х. Ислама и Р. Тена, где подробно обсуждены ферменты–мишени, строение антифолатов и изучение их биологической активности по отношению к ряду ферментов, микроорганизмов и опухолевых клеток [59].

Многочисленные усилия были направлены на изменение структуры молекулы антиметаболитов и основным направлениями в дизайне антифолатов стала замена и модификация птеридинового и бензольного колец другими гетероциклическими системами, а также изменение длины и природы цепочки между ними.

Птеридиновый фрагмент молекулы заменяли на хиназолиновый, а п-аминобензоатный фрагмент заменяли на гетероциклы ароматического и не-ароматического характера, такие как тиофен, тиазол, тиadiaзол, пиридин или пиримидин [60] или фуран [61]. Одним из примеров успешного дизайна является N-[(5-[метил[(2-метил-4-оксо-1,4-дигидрохиназолин-6-ил)метил]амино]-2-тиенил)-карбонил]-L-глутамовая кислота (**18**, Ралтитрексед), прошедший фазы I-III клинических испытаний [62]. Ралтитрексед **18** является одним из сильнейших антиметаболитов ТС с  $IC_{50}$  1-9 нМ [63, 64], до сих пор используемым в клинике для лечения рака кишечника [65, 66, 67].

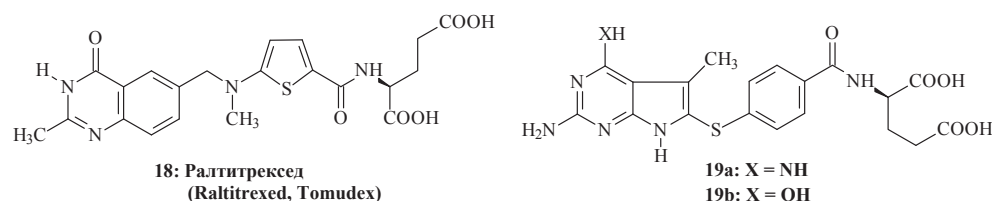


Рис. 5. Высокоэффективные ингибиторы ТС.

Птеридиновый фрагмент молекулы заменяли также на пирроло[2,3-d]пиримидиновый, при этом гетероциклический фрагмент соединялся с фенильным кольцом посредством сульфидной связи как в соединении **19** [68].

Было также обнаружено, что молекулы имеющие 2-амино-4-оксо или 2-метил-4-оксо замещение в пиримидиновом цикле лучше ингибируют ТС, как например уже упоминавшийся **18**. Противоположно, 2,4-диамино-замещенные производные пиримидина, как **3** и другие аналоги этого соединения более активны против фермента ДГФР (См. Рис 6.)

Авторы работы [68] также отмечали, что на активность антиметаболитов большое влияние оказывает способность активного соединения к внутриклеточному полиглутаминированию с помощью ФПГС (аналогично Схеме 2в). Они предположили, что увеличение числа глутаматных остатков молекуле агента увеличивает его способность оставаться в клетке, вероятно вследствие увеличенной гидрофильности, и усиливать конкурентное ингибирующее действие против фолат-зависимых ферментов.

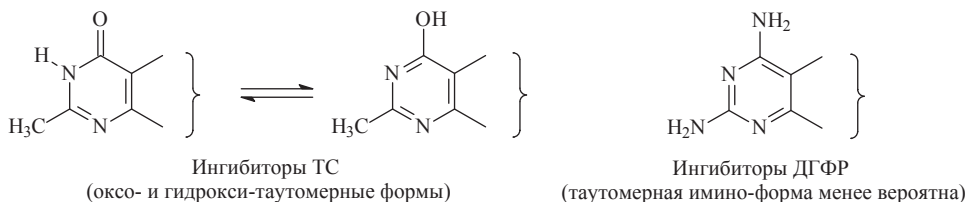


Рис. 6. Структурные фрагменты молекул антифолатов, ответственные за ингибирование различных ферментов.

Дальнейшее развитие этой группы соединений было предложено в работе [69], где аналог **19**, в котором метильная группа заменена на этильную, ингибировал как ТС ( $IC_{50}$  90 нМ), так и ДГФР ( $IC_{50}$  420 нМ). Ряд неклассических антифолатов этой группы с разнообразными заместителями в бензольном кольце ингибировали ТС с  $IC_{50}$  в интервале 0.23-26  $\mu$ М.

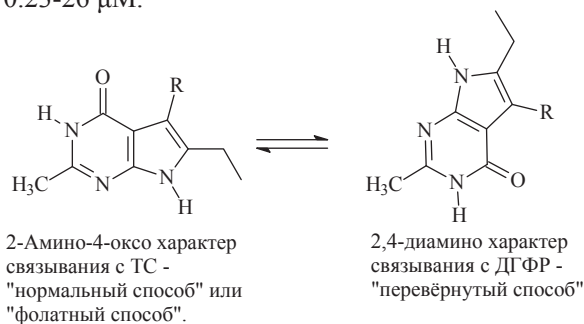


Рис. 7. Моды связывания пирроло[2,3-d]пиримидинов в активном центре ферментов-мишеней.

На основе рентгенографического изучения кристаллической структуры ферментов и строения их активных центров методом молекулярного моделирования [70] было предложено две модели связывания аналогов классических антифолатов имеющих 5-6-членную конденсированные системы: «нормальный» или «фолатный» способ связывания, характерный для взаимодействия фолиевой кислоты или ингибитора и ТС фермента и «перевернутый» способ связывания с ДГФР (Рис 7), при котором атом азота пиррола имитирует 4-амино-группу МТК **3** [68, 69]. Изучение обсуждаемых соединений подтвердило ранее высказанную гипотезу о предпочтительности получения соединения, которое обладало бы высокой активностью ингибировать оба важнейших фермента, ТС и ДГФР, но в тоже время, активность которого не зависела бы от силы связывания с ФПГС.

Эти представления нашли отражение в синтезе 7-бензил-4-метил-5-[(2-замещенных фенил)этил]-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-2-аминов (**20**, Рис. 8), молекулы которых проявили антимиотическую и противоопухолевую активность против антимиотически чувствительных и резистентных опухолевых клеток [71].



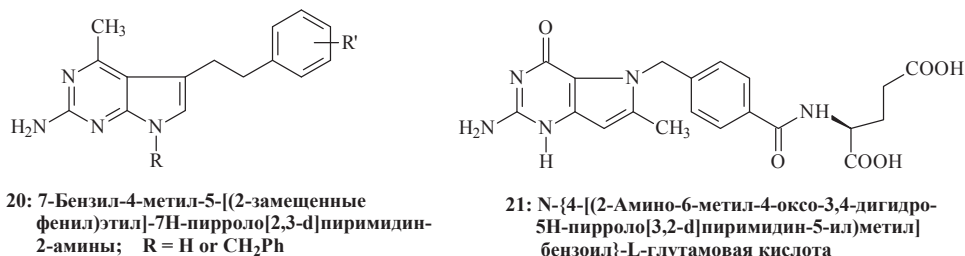


Рис. 8. Антифолаты эффективные против резистентных клеток.

Продолжением этих работ явился синтез классического антифолатата N-(4-[(2-амино-6-метил-4-оксо-3,4-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-5-ил)метил]бензо-ил)-L-глутамовой кислоты (**21**, Рис. 8) и его неклассических аналогов в качестве потенциальных ДГФР-ТС ингибиторов [72]. Соединение **21** обладало высокой активностью в наномолярном диапазоне ( $IC_{50\text{ТС}} = 46 \text{ nM}$ ,  $IC_{50\text{ДГФР}} = 120 \text{ nM}$ ) и было в 55-206 раз более сильным агентом, чем пеметрексед. Некоторые неклассические аналоги, хотя и были менее активны, чем **21**, но в более чем 100 раз селективно ингибировали ДГФР *T. gondii* [72].

Необходимо отметить, что исследователи группы А. Gangjee в ходе своих многолетних и плодотворных исследований фолатных антиметаболитов разработали и применили эффективный подход к дизайну и синтезу различных антифолатов, заключающийся в одновременном синтезе и исследовании биологической активности как классических структур, так и неклассических молекул [65, 69, 72, 73]. Неклассические аналоги отличались только тем, что в этих структурах глутаматный фрагмент молекулы заменяли на какой-либо иной заместитель, неспособный к полиглутаминированию, гетероциклическая часть молекулы сохранялась одинаковой.

Этот подход был применен к синтезу N-[4-[(2,4-диамино-5-пропил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-ил)сульфанил]бензоил]-L-глутамовой кислоты (**22**, Рис. 9) и его неклассических аналогов [73].

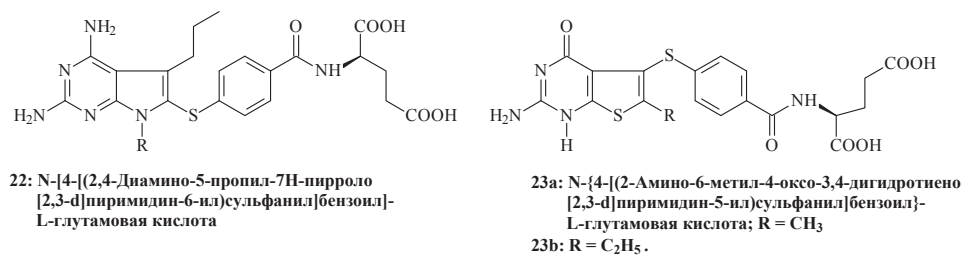


Рис. 9. Активные антиметаболиты, полученные подбором заместителей у C5 и C6.

На основе изучения данных биологической активности и молекулярного моделирования высокая ингибирующая активность полученных соединений соотносена с гидрофобными взаимодействиями объемного алкильного заместителя у C5 с активным центром человеческого фермента ДГФР. Авторы также заключили, что заместители у C5 и пара-заместитель у бензольного кольца являются определяющими для селективности и ингибиторной активности против ДГФР [73]. С

другой стороны, обсуждаемые соединения хуже ингибировали ТС, что указывало, что присутствие в молекуле заместителей больших, чем метил ослабляет двойное ТС-ДГФР ингибирование классическими антифолатами. Авторы обнаружили, что объем заместителя у C5 и природа липофильного заместителя в 6-арилтио боковой цепи соединений типа **22** определяет потенцию и селективность этих молекул против фермента ДГФР из *T. gondii* и *M. avium* [73].

Ранее предложенная перспективная стратегия получила развитие в синтезе N-[4-[(2-амино-6-метил-4-оксо-3,4-дигидропиридино[2,3-d]пиримидин-5-ил)сульфанил]-бензоил]-L-глутамовой кислоты (**23a**, Рис. 9) и его неклассических аналогов [74]. Классический антиметаболит, соединение **23a**, обладал высокой активностью в ингибировании ферментов ТС ( $IC_{50} = 40$  нМ) и ДГФР ( $IC_{50} = 20$  нМ) и оказался наиболее эффективным антифолатом к тому времени. Неклассические представители этого ряда проявили среднюю активность в ингибировании человеческого ТС ( $IC_{50} = 0.11 - 4.6$  мМ) [74].

Эти исследования подтвердили высокое сродство 2-амино-6-метил-4-оксо-3,4-дигидропиридино[2,3-d]пиримидин-5-ил)сульфанилового остова к активному центру фермента, обнаруженное ранее с помощью молекулярного моделирования [70]. Рентгенографическое исследование кристаллической структуры тройственного комплекса **23b**, в молекулах которых метил у C6 заменен на этильную группу, НАДФН и человеческого ДГФР различных типов показало, что тиено[2,3-d]пиримидиновые производные **23** связываются с активным сайтом фермента в «фолатной» ориентации [75]. Соединение **23b**, также как и **23a**, было двойным ингибитором ТС ( $IC_{50} = 54$  нМ) и ДГФР ( $IC_{50} = 19$  нМ), и в 238 раз более эффективнее, чем пеметрексед. Соединения **23a,b** показали высокую эффективность в подавлении роста 60 различных линий раковых клеток в культуре, сгруппированные в подгруппы, включая лейкемию, мелкоклеточный рак легкого, толстой кишки, центральной нервной системы (ЦНС), меланому, яичников, почек, простаты и молочной железы, со значениями  $GI_{50}^1$  для восьми из них  $<10^{-6}$  М [75]. Эти данные свидетельствовали о том, что присутствие у атома C6 в молекулах антиметаболита **23** таких заместителей как метил и этил способствовали эффективному ингибированию ферментов ТС и ДГФР [75].

## 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.

## Литература

1. Lazar G., Zhang H., Goodman H.M. The origin of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase isogenes of *Arabidopsis thaliana*. // *Plant J.* – 1993. – Vol. 3 (5). – P. 657-668.
2. Fujioka M. Purification and properties of serine hydroxymethylase from soluble and mitochondrial fractions of rabbit liver. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1969. – Vol. 185 (2). – P. 338-349.
3. Griffin M.J., Brown G.M. The biosynthesis of folic acid. III. Enzymatic formation of dihydrofolic acid from dihydroptericoic acid and of tetrahydropteroylpolyglutamic acid compounds from tetrahydrofolic acid. // *J. Biol. Chem.* – 1964. – Vol. 239. – P. 310-316.
4. Cherest H., Thomas D., Surdin-Kerjan Y. Polyglutamylation of folate coenzymes is necessary for methionine biosynthesis and maintenance of intact mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275 (19). – P. 14056-14063.
5. Yao R., Nimec Z., Ryan T.J., Galivan J. Identification, cloning, and sequencing of a cDNA coding for rat gamma-glutamyl hydrolase. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271 (15). – P. 8525-8528.
6. Mendelsohn L.G., Shih C., Schultz R.M., Worzalla J.F. Biochemistry and pharmacology of glycinamide ribonucleotide formyltransferase inhibitors: LY309887 and lometrexol. // *Invest. New Drugs.* – 1996. – Vol. 14 (3). – P. 287-294.
7. McLeod H.L., Cassidy J., Powrie R.H., Priest D.G., Zorbas M.A., Synold T.W., Shibata S., Spicer D., Bissett D., Pithavala Y.K., Collier M.A., Paradiso L.J., Roberts J.D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the glycinamide ribonucleotide formyltransferase inhibitor AG2034. // *Clinical Cancer Research.* – 2000. – Vol. 6 (7). – P. 2677-2684.
8. Hartman S.C., Buchanan J.M. Biosynthesis of the purines. XXVI. The identification of the formyl donors of the transformylation reactions. // *J. Biol. Chem.* – 1959. – Vol. 234 (7). – P. 1812-1816.
9. Smith G.K., Benkovic P.A., Benkovic S.J. L(-)-10-Formyltetrahydrofolate is the cofactor for glycinamide ribonucleotide transformylase from chicken liver. // *Biochemistry.* – 1981. – Vol. 20 (14). – P. 4034-4036.
10. Jolivet J., Cowan K.H., Curt G.A., Clendeninn N.J., Chabner B.A. The pharmacology and clinical use of methotrexate. // *N. Engl. J. Med.* – 1983. – Vol. 309 (18). – P. 1094-1104.
11. Ross J.F., Wang H., Behm F.G., Mathew P., Wu M., Booth R., Ratnam M. Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. // *Cancer.* – 1999. – Vol. 85 (2). – P. 348-357.
12. 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.
13. Jukes T.H. Searching for magic bullets: early approaches to chemotherapy-antifolates, methotrexate--the Bruce F. Cain memorial award lecture. // *Cancer Res.* – 1987. – Vol. 47 (21). – P. 5528-5536.
14. Takimoto C.H. Antifolates in clinical development. // *Semin. Oncol.* – 1997. – Vol. 24 (5 Suppl 18). – P. S18-40. -s18-51.
15. Taylor E.C., Harrington P.J., Fletcher S.R., Beardsley G.P., Moran R.G. Synthesis of the antileukemic agents 5,10-dideazaaminopterin and 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydroaminopterin. // *J. Med. Chem.* – 1985. – Vol. 28 (7). – P. 914-921.
16. Taylor E.C., Hamby J.M., Shih C., Grindey G.B., Rinzel S.M., Beardsley G.P., Moran R.G. Synthesis and antitumor activity of 5-deaza-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid and its N10-substituted analogues. // *J. Med. Chem.* – 1989. – Vol. 32 (7). – P. 1517-1522.
17. Переводчикова Н. И. М.А.Ф. Изменение возможностей химиотерапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) с введением в практику новых противоопухолевых препаратов – состояние проблемы в 2002 г. // *Практическая онкология.* – 2002. – Vol. 3 (4). – P. 282-294.
18. Hakala M.T. On the role of drug penetration in amethopterin resistance of Sarcoma-180 cells in vitro. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1965. – Vol. 102 (1). – P. 198-209.
19. Nair M.G. In *The Chemistry of Antitumor Agents.* – William D. E., Ed. – Glasgow and London. – Blackie and Son. – 1989. – P. 202.
20. Galivan J. 5-Methyltetrahydrofolate transport by hepatoma cells and methotrexate-resistant sublines in culture. // *Cancer Res.* – 1981. – Vol. 41 (5). – P. 1757-1762.
21. Rosowsky A. *Progress in Medicinal Chemistry.* – Amsterdam. – Elsevier Science. – 1989. – Vol. 26. – P.252.
22. Sirotnak F.M.B., J. J.; Ensminger, W. B.; Montgomery, J. A. Folate antagonists as therapeutic agents. – Academic Press. – 1984. Vol. 1, 2.
23. Blakley R.L., Benkovic S.J. *Folates and pterins: Chemistry and biochemistry of folates.* – Wiley. – 1984.
24. Hitchings G.H., Smith S.L. Dihydrofolate reductases as targets for inhibitors. // *Adv. Enzyme Regul.* – 1980. – Vol. 18. – P. 349-371.

25. Palmer D.C., Skotnicki J.S., Taylor E.C. Synthesis of analogues of folic acid, aminopterin and methotrexate as antitumor agents. // Prog. Med. Chem. – 1988. – Vol. 25. – P. 85-231.
26. Mullin R.J., Keith B.R., Bigham E.C., Duch D.S., Ferone R., Heath L.S., Singer S., Waters K.A., Wilson H.R. In vivo antitumor activity and metabolism of a series of 5-deazaacyclotetrahydrofolate (5-DACTHF) analogues. // Biochem. Pharmacol. – 1992. – Vol. 43 (7). – P. 1627-1634.
27. Rosowsky A.B., H.; Wright, J. E.; Moran, R. G. 5-Deaza-7-desmethylene analogues of 5,10-methylene-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid and related compounds: Synthesis and in vitro biological activity. // J. Heterocycl. Chem. – 1994. – Vol. 31. – P. 1241–1250.
28. Grivsky E.M., Lee S., Sigel C.W., Duch D.S., Nichol C.A. Synthesis and antitumor activity of 2,4-diamino-6-(2,5-dimethoxybenzyl)-5-methylpyrido[2,3-d]pyrimidine. // J. Med. Chem. – 1980. – Vol. 23 (3). – P. 327-329.
29. Kamen B. A. C.P.D., Bertino J. R. Chapter 49. Pharmacokinetics of MTX. In Holland-Frei Cancer Medicine., 6th edition ed. Kufe DW P. R., Weichselbaum RR, et al., Ed. – Hamilton (ON). – BC Decker. – 2003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13233/>
30. Taylor I.W., Slowiaczek P., Friedlander M.L., Tattersall M.H. Selective toxicity of a new lipophilic antifolate, BW301U, for methotrexate-resistant cells with reduced drug uptake. // Cancer Res. – 1985. – Vol. 45 (3). – P. 978-982.
31. Gangjee A., Zhu Y., Queener S.F. 6-Substituted 2,4-diaminopyrido[3,2-d]pyrimidine analogues of piritrexim as inhibitors of dihydrofolate reductase from rat liver, Pneumocystis carinii, and Toxoplasma gondii and as antitumor agents. // J. Med. Chem. – 1998. – Vol. 41 (23). – P. 4533-4541.
32. Lin J.T., Bertino J.R. Trimetrexate: a second generation folate antagonist in clinical trial. // J. Clin. Oncol. – 1987. – Vol. 5 (12). – P. 2032-2040.
33. Rosowsky A., Papoulis A.T., Forsch R.A., Queener S.F. Synthesis and antiparasitic and antitumor activity of 2,4-diamino-6-(arylmethyl)-5,6,7,8-tetrahydroquinazoline analogues of piritrexim. // J. Med. Chem. – 1999. – Vol. 42 (6). – P. 1007-1017.
34. Elslager E.F., Johnson J.L., Werbel L.M. Folate antagonists. 20. Synthesis and antitumor and antimalarial properties of trimetrexate and related 6-[(phenylamino)methyl]-2,4-quinazolinediamines. // J. Med. Chem. – 1983. – Vol. 26 (12). – P. 1753-1760.
35. Manchand P.S.R., P.; Belica, P. S.; Olivea, G. V.; Perrota, A. V.; Wong, H. S. . Syntheses of antibacterial 2,4-diamino-5-benzylpyrimidines. Ormetoprim and trimethoprim. // J. Org. Chem. . – 1992. – Vol. 57. – P. 3531–3535.
36. Russell P.B.H., G. H. 2,4-Diaminopyrimidines as Antimalarials. III. 5-Aryl Derivatives. . // J. Am. Chem. Soc.. – 1951. – Vol. 73. – P. 3763–3770.
37. de Jager R., Dupont D., Rodzynek J.J., Dorlet C., Lagrange G. Phase I clinical trial and pharmacology of 2,4-diamino-5-(3',4'-dichlorophenyl)-6-methylpyrimidine (metoprine) (DDMP) and folic acid (CF). // Cancer Chemother. Pharmacol. – 1981. – Vol. 6 (1). – P. 75-80.
38. Bertino J.R., Lindquist C. In Advances in Chemotherapy. Carter S. K., Goldin, A., Kureitani, K., Mathe, G., Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Umegara, B., Ed. – Tokyo, University Park, Baltimore. – Japan Scientific. – 1978. P. 155.
39. Piper J.R., Johnson C.A., Krauth C.A., Carter R.L., Hosmer C.A., Queener S.F., Borotz S.E., Pfefferkorn E.R. Lipophilic antifolates as agents against opportunistic infections. 1. Agents superior to trimetrexate and piritrexim against Toxoplasma gondii and Pneumocystis carinii in in vitro evaluations. // J. Med. Chem. – 1996. – Vol. 39 (6). – P. 1271-1280.
40. Gangjee A., Devraj R., Queener S.F. Synthesis and dihydrofolate reductase inhibitory activities of 2,4-diamino-5-deaza and 2,4-diamino-5,10-dideaza lipophilic antifolates. // J. Med. Chem. – 1997. – Vol. 40 (4). – P. 470-478.
41. Gangjee A., Vasudevan A., Queener S.F. Synthesis and biological evaluation of nonclassical 2,4-diamino-5-methylpyrido[2,3-d]pyrimidines with novel side chain substituents as potential inhibitors of dihydrofolate reductases. // J. Med. Chem. – 1997. – Vol. 40 (4). – P. 479-485.
42. Rosowsky A., Cody V., Galitsky N., Fu H., Papoulis A.T., Queener S.F. Structure-based design of selective inhibitors of dihydrofolate reductase: synthesis and antiparasitic activity of 2,4-diaminopteridine analogues with a bridged diarylamine side chain. // J. Med. Chem. – 1999. – Vol. 42 (23). – P. 4853-4860.
43. Takimoto C.H. New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications. // Oncologist. – 1996. – Vol. 1 (1 & 2). – P. 68-81.
44. Lane H.C., Laughon B.E., Falloon J., Kovacs J.A., Davey R.T., Jr., Polis M.A., Masur H. NIH conference. Recent advances in the management of AIDS-related opportunistic infections. // Ann. Intern. Med. – 1994. – Vol. 120 (11). – P. 945-955.

45. Ramanathan R.K., Lipsitz S., Asbury R.F., Qazi R., Greenberg B.R., Haller D.G. Phase II trial of trimetrexate for patients with advanced gastric carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study (E1287). // *Cancer*. – 1999. – Vol. 86 (4). – P. 572-576.
46. Benfield T., Atzori C., Miller R.F., Helweg-Larsen J. Second-line salvage treatment of AIDS-associated *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a case series and systematic review. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2008. – Vol. 48 (1). – P. 63-67.
47. Khorsand M., Lange J., Feun L., Clendeninn N.J., Collier M., Wilding G. Phase II trial of oral piritrexim in advanced, previously treated transitional cell cancer of bladder. // *Invest. New Drugs*. – 1997. – Vol. 15 (2). – P. 157-163.
48. Alberto P., Brugarolas A., Hansen H.H., Cavalli F., Klepp O., Renard J. Phase II study of diamino-dichlorophenyl-methylpyrimidine (DDMP) with folinic acid (CF) protection and rescue. // *Eur. J. Cancer*. – 1980. – Vol. 16(9). – P. 1243-1249.
49. Browman G.P., Gorka C., Mehta C., Lazarus H., Abelson H.T. Studies with a 2,4-diamino-5-(3',4'-dichlorophenyl)-6-methylpyrimidine (DDMP)-resistant L1210 leukemia cell line without cross-resistance to methotrexate. // *Biochem. Pharmacol.* – 1980. – Vol. 29 (16). – P. 2241-2245.
50. Serano R.D., Sigel C.W., Nichol C.A., Bigner D.D. Evaluation of the lipid-soluble diaminopyrimidines, metoprine and etoprine, in the avian sarcoma virus rat glioma model. // *Cancer Treat. Rep.* – 1982. – Vol. 66 (1). – P. 99-106.
51. Samotaeva I.S., Birioukova L.M., Midzyanovskaya I.S., Kuznetsova G.D., Bazyan A.S., Tuomisto L. Metoprine induced behavioral modifications and brain regional histamine increase in WAG/Rij and Wistar rats. // *Epilepsy Res.* – 2012. – Vol. 101 (1-2). – P. 148-156.
52. Su T.L., Watanabe K.A. Chemistry of the pyrrolo[3,4-c]pyrido[2,3-d]pyrimidine system. Synthesis of 6,7-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrido[2,3-d]pyrimidines, a novel ring system with potential biological interest. // *J. Org. Chem.* – 1989. – Vol. 54 (1). – P. 220-224.
53. Su T.-L., Yang Y.-K., Huang J.-T., Ren W.-Y., Watanabe K.A., Chou T.-C. Synthesis of 4-[(1,3-diaminopyrrolo[3',4':4,5]pyrido[2,3-d]-pyrimidin-8-yl)benzoyl]-L-glutamic acid as a potential antifolate. // *J. Heterocyclic Chem.* – 1993. – Vol. 30 (5). – P. 1437-1443.
54. Huang Y.L., Lin C.F., Lee Y.J., Li W.W., Chao T.C., Bacherikov V.A., Chen K.T., Chen C.M., Su T.L. Non-classical antifolates, 5-(N-phenylpyrrolidin-3-yl)-2,4,6-triaminopyrimidines and 2,4-Diamino-6(5H)-oxopyrimidines, synthesis and antitumor studies. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 11 (1). – P. 145-157.
55. Baccanari D.P., Kuyper L.F. Basis of selectivity of antibacterial diaminopyrimidines. // *J. Chemother.* – 1993. – Vol. 5 (6). – P. 393-399.
56. Sasso S.P., Gilli R.M., Sari J.C., Rimet O.S., Briand C.M. Thermodynamic study of dihydrofolate reductase inhibitor selectivity. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1994. – Vol. 1207 (1). – P. 74-79.
57. Blakley R.L. Eukaryotic Dihydrofolate Reductase. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. – John Wiley & Sons, Inc. – 2006. – P. 23-102.
58. McGuire J.J. Anticancer antifolates: current status and future directions. // *Curr. Pharm. Des.* – 2003. – Vol. 9 (31). – P. 2593-2613.
59. Kompis I.M., Islam K., Then R.L. DNA and RNA synthesis: antifolates. // *Chem. Rev.* – 2005. – Vol. 105 (2). – P. 593-620.
60. Marsham P.R., Hughes L.R., Jackman A.L., Hayter A.J., Oldfield J., Wardleworth J.M., Bishop J.A., O'Connor B.M., Calvert A.H. Quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitors: heterocyclic benzoyl ring modifications. // *J. Med. Chem.* – 1991. – Vol. 34 (5). – P. 1594-1605.
61. Gangjee A., Zeng Y., McGuire J.J., Kisliuk R.L. Synthesis of classical, four-carbon bridged 5-substituted furo[2,3-d]pyrimidine and 6-substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidine analogues as antifolates. // *J. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 48 (16). – P. 5329-5336.
62. Calvert A.H., Alison D.L., Harland S.J., Robinson B.A., Jackman A.L., Jones T.R., Newell D.R., Siddik Z.H., Wiltshaw E., McElwain T.J., et al. A phase I evaluation of the quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitor, N10-propargyl-5,8-dideazafolic acid, CB3717. // *J. Clin. Oncol.* – 1986. – Vol. 4 (8). – P. 1245-1252.
63. Bisset G.M., Pawelczak K., Jackman A.L., Calvert A.H., Hughes L.R. Syntheses and thymidylate synthase inhibitory activity of the poly-gamma-glutamyl conjugates of N-[5-[N-(3,4-dihydro-2-methyl-4-oxoquinazolin-6-ylmethyl)-N-methylamino]-2-thenoyl]-L-glutamic acid (ICI D1694) and other quinazoline antifolates. // *J. Med. Chem.* – 1992. – Vol. 35 (5). – P. 859-866.
64. Keyomarsi K., Samet J., Molnar G., Pardee A.B. The thymidylate synthase inhibitor, ICI D1694, overcomes translational detainment of the enzyme. // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268 (20). – P. 15142-15149.

65. Widemann B.C., Balis F.M., Godwin K.S., McCully C., Adamson P.C. The plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed (Tomudex) in a nonhuman primate model. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 44 (6). – P. 439-443.
66. Wilson K.S., Malfair Taylor S.C. Raltitrexed: optimism and reality. // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* – 2009. – Vol. 5 (11). – P. 1447-1454.
67. Kelly C., Bhuvu N., Harrison M., Buckley A., Saunders M. Use of raltitrexed as an alternative to 5-fluorouracil and capecitabine in cancer patients with cardiac history. // *Eur. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 49 (10). – P. 2303-2310.
68. Gangjee A., Lin X., Kisliuk R.L., McGuire J.J. Synthesis of N-{4-[(2,4-diamino-5-methyl-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6-yl)thio]benzoyl}-L-glutamic acid and N-{4-[(2-amino-4-oxo-5-methyl-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6-yl)thio]benzoyl}-L-glutamic acid as dual inhibitors of dihydrofolate reductase and thymidylate synthase and as potential antitumor agents. // *J. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 48 (23). – P. 7215-7222.
69. Gangjee A., Jain H.D., Phan J., Lin X., Song X., McGuire J.J., Kisliuk R.L. Dual inhibitors of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase as antitumor agents: design, synthesis, and biological evaluation of classical and nonclassical pyrrolo[2,3-d]pyrimidine antifolates(1). // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49 (3). – P. 1055-1065.
70. Gangjee A., Lin X. CoMFA and CoMSIA analyses of *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase, *Toxoplasma gondii* dihydrofolate reductase, and rat liver dihydrofolate reductase. // *J. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 48 (5). – P. 1448-1469.
71. Gangjee A., Yu J., Copper J.E., Smith C.D. Discovery of novel antitumor antimetabolic agents that also reverse tumor resistance. // *J. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 50 (14). – P. 3290-3301.
72. Gangjee A., Li W., Yang J., Kisliuk R.L. Design, synthesis, and biological evaluation of classical and nonclassical 2-amino-4-oxo-5-substituted-6-methylpyrrolo[3,2-d]pyrimidines as dual thymidylate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51 (1). – P. 68-76.
73. Gangjee A., Jain H.D., Queener S.F., Kisliuk R.L. The effect of 5-alkyl modification on the biological activity of pyrrolo[2,3-d]pyrimidine containing classical and nonclassical antifolates as inhibitors of dihydrofolate reductase and as antitumor and/or antiopportunistic infection agents. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51 (15). – P. 4589-4600.
74. Gangjee A., Qiu Y., Li W., Kisliuk R.L. Potent dual thymidylate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors: classical and nonclassical 2-amino-4-oxo-5-arylthio-substituted-6-methylthieno[2,3-d]pyrimidine antifolates. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51 (18). – P. 5789-5797.
75. 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.

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 I**

В огляді розглянуто структури основних протиракових 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 CANCER CHEMOTHERAPY. PART I**

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.