МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН ЭФФЕКТИВНЫХ АНТИФЛОГИСТИКОВ, АНАЛЬГЕТИКОВ И ДИУРЕТИКОВ В РЯДУ 3,5-ДИХЛОР- И N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ

Исаев С.Г., Свечникова Е.Н., Чикина Е.Л., Жегунова Г.П.

Национальный фармацевтический Университет, Харьков

Исследование количественных соотношений структура биологическая активность проводилось методом Ханта, устанавливающим влияние физико-химических параметров молекулы N-фенилантраниловых кислот(N-ФАК) на его биологический эффект. В качестве физико-химических параметров использовались константы ионизации, определяющие кислотно-основные свойства фармакофоров и коэффициенты их распределения в системе октанол-вода. Впервые получены корреляционные уравнения связи противовоспалительной, анальгетической, диуретической активности N-ФАК с кислотными и транспортными свойствами молекул, что создает научно-методическую основу для моделирования эффективных противовоспалительных, анальгетических и диуретических средств.

Производные N-фенилантраниловой кислот (N-ФАК) широко используются в медицинской практике как эффективные противовоспалительные, анальгетичнские, жаропонижающие средства[1,2]. Вещества этого ряда являются объектами поиска новых противовоспалительных и диуретических субстанций. Оптимизация этого процесса путем установления количественных соотношений "структура - терапевтический эффект" является альтернативным путем в сравнении с достаточно дорогими скрининговыми исследованиями и поэтому безусловно вызывает теоретический и практический интерес.

Одним из методов установления количественных соотношений "структура-активность" является метод Ханта [3], как наиболее разработанный и биофизически обоснованный. Данный метод основан на линейной зависимости свободной энергии процесса, который изучался по физико-химическим параметрам синтезированного вещества. Эти параметры являются независимыми и определяются свойствами молекул N-ФАК и зависят от ее электронной структуры, стерических особенностей и гидрофобности. Принимается, что взаимодействие субстанции с рецептором S осуществляется в две стадии:

I стадия–образование комплекса субстанции с рецептором DS с константою равновесия K_1:

$$D+S \underset{}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} DS \qquad (1)$$

II стадия– необратимое преобразование комплекса DS в продукт Q с константой скоростью K_2 :

$$DS \xrightarrow{K_2} Q \qquad (2)$$

следовательно скорость образования продукта: $\frac{d[Q]}{dt} = K_2[DS]$ (3)

Тогда константы равновесия реакции образования комплекса будут иметь вид: $K_1 = \frac{[DS]}{[D][S]} = e^{\frac{\Delta\sigma}{RT}}$ (4)

Из этих уравнений получаем: $Q_1 = K_2[D][S]e^{\frac{\Delta\sigma}{RT}}t$ Далее допускают что концентрация субстанции около рецептора [D] пропорциональна его количеству D_0, введенный в организм:

[D] =A D_0 (6),

где А- постоянная для данной субстанции, которая дает вероятность того ,что она достигнет рецептора.

Из уравнений 5 и 6 получаем:

$$Ln\left\{\frac{1}{D_0}\right\} = LnA - \frac{\Delta\sigma}{RT} + Ln[S] + Ln\frac{t}{Q} + LnK_2 \quad (7)$$

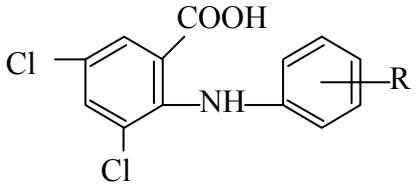
Как и D_0 можно рассмотреть любую применяемую характеристику биологического действия. Полученное уравнение 7 может быть использовано у соединений одного ряда. При этом понятно, что механизм их действия на организм одинаковый. Тогда $Lg[S]Ln\frac{t}{Q}LnK_2$ постоянные и уравнение 7 трансформируется: $Ln\left\{\frac{1}{D_0}\right\} = LnA - \frac{\Delta\sigma}{RT} + C$

где С константа

Чтобы связать величину с экспериментами, автором модели допускается, что субстанция достигает рецептора путем диффузии, проходя поочередно через водные и липидные фазы. А т.к. известно, что для соединений одного ряда существуют надежные линейные корреляции между логарифмами коэффициентов распределения у одинаковых растворителей [4], коэффициенты распределения в системе вода - октанол (стандартная система).

В качестве физико-химических параметров выбраны константы ионизации - pK_a (табл.1), которые отображают кислотно-основные свойства фармакофоров и коэффициенты их распределения ($\lg P$) в системе октанол - вода (табл.1). На величину первого параметра влияет электронная структура молекул, другой отображает возможность фармакофоров (субстанций) проходить сквозь биологические мембраны. Как меру ответа использовали логарифм индекса биологической активности($\lg БA$).

Таблица 1. Константы ионизации pK_a и коэффициенты распределения ($\lg P$) и биологическая активность 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот.



Соединение	R	Противовоспа-лительная активность (%) в дозе 20 мг/кг	Диуретическая активность (%)в дозе 50 мг/кг	pK_a	$\lg P$
1	H	12,4	130,2	5,32±0,03	5,02
2	2'-CH_3	0	131,4	5,45±0,02	5,50
3	3'-CH_3	21,4	106,4	5,38±0,04	5,64
4	4'-CH_3	35,9	153,6	5,45±0,05	5,58
5	2',4'-$(CH_3)_2$	7,7	218,0	5,57±0,05	6,06
6	3',4'-$(CH_3)_2$	20,3		5,50±0,05	6,20
7	2'-OCH_3	17,3	129,0	5,52±0,03	5,10
8	3'-OCH_3	10,9	190,3	5,24±0,07	5,18
9	4'-OCH_3	27,0		5,52±0,06	5,18
10	2'-Br	0		5,18±0,04	5,18
11	3'-Br	10,1		5,04±0,03	5,74
12	4'-Br	0		5,16±0,05	5,93
13	2'-Cl	14,0		5,17±0,02	5,92
14	3'-Cl	35,4		5,05±0,03	5,44
15	4'-Cl	13,4	203,1	5,16±0,04	5,77
16	2'-NO_2	35,6		4,77±0,06	5,74
17	3'-NO_2	8,1		4,81±0,04	5
18	4'-NO_2	0		4,76±0,02	4,82
19	4'-I	0	124,3	5,12±0,02	4,8
20	2'-Cl,4'-NO_2	15,6		4,20±0,05	6,03
21	2',4'-Cl,3'-NO_2	0		4,66±0,02	5,22

Создание оптимальной математической модели осуществлялось компьютерным методом включения переменных с использованием алгоритмов[5]. Выбор оптимальной модели проводился в результате анализа полученных статистических характеристик этих моделей.

Таблица 2. Корреляционные уравнения зависимости $LgП - f(pK_a, LgP)$ замещенных 3,5-дихлор-N- фенилантраниловой кислоты

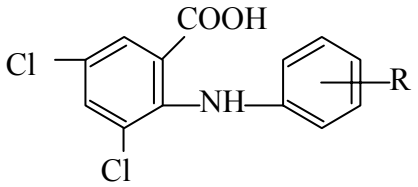
№	Корреляционные уравнения	n	R	S^2 заг.
1	$LgП$ =2,230-0.142 pK_a	14	0.24	1.38 10^{-2}
2	$LgП$ =2.523-0.190 $\lg P$	14	0.655	7.47 10^{-3}
3	$LgП$ =2.188-0.774 pK_a +0.732 $(pK_a)^2$	14	0.201	1.26 10^{-2}
4	$LgП$ =4.457-0.897 $\lg P$ +0.064($\lg P$)^2	14	0618	8.06 10^{-3}
5	$LgП$ =4.397-0.026 pK_a -0830 $\lg P$ +0,380 ($\lg P$)^2	14	0.914	4.93 10^{-3}
6	$LgП$ =1,568-0.51 pK_a +0.487 $(pK_a)^2$ -0.166 $\lg P$	14	0.635	9.23 10^{-3}
7	$LgП$ 3,950-0,279 pK_a -0.428 $\lg P$ +0.046 $\lg P$ pK_a	14	0.559	8.85 10^{-2}
8	$LgП$ =4.202+0.065 pK_a -0.845 $\lg P$ -0.017 $\lg P$ pK_a +0068 ($\lg P$)^2	14	0.483	1.00 10^{-2}
9	$LgП$ =2.188-0.774 $(pK_a)^2$ +0887 ($\lg P$)^2+1.289 $\lg P$ -0.273 $\lg P$ pK_a	14	0.627	7.99 10^{-3}

Взаимосвязь противовоспалительной активности замещенных 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот с их физико-химическими параметрами изучались на модели карагенинового отека. Ответ обозначен как $LgП$. Корреляционные уравнения зависимости $LgП - f(pK_a, LgP)$ приведены в табл.2. Данные этой таблицы свидетельствуют, что линейная корреляция $LgП$ и pK_a представлена уравнениями 1, имеет статистически незначительные характеристики, но величина остаточной дисперсии небольшая. Введение квадратичного члена $(pK_a)^2$ производит к ухудшению статистических характеристик. Корреляция противовоспалительной активности с параметром липофильности как линейная (уравнение 1) так и параболическая (уравнение 4) несмотря на то, что имеют улучшенные характеристики чем в уравнениях 1 и 3, но так же статистически не значима. Поэтому осуществлен анализ, который учитывает одновременное влияние обоих параметров (уравнение 5-9). Из полученных уравнений статистически достоверным является уравнение 5, как линейно относительно pK_a и квадратично относительно параметра липофильности ($\lg P$) .Увеличение кислотных свойств молекулы симбатно увеличивается противовоспалительная активность. Зависимость $LgП - f(LgP)$ проходит через максимум при $\lg P$=1,09, что ниже экспериментальных значений $\lg P$.Таким образом, экспериментальные значения противовоспалительной активности 3,5-дихлорзамещенных-N-фенилантраниловых кислот расположены на нисходящем участке квадратичной зависимости $LgП - f(LgP)$, т.е. увеличение липофильности приводит до уменьшения противовоспалительного эффекта.

Уравнение числовых значений параметров уравнения 5 показывает на возможность преобладающего влияния транспортных процессов фармакофоров.

Уравнение 5(табл.2) имеет высокую прогнозирующую способность, что подтверждается данными таблицы 3.

Таблица 3. Значение противовоспалительной активности 3,5-дихлорзамещенных-N-фенилантраниловых кислот рассчитанные по уравнению 5 и абсолютная ошибка этого расчета.



Соединение	R	$\lg П$	$\Delta \lg П = LgП_{експ} - LgП_{розр.}$
1	H	1.710	-0,003
3	3'-CH_3	1.360	-0,030
4	4'-CH_3	1.490	0,065
5	2',4'-$(CH_3)_2$	0.870	0,016
6	3',4'-$(CH_3)_2$	1.219	0,084
7	2'-OCH_3	1.340	-0,102
8	3'-OCH_3	0.973	0,064
9	4'-OCH_3	1.518	-0,087
11	3'-Br	1.000	0,004
13	2'-Cl	1.122	0,024
14	3'-Cl	1.533	0,016
15	4'-Cl	1.127	0,000
16	2'-NO_2	1.589	-0,038
17	3'-NO_2	1.024	0,116

Корреляционные уравнения связи диуретической активности 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот с их физико-химическими параметрами представлены в таблице 4. Данные этой таблицы свидетельствуют, что корреляция между $\lg D$ и pK_a (уравнение 1) имеет статистически незначительные характеристики(величина R невелика). Квадратичная зависимость $\lg D$ и pK_a (уравнение 4) имеет практически аналогичные статистические характеристики как и уравнение 1. Так же статистически незначительны характеристики линейной зависимости логарифма диуретической активности от коэффициентов распределения(уравнение 3). Введение квадратичного члена $(LgP)^2$ улучшает статистические характеристики, но не приводит до их статистической достоверности. Более сложные корреляционные уравнения 5-9, которые учитывают влияние обоих параметров, имеют улучшенные статистические характеристики. Анализ величин коэффициентов корреляции(R) свидетельствуют ,что оптимальным есть уравнение 5, которое описывает зависимость между $\lg D$ и кислотными свойствами соединениями pK_a и квадратичную зависимость между их липофильности. Соответственно уравнению 5, диуретическая активность 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот возрастает с увеличением их кислотности. Зависимость между $\lg D$ и $\lg P$ квадратичная и имеет точку экстремуму при $\lg P$ =2,3.

Увеличения липофильности ($\lg P$ >2,3) или ее уменьшения вызывает повышения мочегонной активности среди соединения исследованного изоструктурного ряда. Уравнение 5 имеет высокую прогностическую способность, что подтверждается данными таблицы 5.

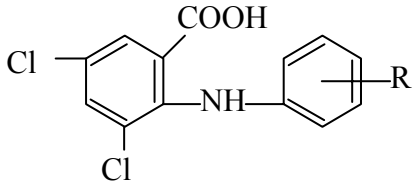
Таблица 4. Корреляционные уравнения зависимости $LgD - f(pK_a, LgP)$ 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот

№	Корреляционные уравнения	n	R	S^2 заг.
1	$LgП$ =2,186-0.002 pK_a	9	0.577	1.57 10^{-2}
2	$LgП$ =1.783-0.071 $\lg P$	9	0.507	1.48 10^{-2}
3	$LgП$ =6.784-2.461 pK_a +2.304 $(pK_a)^2$	9	0.568	1.56 10^{-2}
4	$LgП$ =5.418-1.247 $\lg P$ +0.019$(\lg P)^2$	9	0.689	1.74 10^{-2}
5	$LgП$ =5.324-0.017 pK_a -1.247 $\lg P$ +0,271 $(\lg P)^2$	9	0.918	1.18 10^{-2}
6	$LgП$ =7,405-2,690.51 pK_a +2,518$(pK_a)^2$ -0.016$\lg P$	9	0.806	1.45 10^{-2}
7	$LgП$ =3,712-6,585 pK_a -6,089$\lg P$ +1,148$\lg P$ pK_a	9	0.405	1.37 10^{-2}
8	$LgП$ =3,909+6,514 pK_a -6.877$\lg P$ -1,35$\lg P$ pK_a +0077 $(\lg P)^2$	9	0.730	1.41 10^{-2}
9	$LgП$ =1,739-5,542$(pK_a)^2$ +4,377$(\lg P)^{2-}$-.8,159 $\lg P$ +1,505 $\lg P$ pK_a	9	0.518	8.65 10^{-3}

Интересно отметить ,что рассчитанные нами уравнения 5 для 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот аналогично уравнению, которое приводится в литературе при исследование 4-сульфамоилзамещенных -N-фенилантраниловых кислот [6].

Создана математическая модель зависимости диуретического действия 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот от их физико-химических параметров позволяет осуществить компьютерный дизайн эффективных диуретических средств среди производных N-фенилантраниловых кислот .

Таблица 5. Значения диуретической активности 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот, вычисленных по уравнению 5 и абсолютная ошибка этого расчета



Соединение	R	$\lg П$	$\Delta \lg П = LgП_{експ} - LgП_{розр.}$
1	H	2,154	-0,039
2	2'-CH_3	2,159	-0,040
3	3'-CH_3	2,169	-0141
4	4'-CH_3	2,164	0,021
5	2',4'-$(CH_3)_2$	2,233	0,105
7	2'-OCH_3	2,154	-0,044
8	3'-OCH_3	2,147	0,131
15	4'-Cl	2,175	0,132
19	4'-I	2,220	-0,125

Выборочно для 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот была изучена гипогликемическая активность в дозе 50 мг/кг. Из 10 изученных соединений выраженное гипогликемическое действие имеют: 3,5-дихлор-N-(2'-хлор-4'-нитрофенил) антраниловая и 3,5-дихлор-N-(2',4'-дибром-6'-карбокифенил) антраниловая кислоты. Уровень активности соединений почти идентичен гликемии хлорпропамиду. Для 3,5-дихлор-N- (карбоксифенил) антраниловых кислот R=2'-COOH или R=4'-COOH характерна высокая антиоксидантная активность и средний уровень гепатопротекторного действия.

3,5-дихлор-N- (4'-карбоксифенил) антраниловая кислота проявляет комплексную фармакологическую активность: противовоспалительную, анальгетическую, репаративную и по классификации К.К. Сидорова относятся к практически нетоксичным веществам.

Экспериментальная часть. Синтез 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот проводили по методике [7],а биологический скрининг[8].

Вывод 1. С целью поиска биологически активных веществ 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот . Исследованы кислотно-основные свойства синтезированных веществ и проведена количественная оценка влияния заместителей на значения pK_a.

2.Изучен процесс распределения 3,5-дихлор-N-фенилантраниловых кислот в системе октанол-вода, определены коэффициенты распределения, показаны их аддитивность и полученные величины использованы для молекулярного дизайна биологически активных веществ в данных ряду производных.

Литература

1. Оптимізація пошуку ефективних лікарських засобів на основі N-фенілантраниловых кислот : Інформ. лист №193-03. Склали С.Г.Ісаєв, О.І.Павлій, І.А.Зупанець, Л.В. Брунь, О.І.Павлий-Київ,2003- Випуск №13 за проблемою "Фармація"-4с.
2. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства: В 2-х томах. Т.1. – 10-е изд. стер. – М.: Медицина, 1986. – 624 с.

3. *Hansch C., Leo A.* Substituted Constants for correlation analysis in chemistry and biology.-N.Y.: Wilty-InterSciehct, 1979.-340 p.
4. Calculation of hydrophobic constant from π and F constans/ Leo A , P.G.Gow.,C.Silipo, C.Hanch// L.Ved.Chem.-1975.-Vol.18,№6.-P.865-874.
5. *Львовский Е.Н.* Статистические методы построения эмперических формул.-М.:Высш.шк.,1988.-239с.
6. *Свєчнікова О.М.* Реакційна здатність, зв'язок структура-біологічна активність та використання похідних N-фенілантраніловщї кислоти та акридину:Дис…. д-ра хім.наук: 02.00.03-Харків,1999.-229.
7. *Исаєв С.Г.* Синтез, физико-химические и биологические свойства 3,5-дихлор-N-арилантраниловой кислоты// Фізіологічно активні речовини.-1999.-№1(27).-с.38-40.
8. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації).- За редакцією: член.-кор.АМН України О.В.Стефанова-К.:Авіцена,2001.-528с
9. Органические растворители. Физические свойства и методы очистки.-М.,1958.-С.211,216.
10. *Альберт А., Сержент Е.* Константы ионизации кислот и оснований. М.: Химия, 1964.-С.29.