

## НОВІ ПОХІДНІ 5-НІТРОУРАЦИЛУ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ У ФАРМАКОТЕРАПІЇ ГЛІОБЛАСТОМИ

**О.В. Вельчинська**

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ

Кафедра біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії (зав. - проф. І.В. Ніженковська)

### Реферат

**Мета.** Здійснено синтез нових моно- та біс-похідних 5-нітроурацилу з галогеновмісними фармакофорними групами  $-(CF_3)C=C(COOC_2H_5)_2$ ,  $=C=CBrCl$ ,  $-CF_2-CHBrCl$ ,  $-(HO)C=CBrCl$  у складі молекул, вивчено їх фізично-хімічні та біологічні властивості.

**Матеріал і методи.** Реакції проведено у системі розчинників: бензен-диметилформамід-діетиловий етер, в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-естером. Будову синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ- та ЯМР<sup>1</sup>H-спектрів. Досліджено токсичність та протипухлинну активність синтезованих сполук.

**Результати й обговорення.** Виявлено, що оригінальне біс-похідне 5-нітроурацилу має високу протипухлинну активність на злякисній гліобластомі людини (критерій активності більш, ніж 25%).

**Висновки.** Отримані результати дозволяють розглядати біс-похідне 5-нітроурацилу як фізіологічно активну сполуку із перспективою подальшого вивчення як потенційного протипухлинного засобу.

**Ключові слова:** 5-нітроурацил, фторотан, пухлини, токсичність, краун-естер

### Abstract

NEW DERIVATIVES OF 5-NITROURACILE AS POTENTIAL MEDICAL PREPARATIONS AT THE PHARMACOTHERAPY OF GLIOMA CANCER

O. V. WELCHINSKA

The O.O. Bohomolets National Medical University in Kiev

**Aim.** To report the synthesis, characterization, and physicochemical and biological properties of new mono- and bis-derivatives of 5-nitouracil with pharmacophoric groups  $-(CF_3)C=C(COOC_2H_5)_2$ ,  $=C=CBrCl$ ,  $-CF_2-CHBrCl$ ,  $-(HO)C=CBrCl$ .

**Methods.** Reactions were carried out with a system of solvents: benzene-dimethylformamide-ethyl ester under phase-transfer conditions with catalysis by the 18-crown-6-complex. The structure of synthesized compounds was confirmed by elemental analysis, IR-spectra, and NMR<sup>1</sup>H-spectra. The acute toxicity and antitumour activity of the synthesized compounds were evaluated.

**Results.** A potent antitumour effect (the criterion was  $\geq 25\%$ ) of the new bis-derivative of 5-nitouracil on heterotransplants of human glioma cancer was observed.

**Conclusions.** The results suggest that the bis-derivative of 5-nitouracil is a physiologically active compound that has

potential as an antitumour drug.

**Keywords:** 5-nitouracil, halothane, cancer, toxicity, crown-ether

### Вступ

Молекули 5(6)-фтор(галоген)заміщених урацилів та їх похідних здатні виконувати роль фтор(галоген) вмісних синтонів в органічному синтезі, тому їх активно використовують для створення оригінальних біологічно активних сполук [1-3, 7, 11]. Окрім того, введення фтор(галоген) вмісних фармакофорів у гетероциклічну молекулу призводить до підвищення розчинності сполук у ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспортування в організмі [4-6, 9, 12]. Зазначена увага до фторвмісних фрагментів у нових молекулах викликана також підсиленням антиметаболітних властивостей цих сполук. Взаємодія фторотану з основою супроводжується елімінуванням фтористого водню та генеруванням проміжного продукту 2-бром-1,1-дифтор-2-хлоретилену, який безпосередньо реагує із молекулами спиртів при каталізі основою. Ця реакція дозволяє виявити нову стратегію для синтезу селекційно поліфункціональних молекул, хімічна будова яких дозволяє подальше введення у молекулу нових фармакофорних фрагментів.

### Матеріал і методи

Сполуки (I-V) синтезовано на кафедрі біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, досліджено в Інституті фармакології та токсикології НАМН України. Сполуки (I-V) отримано шляхом взаємодії фторотану або I, 1-діетилкарбокси-2-хлоро-2-трифторометилетилену в якості фторвмісних синтонів із 5-нітроурацилом у молярному співвідношенні 1:2 та 1:1 у системі розчинників (бензен-диметилформамід (ДМФА) - діетиловий етер) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-естером (лужне сереовище). Проведені реакції є типовим прикладом реакцій заміщення за гетероатомом N<sub>(1)</sub> молекули ураци-

лу із використанням у якості другої компоненти реакції відомого інгаляційного анестетика фторотану. Варіювання умов проведення реакцій та внесення змін до методу синтезу, а саме: збільшення часу нагрівання та промивання залишку - осаду під час фільтрування у вакуумі сумішшю (сухий гексан-діетиловий етер, 1:1) або сухим ацетоном дозволили збільшити практичний вихід сполук (I-V) від 45% до 80%.

Індивідуальність синтезованих сполук (I-V) контролювали методами тонкошарової хроматографії (ТШХ) та газорідинної хроматографії (ГРХ), склад підтверджували даними елементного аналізу. ТШХ виконували на пластинках Silufol-254. ГРХ визначали на газорідинному хроматографі "Perkin Elmer" із ультрафіолетовим детектором (виробник "Perkin", Germany). Інфрачервоні (ІЧ) - спектри записували на спектрофотометрі UR-20 (виробник "Charles Ceise Hena", Germany). Спектри ядерно-магнітного резонансу (ЯМР<sup>1</sup>H) синтезованих сполук (I-V) записували на приладах "Bruker WP-200" (виробник "Bruker", Switzerland), "Varian T-60" (виробник "Varian", USA) із робочою частотою 200-132 МГц у виді розчинів ДМСО-D6 та CDCl<sub>3</sub> (внутрішні стандарти ТМС та ГМДС).

Хроматограми, ІЧ-, ЯМР<sup>1</sup>H-спектри кінцевих продуктів (I-V) ідентифікували у порівнянні із хроматограмами, ІЧ-, ЯМР<sup>1</sup>H-спектрами вихідних сполук. Дані елементного аналізу на С, N, F синтезованих сполук (I-V) відповідають обчисленим значенням.

Моно-похідні урацилів I-II отримують згідно до загальної процедури: N<sub>(1)</sub>-(1',1'-дифторо-2'-бромо-2'-хлороетил)-5-нітроурацил (I), N<sub>(1)</sub>-(2'-бромо-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-нітроурацил (II). Приготування розчину № 1. 0,44 г гідроксиду калію (0,0079 моль); 0,044 г дибензо-18-краун-6-естеру в 20 мл сухого бензену перемішують при температурі 60°C 15 хвилин до утворення на стінках хімічного реактору білого полімерного нальоту - калієвого комплексу із дибензо-18-краун-6-естером. Отриманий розчин охолоджують до кімнатної температури, додають до нього краплями розчин 1,57 г (0,84 мл; 0,0079 моль) фторотану в 20 мл сухого етеру. Приготування розчину № 2. 1,24 г (0,0079 моль) 5-нітроурацилу розчиняють у 40 мл сухого диметилформаміду при температурі 60°C в окремому хі-

мічному посуді. Гарячий розчин № 2 додають краплями через ділильну лійку до розчину № 1, перемішують при температурі 60-80°C 3 години, фільтрують у гарячому стані, охолоджують, відганяють розчинники. Залишок - осад промивають 30 мл суміші діетиловий етер - гексан (1:1), сушать у вакуумі водострумного насосу. Кристалічний осад блідо-жовтого забарвлення (I). Вихід 48%. Т пл. 269-271°C. Знайдено, %: N 12.44. C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>BrClF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Обчислено, %: N 12.55. ІЧ-спектр  $\gamma_{\max}$  (KBr), см<sup>-1</sup>: 550-690, 1370-1390, 1550-1580, 1710, 1750. ЯМР<sup>1</sup>H,  $\sigma$ : 5.65-5.68 (1H, J<sup>3</sup><sub>H,F</sub> 5.4 Гц, J<sup>2</sup><sub>H,Cl(Br)</sub> 0.8 Гц, CF<sub>2</sub>CHBrCl), 7.24 (1H, C<sub>(6)</sub>H), 10.57 (1H, N<sub>(3)</sub>H). Охолоджений фільтрат залишають стояти ніч, відганяють розчинники. Залишок (II) - масло кристалізують зі суміші діетиловий етер-гексан (1:1). Осад, що випав, сушать на повітрі. Вихід 12%. Т пл. 264-267°C. Знайдено, %: N 13.43. C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>BrClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>. Обчислено, %: N 13.46. ІЧ-спектр  $\gamma_{\max}$  (KBr), см<sup>-1</sup>: 550-690, 1370-1390, 1550-1580, 1710, 1750, 3200-3400. ЯМР<sup>1</sup>H,  $\sigma$ : 7.24 (1H, C<sub>(6)</sub>H), 10.57 (1H, N<sub>(3)</sub>H), 10.98 (1H, OH). N<sub>(1)</sub>, N<sub>(1)</sub>-(2"-бромо-2"-хлороетеніл)-біс-(5-нітроурацил)(III). Продукт отримують згідно до загальної процедури. Сполука III кристалічний порошок кремового забарвлення (56,5%). Т пл.: 290-295°C. Знайдено, %: N 18.59. C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>BrClN<sub>6</sub>O<sub>8</sub>. Обчислено, %: N 18.61. ІЧ-спектр  $\gamma_{\max}$  (KBr), см<sup>-1</sup>: 550-695, 1710, 1750. ЯМР<sup>1</sup>H,  $\sigma$ : 8.86 (2H, 2C<sub>(6)</sub>H), 10.22 (2H, 2N<sub>(3)</sub>H у H<sub>2</sub>O). 1,1-діетилкарбокси-2-трифторометил-2-хлороетилен (IV). Суміш 6,13 г натрію металічного (0,268 моль) у 250 мл безводного метанолу, 43,0 г діетилового естеру маленової кислоти (40 мл; 0,268 моль) та 62,0 г трифторооцтової кислоти (40 мл; 0,543 моль) нагрівають з перемішуванням при 60-80°C впродовж 6 годин. До отриманого продукту - склоподібної маси додають діетиловий етер. Випадає білий осад (продукт А). Суміш 8,0 г продукту А (0,0287 моль) у 55 мл сухого дихлороетану та 6,0 г фосфору пентахлориду (0,0287 моль) нагрівають із кипінням 5 годин. Залишок промивають дихлороетаном. Продукт IV - масло (80%). Т кип.: 56-59°C (25 мм рт. ст.), n<sup>25</sup><sub>D</sub> 1.3010. Знайдено, %: C 39.36; H 3.67; F 20.75. C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClF<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Обчислено, %: C 39.37; H 3.64; F 20.76. ІЧ-спектр  $\gamma_{\max}$  (KBr), см<sup>-1</sup>: 400, 415, 470, 560, 730, 905, 995, 1180, 1230, 1295, 1315, 1600, 1735, 2800-3000. ЯМР<sup>1</sup>H,  $\sigma$ : 1.19 (6H, J<sup>3</sup><sub>H,H</sub> 7.2 Гц, 2CH<sub>3</sub>), 4.10 (4H, J<sup>3</sup><sub>H,H</sub> 7.2 Гц,

2OCH<sub>2</sub>). 1,1- діетилкарбоксі-2-трифторометил-2-(5'-нітроуридин-N<sub>(1')</sub>-етилен (V). Суміш 2,26 г 5-нітроурацилу (0,014 моль) у 50 мл сухого ДМФА, 1,42 г безводного триетиламіну (2,5 мл; 0,014 моль) та 3,8 г продукту IV (0,014 моль) у 10 мл сухого ДМФА нагрівають при 60-70°C 6 годин, кип'ять впродовж 10 годин; фільтрують, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub> х HCl видаляють. Залишок - жовте масло промивають 10 мл гексану, 10 мл ацетону. Продукт V - порошок жовтого забарвлення (45%). Т. пл.: 156-159°C. Знайдено, %: N 10.55. C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>. Обчислено, %: N 10.63. ІЧ-спектр  $\gamma_{\max}$  (KBr), см<sup>-1</sup>: 400, 415, 470, 560, 600-800, 905, 995, 1180, 1230, 1295, 1050-1150, 1315, 1370, 1600, 1710, 1715, 3010-3080. ЯМР<sup>1</sup>H,  $\sigma$ : 1.00-1.35 (6H, J<sub>H,H</sub><sup>3</sup> 7.0 Гц, 2CH<sub>3</sub>), 3.73-4.31 (4H, J<sub>H,H</sub><sup>3</sup> 7.0 Гц, 2OCH<sub>2</sub>), 7.78 (1H, J<sub>H,H</sub><sup>2</sup> 10.0 Гц, C<sub>(6)</sub>H (Het)), 11.69 (1H, N<sub>(3)</sub>H (Het)).

Для визначення середньотоксичної дози ЛД<sub>50</sub> синтезованих сполук I-V використовували експрес-метод В.Б. Прозоровського [8]. Дослідження проводили на білих нелінійних мишах-самцях вагою 17,0±2,0 г віком 2-3 місяці; шлях введення - підшкірний. Вивчення протипухлинної активності здійснювали згідно рекомендацій Фармакологічного центру МОЗ України в онкофармакологічних експериментах із використанням пухлини головного мозку людини. Препарати вводили в дозах, які відповідали 1/4-1/5 ЛД<sub>50</sub>. Одержані результати опрацьовували статистично [10].

### Результати й обговорення

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану або 1,1-діетилкарбоксі-2-хлоро-2-трифторометилетилену в якості фторвмісних синтонів з 5-нітроурацилом у молярному співвідношенні 1:2 та 1:1 у системі розчинників (бензен-ДМФА-діетиловий етер) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-естером (лужне середовище) синтезовано нові моно- та біс-похідні I-V з фармакофорними групами - (CF<sub>3</sub>)C=C(COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, =C=CBrCl, -CF<sub>2</sub>-CHBrCl, -(HO)C=CBrCl (схема 1).

Визначення одного із головних фармакологічних індексів деяких із синтезованих гетероциклічних моно- та біс-похідних 5-нітроурацилу - гострої токсичності показало, що вони відносяться до малотоксичних: значення ЛД<sub>50</sub> їх коливаються в інтервалі від 262 мг/кг до 185 мг/кг. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук у літературі не описано, препаратами порівняння були відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил (5-ФУ). Препарат порівняння 5-ФУ відноситься до малотоксичних сполук і має середньотоксичну дозу 375 мг/кг [8]. При введенні підшкірно речовин I-III у піддослідних тварин ми спостерігали тонічні та клоніко-тонічні судоми впродовж 1-2 годин, блювання і після 3-5 годин - тремор (табл. 1).

Біс-похідне III досліджено нами в онкофармакологічних експериментах із використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) у підкапсульному тесті за методом Богдена. Маса гетеротрансплантату злякисної гліоми після дії біс-похідного III зменшилася від 2.68±0.102 мг до 1.85±0.102 мг, що відповідає за результатами морфологічного контролю 27.48% гальмування росту пухлини (критерій ≥25.0% гальмування росту клітин пухлини). Це у 1,1 рази більше, ніж % гальмування росту клітин пухлини стандартного критерію. При порівняльному гістологічному дослідженні клітинно-тканевих реакцій пухлини при лікуванні потенційним протипухлинним препаратом - біс-похідним III в умовах субклітинного тестування встановлено залежність між вираженими регресійними змінами пухлин та рівнем гальмування їх росту. Зазначений ефект вважається вираженим щодо подальшого вивчення біс-похідного III при пухлинах головного мозку.

### Висновки

1. Опрацьовано ефективний метод синтезу нових моно- та біс-похідних 5-нітроурацилу із фармакофорними групами -(CF<sub>3</sub>)C=C(COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, =C=CBrCl, -CF<sub>2</sub>-CHBrCl, -(HO)C=CBrCl в умовах

Таблиця 1

Параметри токсичності сполук I-III, порівняно із 5-ФУ

Продукт	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг
N <sub>(1)</sub> -(1',1'-дифторо-2'-бромо-2'-хлороетил)-5-нітроурацил (I)	185.00
N <sub>(1)</sub> -(2'-бромо-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-нітроурацил (II)	241.00
N <sub>(1)</sub> ,N <sub>(1')</sub> -(2''-бромо-2''-хлороетеніл)-біс-(5-нітроурацил) (III)	262.00
5-ФУ (контроль) [8]	375.00

**РЕАКЦІЇ В УМОВАХ МІЖФАЗНОГО КАТАЛІЗУ В ЛУЖНОМУ СЕРЕДОВИЩІ**

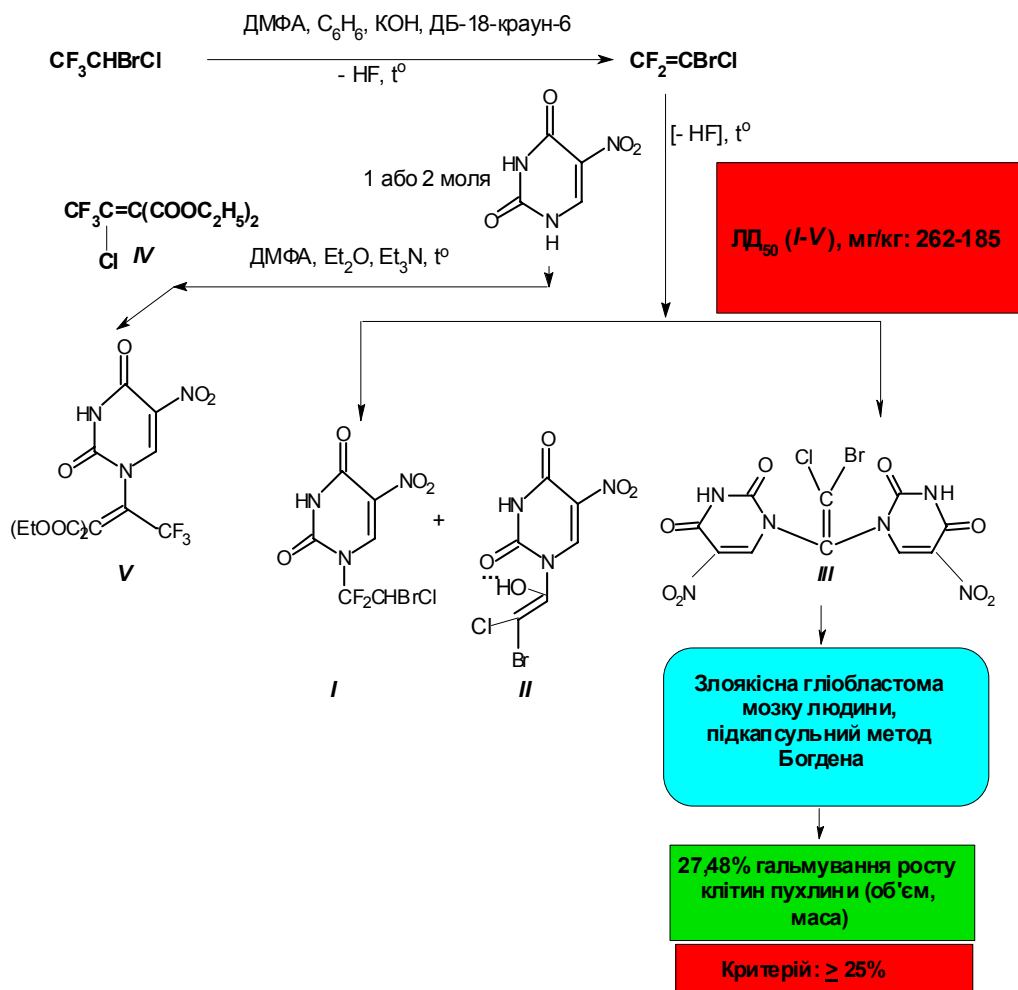


Схема 1

міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-естером.

2. Варіювання умов проведення реакцій та внесення змін до методів синтезу дозволили отримати синтезовані сполуки високої чистоти та збільшити їх практичний вихід до 80%.

3. Будову синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ-, ЯМР<sup>1</sup>H-спектроскопії, а індивідуальність - методами тонкошарової та газорідинної хроматографії.

4. Встановлено, що більшість із синтезованих сполук відносяться до малотоксичних сполук: значення їх LD<sub>50</sub> коливається в інтервалі від 262 мг/кг до 185 мг/кг.

5. Синтезовані похідні досліджено в онкофармакологічних експериментах із використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) у підкапсульному тесті за методом Богдена.

6. Встановлено, що маса гетеротрансплантату злоякісної гліоми після дії біс-похідного 5-нітро-

урацилу зменшується. Зазначений протипухлинний ефект вважається вираженим щодо подальшого вивчення біс-похідного 5-нітроурацилу при пухлинах головного мозку.

**Література**

1. Adjei A: A review of pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer. Clin Pharmacol 1999, 48, 265-277.
2. Barlow R. Introduction to the chemical pharmacology / R. Barlow. - Moscow.: Izdatelstvo inostrannoy literatury, 1959. - 107 p. Russian (Барлоу Р. Введение в химическую фармакологию / Р. Барлоу. - М.: Издательство иностранной литературы, 1959. - 107с.).
3. Herus I.I., Kolicheva M.T., Yaguposkij Yu.L., Kukhar V.P. 1-Alcoxy(aryloxy)-1,1-difluoro-2-chloro-2-bromoethans. Journal of organic chemistry 1989; 25: 2020-2021. Russian (Герус И.И., Кольчева М.Т., Ягупольский Ю.Л., Кухар В.П. 1-Алкокси (арилокси)-1,1-дифтор-2-хлор-2-бромэтань. Журнал органической химии 1989; 25: 2020-2021).
4. Isikava N., eds. Fluoro-compounds. Synthesis and using. - Moscow: Mir, 1990. - 265 p. Russian (Исикава Н., ред. Соединения фтора. Синтез и применение. - М.: Мир,

1990. - 265с.).
5. Longey DB, Harkin DP, Jonson PG: 5-fluorouracil - mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews. Cancer* 2003, 3, 330-338.
  6. Milano G, Chamorey AL: Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *Chronobiol Intern* 2002, 19(1), 177-189.
  7. Noordhuis P, Holwerda U: 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthetase inhibition human colorectal cancer. *Annals of oncol* 2004, 15, 1025-1032.
  8. Prozorovskij V.B., Prozorovskij V.P., Demchenko V.M. Express method of determination of the middle dose's effectivity and its mistakes. *Pharmacology and toxicology* 1978; 41(4): 407-509. Russian (Прозоровский В.Б., Prozorovskij V.П., Демченко В.М. Экспресс метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки. *Фармакология и токсикология* 1978; 41(4): 407-509).
  9. Radchenko O.A., Proshakova E.V., Il'chenko A.Ya. 2-Bromo-1,1-difluoro-2-chloroethylation of acetylenes alcohols. *Journal of organic chemistry* 1991; 27: 2231-2232. Russian (Радченко О.А., Прошаклова Е.В., Ильченко А.Я. 2-Бром-1,1-дифтор-2-хлорэтилирование ацетиленовых спиртов. *Журнал органической химии* 1991; 27: 2231-2232).
  10. Soph'ina Z.P., Syrkin A.B., Holdin A., Klyin A., eds. *Experimental marking of antitumour drugs in SSSR and USA. Moscow: Medicine, 1979. - 296 p. Russian (Софьина З.П., Сыркин А.Б., Голдин А., Кляйн А., редакторы. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. М.: Медицина, 1979.- 296 с.).*
  11. Welchinska O.V., Sharikina N.I., Kovalenko E.O. Finding of anticancer medical drugs by way of creation of new ant metabolites of pyrimidin's change - bis-derivatives of 5(6)-substituted uraciles and their molecular complexes with bacterial lectines. *Naukovy zapyski Ternopolskogo natsionalnogo pedagogichnogo universitetu imeny V. Hnatuka. Seria: biology* 2008; 1(35): 62-68. Ukrainian (Вельчинська О.В., Шарикіна Н.І., Коваленко Е.О. Пошук засобів лікування пухлинної хвороби шляхом створення нових антиметаболітів піримідинового обміну - біс-похідних 5(6)-заміщених урацилів та їх молекулярних комплексів з бактерійними лектинами. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер.: біологія* 2008; 1 (35): 62-68).
  12. Yagupolskij L.M. Aromatic and heterocyclic compounds with fluorocontaining substitutes/ L.M. Yagupolskij. - Kyiv.: Naukova dumka, 1988. - 105 p. Russian (Ягупольский Л.М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М. Ягупольский. - К.: Наукова думка, 1988. - 105 с.).