

ХІМІЧНІ МОДИФІКАЦІЇ І ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ N⁽¹⁾-(1',1'-ДИФЛУОРО-(1'-ГІДРОКСИ)-2'-БРОМО-2'-ХЛОРОЕТИЛ)-5-МЕТИЛУРАЦИЛІВ ТА 1,1-БІС-[5-МЕТИЛПІРИМІДИН-2',4'-ДІОН-1'-ІЛ]-2-БРОМО-2'-ХЛОРОЕТИЛЕНУ

© О. В. Вельчинська

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Резюме: за новим препаративним методом синтезу отримано та досліджено ряд потенційних преформованих аналогів піримідинів – моно- та біс-похідних 5-метилурацилу, в молекулах яких один або два гетероциклічних фрагменти пов'язані залишком молекули фторотану. Показано, що токсичність (LD₅₀) синтезованих сполук у 1,3–1,5 раза нижче, ніж у препарату порівняння 5-фторурацилу. Значення їх LD₅₀ знаходяться в межах від 515 до 479 мг/кг. Для синтезованого біс-похідного 5-метилурацилу виявлено протипухлинну активність відносно гетеротрансплантату гліоми людини (29,8 %).

Ключові слова: піримідин, 5-метилурацил, протипухлинна активність, токсичність, гліома людини.

Вступ. В арсеналі протипухлинних засобів значне місце займають лікарські засоби, діючою речовиною яких є гетероциклічні молекули, які використовують для лікування раку кишково-шлункового тракту та ін. [1–4]. Пошук, вивчення та клінічне використання таких сполук у клінічній практиці не втрачає своєї інтенсивності до сьогодні. Одним з перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби є створення нових антиметаболітів піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот та малих активних молекул. Наявність цих речовин в організмі людини і зумовила актуальність дослідження їхньої ролі у фізіології макроорганізму. Вивчається використання малих активних молекул для фармакопейних форм медичних біологічних препаратів з метою інгібіції пухлинного росту. Актуальність досліджень підтверджується чисельними роботами вітчизняної та світової літератури [5–7]. Пошуки шляхів елімінації пухлинних клітин із множинною лікарською стійкістю продовжуються. Розвивається сучасна концепція імунотерапії пухлин. Сучасні імунотерапевтичні агенти впливають як на пухлину, так і на різні регуляторні системи організму (в тому числі й на імунну систему) і призводять до протипухлинного ефекту. Останнім часом значно зросла кількість досліджень щодо синтезу нових похідних 5-фторурацилу та його хімічних аналогів, вивчення їхньої біологічної активності. Молекули 5-фтор(галоген)заміщених урацилів та їх похідних здатні виконувати роль фторо(галоген) вмісних синтонів в органічному синтезі, тому їх активно використовують для створення оригінальних біологічно активних молекул. При цьому зазначена увага

до фторомістких фрагментів у нових молекулах передбачає підсилення антиметаболітних властивостей сполук.

Метою нашої роботи було проведення хімічних модифікацій 5-метилурацилу за новими препаративними методами синтезу, вивчення хімічних властивостей 5-метилурацилу, дослідження параметрів токсичності та протипухлинної активності на гетеротрансплантатах гліоми мозку людини його нових похідних.

У зв'язку із цим були поставлені такі завдання: розробити препаративні методи синтезу нових моно- та біс-похідних 5-метилурацилу; синтезувати сполуки з високим практичним виходом; довести будову та склад синтезованих сполук за допомогою елементного аналізу і фізико-хімічних методів (ІЧ-, ¹H-ЯМР-спектроскопії); вивчити параметри гострої токсичності та протипухлинної активності найбільш перспективних молекул з використанням операційного та біопсійного матеріалу з пухлиною мозку людини.

Методи дослідження. Органічний синтез («тонкий органічний синтез»); фізико-хімічні: ІЧ-, ¹H-ЯМР-спектроскопія, ТШХ, ВЕРХ; токсикологічні, фармакологічні, статистичні методи дослідження. Об'єктами дослідження були нові моно- та біс-похідні, синтезовані на основі 5-метилурацилу та фторотану. Температури плавлення (Т. пл.) одержано на приладі фірми «Buchi» модель В-520. Елементний аналіз (С, Н, N, S) здійснювали на приладі Euro EA-3000 фірми EuroVector.

Аналітичну ТШХ проводили на шарі силікагелю на алюмінієвих платівках Silufol UV₂₅₄ (5 см × 15 см) «Kavalier» (Czech. Republic) у системі роз-

чинників: ацетонітрил–гексан 2:1. Газо-рідинну хроматографію проводили на газорідинному хроматографі «Perkin Elmer» з УФ-детектором («Perkin», Germany); умови вимірювання: колонка із нержавіючої сталі розміром 250x4,6 мм, із розміром часток 5 мкм; рухома фаза А: 0,1 % (об/об) розчин ортофосфорної кислоти; рухома фаза В: ацетонітрил; детектування за довжини хвилі 266 нм; температура колонки 40 °С; швидкість рухомої фази 1 мл/хв. При хроматографуванні за зазначених умов час утримування: 5–флуороурацилу – близько 4,7 хв; натрієвої солі дифенілфосфорної кислоти – близько 7,5 хв (точність ±2 %).

ІЧ-спектри вимірювали на спектрофотометрі UR-20 («Charles Ceise Hena», Germany) в таблетках KBr. Спектри ¹H-ЯМР синтезованих речовин записані на приладах «Bruker WP-200 SY» («Bruker», Switzerland), Varian T-60 («Varian», USA) з робочою частотою 132-200 МГц у ДМСО-d₆, CDBr₃, CDCl₃, CF₃COOH, D₂O, внутрішній стандарт – ТМС або ГМДС.

Розчинники – марки «ч» або «хч» одержували з комерційних джерел, для їх очистки проводили такі процедури: для ацетонітрилу – перегонка над P₂O₅; діетиловий естер – над металевим натрієм; ДМФА, ДМСО, бензол, піридин, дихлоретан, хлороформ – перегонка при пониженому тиску, інші очищено простою перегонкою.

Основні серії експериментальних досліджень проведено на дорослих білих нелінійних мишах-самцях (маса тіла (17,0±2,0) г та (22,0±2,0) г) та щурах-самцях (маса тіла (160,0±20,0) г), яких утримували у віварії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Утримання та досліди на тваринах проводили відповідно до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Кров та пухлина піддослідного щура-пухлинноносія були відібрані через 30 хв після введення сполук в терапевтичній дозі [8, 9]. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук в літературі не описано, препаратом порівняння обрано відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил (5-ФУ). Статистичну обробку проводили за В. Б. Прозоровським та ін. [9].

1,1-Біс-[5'-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бromo-2'-хлороетилен (I) синтезують із 0.87 г (0.0044 моль) фторотану та 1.11 г (0.0088 моль) 5-метилурацилу при перемішуванні реакційної суміші при температурі 80–90 °С протягом 6 годин. Синтезована сполука – кристалічний порошок жовтого забарвлення, нестійкий до дії гарячого органічного розчинника; при перекристалізації гідролізує з утворенням вихідного урацилу. Т пл. 286 – 289 °С, вихід 43 % (1.05 г).

N⁽¹⁾-(1',1'-дифлуоро-2'-бromo-2'-хлороетил)-5-метилурацил (II) та N⁽¹⁾-(2'-бromo-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-метилурацил (III). Приготування розчину № 1 проводять на основі 0.44 г (0.0079 моль) калій гідроксиду, 0.044 г ДБ-18-краун-6 в 20 мл сухого бензену та розчину 1.57 г (0.84 мл, 0.0079 моль) фторотану в 20 мл сухого етеру. Приготування розчину № 2: 1.0 г (0.007 моль) 5-метилурацилу розчиняють в 40 мл сухого ДМФА при температурі 60 °С в окремому хімічному посуді. Гарячий розчин № 2 додають краплями через ділильну лійку до розчину № 1, перемішують при температурі 60–80 °С 5 годин (реакційна суміш мутніла та при нагріванні ставала червоно-коричневою), фільтрують у гарячому стані, охолоджують, відганяють простою перегонкою розчинники. Залишок – осад промивають 30 мл суміші діетиловий етер – гексан (1:1), сушать у вакуумі водострумного насосу. Кристалічний осад кремового забарвлення (II). Т пл. 277–280 °С, вихід 32 % (0.76 г). Охолоджений фільтрат залишають стояти на ніч, відганяють розчинники. Залишок – масло кристалізують із суміші діетиловий етер–гексан (1:1). Осад, що випадав, сушать на повітрі (III). Т пл. 272–276 °С, вихід 25 % (0.27г).

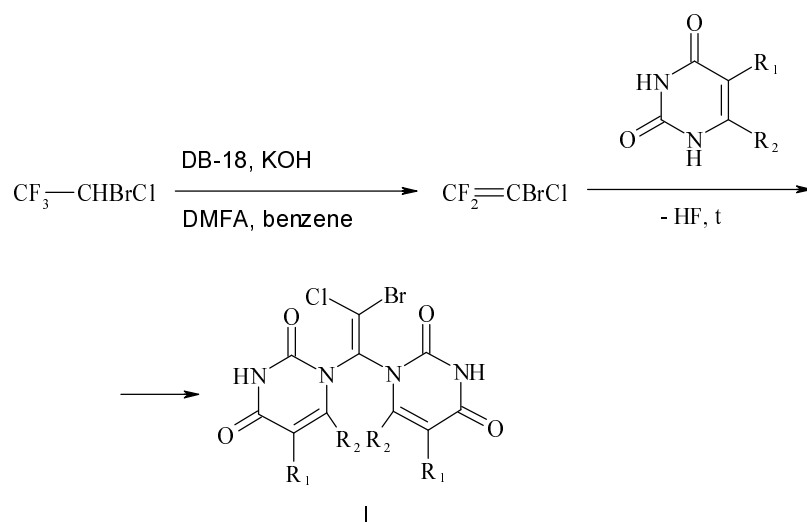
Результати й обговорення. За новим, розробленим та успішно впровадженим нами методом синтезу, взаємодією 5-метилурацилу та фторотану в умовах міжфазного каталізу ДБ-18-краун-6 у лужному середовищі, в системі розчинників (ДМФА–бензен–діетиловий етер) синтезовано сполуки I–III (схеми 1, 2).

Зазначена реакція проходить по атому Гідрогену при N⁽¹⁾ і в результаті утворюються два типи продуктів: заміщений N⁽¹⁾-(1',1'-дифлуоро-2'-бromo-2'-хлороетил)урацил II – продукт реакції приєднання-відщеплення по атому Гідрогену, та відповідне гідроксипохідне III – як продукт подальших перетворень за участю 1',1'-дифлуоро-2'-бromo-2'-хлороетильного фрагмента (реакції дегідрофторування і заміщення атому флуору на гідроксильну групу).

Сполука II при гідролізі дає позитивний тест з аргентум нітратом (на присутність хлорид- та бромід-іонів) та позитивний тест на присутність флуорид-іонів. Наявність кратного зв'язку підтверджено реакцією знебарвлення бромної води.

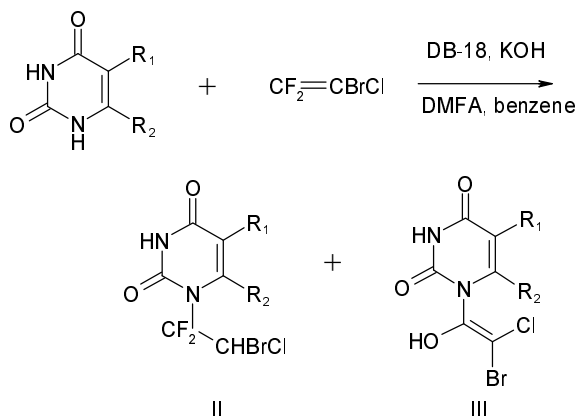
В ІЧ-спектрах сполуки I ідентифіковано сигнали валентних коливань зв'язків C–Hal при 515, 615, 550–695 см⁻¹ інтенсивні сигнали карбонільних груп νC=O при 1710, 1750 см⁻¹, валентні коливання аліфатичних зв'язків C–H при 2800, 3000 см⁻¹. Співвідношення інтегральних інтенсивностей сигналів в ¹H-ЯМР-спектрах сполуки I підтверджує відсутність протонів при атомі

Схема 1



де $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$ (I)

Схема 2



де $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$ (II, III)

$N^{(1)}$ молекул урацилу та наявність протонів в положенні $-C^{(6)}H$ фрагменту урацилу в області δ 7.22–8.86 м.д., та протонів в положенні $N^{(3)}H$ гетероциклічних ядер при δ 4.04–10.70 м.ч., які частково знаходяться в дейтерообміні. Співвідношення інтегральних інтенсивностей сигналів в 1H -ЯМР-спектрах речовин II, III підтверджує відсутність протонів при атомі $N^{(1)}$ молекули урацилу при 11.00–11.25 м.ч., а також наявність протонів в положенні $C^{(6)}H$ гетероциклічного ядра при 7.22–7.36 м.ч., і протонів в положенні $N^{(3)}$ гетероциклічного ядра при 10.56–10.80 м.ч. Сигнал протону групи $BrClCH-CF_2-$ в молеку-

лах сполуки II, який теоретично повинен проявлятися у виді квартету дублетів при 5.80 м.ч., не спостерігається, оскільки заміщується на дейтерій. Дані елементного аналізу на N синтезованих сполук I–III відповідають обчисленим значенням (табл.1).

Віднесення сигналів в ^{13}C - та 1H -ЯМР-спектрах сполук I–III наведено в таблиці 2.

Під час проведення біологічних досліджень нами було відібрано серед синтезованих сполук найбільш перспективні та близькі за хімічною будовою до препарату порівняння 5-ФУ. Слід зазначити, що в молекулах цих сполук гетеро-

Таблиця 1. Дані елементного аналізу, Т. пл., бруто-формула, практичний вихід сполук I–III

Сполука	Вихід, %	Т. пл., °C	Знайд., N, %	Бруто-формула, М.м.	Вирах., N, %
I	43	286–289	14.32	$C_{12}H_{10}BrClN_4O_4$, 389.59	14.38
II	32	277–280	9.20	$C_7H_6BrClF_2N_2O_2$, 303.49	9.23
III	25	272–276	9.90	$C_7H_6BrClN_2O_3$, 281.49	10.00

Таблиця 2. Спектральні характеристики сполук I–III

Сполуки	Дані ІЧ-спектрів: KBr, см ⁻¹	Дані спектрів ¹ H-ЯМР: ДМСО-d ₆ , TMS, δ, м.ч., J, Гц
I	515, 550, 690, 850 (C–C1, C–Br); 1710, 1750 (C=O); 2800–3000 (CH)	1.71 (6H, д., J ² _{H,H} =5.0 Гц, 2CH ₃); 7.23 (2H, д., J ² _{H,H} =5.0 Гц, 2C ₍₆₎ H); 10.71(2H, уш. с., 2N ₍₃₎ H)
II	550–690 (C–Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820–3000 (–CH ₃)	1.714 (3H, с., –CH ₃); 5.76–5.78 (1H, кв.д., J ³ _{H,F} =5.4 Гц, J ² _{H,Cl(Br)} =0.8 Гц, CF ₂ CHBrCl); 7.22 (H, с., –C ₍₆₎ H); 10.58 (1H, с., N ₍₃₎ H)
III	550–690 (C–Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820–3000 (CH ₃); 3200–3400 (OH)	1.73 (3H, с., CH ₃); 7.25 (1H, с., C ₍₆₎ H); 10.62 (1H, с., N ₍₃₎ H); 11.03 (1H, с., OH)

циклічні фрагменти пов'язані залишком молекули загального анестетика фторотану, який широко використовується в хірургічній онкологічній практиці [10]. Дослідження гострої токсичності сполук I–III показало, що монопохідні II, III та біс-похідне I менш токсичні (у 1,27–1,515 раза), ніж 5-ФУ. Значення їх ЛД₅₀ знаходяться в межах від 515 мг/кг до 479 мг/кг (табл. 3).

контролю. При порівняльному гістологічному дослідженні клітинно-тканинних реакцій пухлини при лікуванні потенційною протипухлинною сполукою – біс-похідним I в умовах субклітинного тестування встановлено залежність між вираженими регресивними змінами пухлин та рівнем гальмування їх росту. Зазначений ефект вважається вираженим щодо подальшого ви-

Таблиця 3. Параметри токсичності сполук I–III порівняно з 5-ФУ

Сполука	ЛД ₅₀ , мг/кг
1,1-Біс-[5'-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бромо-2'-хлороетилен (I)	515
N ⁽¹⁾ -(1',1'-дифлуоро-2'-бромо-2'-хлороетил)-5-метилурацил (II)	485
N ⁽¹⁾ -(2'-бромо-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-метилурацил (III)	479
5-ФУ (препарат порівняння)	375

Протипухлинна дія синтезованих сполук I–III досліджена в експериментах з використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана. При лікуванні гліобластоми людини критерієм значущості був відсоток гальмування росту гетеротрансплантату гліоми людини понад 25 %. Виявлено, що протипухлинна активність біс-похідного I значно перевищує прийнятий критерій. Маса гетеротрансплантату злоякісної гліоми після дії біс-похідного I зменшилася до (1,85±0,091) мг, що відповідає за результатами морфологічного контролю 29,8 % гальмування росту пухлини. Це в 1,2 раза більше прийнятого критерію активності при лікуванні гліобластоми, що підтверджено при проведенні морфологічного

вчення біс-похідного 5-метилурацилу I при пухлинах головного мозку.

Висновки. 1. З метою отримання ефективних протипухлинних препаратів розроблено та успішно впроваджено метод синтезу нових похідних 5-метилурацилу та фторотану в умовах міжфазного каталізу ДБ-18-краун-6 у лужному середовищі.

2. Встановлено, синтезовані сполуки належать до малотоксичних речовин (ЛД₅₀ від 515 до 479 мг/кг) та є менш токсичними за препарат порівняння 5-ФУ (у 1,3–1,5 раза).

3. Виявлено, що біс-похідне 5-метилурацилу має протипухлинну дію відносно гетеротрансплантату гліоми людини – 29,8 %, що у 1,2 раза більше прийнятого критерію активності при лікуванні гліобластоми 25 %.

Література

1. Adjei A. A. Review of pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer / A. A. Adjei // *Clinical Pharmacology*. – 1999. – Vol. 48. – P. 265–277.
2. Anderson N. Controversial issues in 5-fluorouracil infusion use. Dose intensity, treatment duration, and cost comparisons / N. Anderson, J. Lokich // *Cancer*. – 1992. – Vol. 70. – P. 998–1002.
3. Pharmacokinetics of ftorafur after intravenous and oral administration / M. I. Anttila, E. A. Sotaniemi,

- M. I. Kairaluoma [et al.] // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 1983. – Vol. 10. – P. 150–153.
4. State of the treatment for gastrointestinal cancer / H. Baba, S. Kohnoe, K. Endo [et al.] // *Gan To Kagaku Ryoho*. – 2000. – Vol. 27. – P. 1233–1246.
5. Клецкий М. Е. Структура и реакционная способность производных урацила / М. Е. Клецкий, Е. Б. Цупак, Д. А. Назаров // *ХГС*. – 2002. – № 8. – С. 1106–1108.
6. Noordhuis P. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthetase inhibition human

colorectal cancer / P. Noordhuis, U. Holwerda // *Annals of Oncol.* – 2004. – Vol. 15. – P. 1025–1032.

7. Longley D. B. Mechanisms of action of 5-fluorouracil / D. B. Longley, D. P. Harkin // *Nature Rev. Cancer.* – 2004. – Vol.4. – P. 230–238.

8. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / [под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина, А. Голдина, А. Кляйна]. – М. : Меди-

цина, 1979. – 296 с.

9. Прозоровский В. Б. Экспресс метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки / В. Б. Прозоровский, В. П. Прозоровский, В. М. Демченко // *Фармакол. и токсикол.* – 1978. – Т. 41, № 4. – С. 407–509.

10. Brown V. R. Biotransformation and hepatotoxicity of halothane / V. R. Brown, I. G. Sipes // *Biochem. Pharmacol.* – 1977. – Vol. 26. – P. 2091–2094.

ХИМИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ N⁽¹⁾-(1',1'-ДИФЛУОРО-(1'-ГИДРОКСИ)-2'-БРОМО-2'-ХЛОРОЭТИЛ)-5-МЕТИЛУРАЦИЛОВ И 1,1-БИС-[5-МЕТИЛПИРИМИДИН-2',4'-ДИОН-1'-ИЛ]-2-БРОМО-2'-ХЛОРОЭТИЛЕНА

Е. В. Вельчинская

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца

Резюме: с помощью нового препаративного метода синтеза получен и исследован ряд потенциальных преформированных пиримидинов – моно- и бис-производные 5-метилурацила, в молекулах которых один или два гетероциклических фрагмента связаны с остатком молекулы фторотана. Показано, что токсичность (ЛД₅₀) синтезированных соединений в 1,3-1,5 раза ниже, чем у препарата сравнения 5-фторурацила. Значения их ЛД₅₀ находятся в пределах от 515 до 479 мг/кг. Для синтезированного бис-производного 5-метилурацила обнаружена противоопухолевая активность относительно гетеротрансплантата глиомы человека (29,8 %).

Ключевые слова: пиримидин, 5-метилурацил, противоопухолевая активность, токсичность, глиома человека.

CHEMICAL MODIFICATIONS AND ANTITUMOUR ACTIVITY OF N⁽¹⁾-(1',1'-DIFLUORO-(1'-HYDROXY)-2'-BROMO-2'-CHLOROETHYL)-5-METHYLURACILES AND 1,1-BIS-[5-METHYLPIRIMIDINE-2',4'-DIONO-1'-IL]-2-BROMO-2'-CHLOROETHYLENE

О. V. Velchinska

National Medical University by O. O. Bohomolets

Summary: a series of potential preformed pyrimidines – mono- and bis-derivatives of 5-methyluracile, which molecules contains one or two heterocyclic's fragments, which connected by the remainder of molecule of halothane, synthesized by the new preparation method of synthesis and investigated. It was showed the toxicity (LD₅₀) of compounds, which synthesized, is in 1.3–1.5 times a lower then one of preparation of comparing 5-fluorouracile. Data of its LD₅₀ are at the limit from 515 to 479 mg/kg. It was discovered that the bis-derivative of 5-methyluracile has antitumour action on the geterotransplantate of human gliome (29.8 %).

Key words: pyrimidine, 5-methyluracile, antitumour activity, toxicity, human gliome.

Отримано 26.08.14