

О.В. Вельчинська², Н.І. Шарикіна¹, В.В. Вільчинська²

ПОШУК НОВИХ АНТИМЕТАБОЛІТІВ ПРИМІДИНОВОГО ОБМІНУ СЕРЕД БІС-ПОХІДНИХ 5(6)-ЗАМІЩЕНИХ УРАЦИЛІВ

¹ Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ,

² Інститут фармакології та токсикології АМН України, м. Київ

Ключові слова: 5-фторурацил, фторотан, пухлини, краун-ефір, каталіз.

Ключевые слова: 5-фторурацил, фторотан, опухоли, краун-эфир, катализ.

Key words: 5-fluorouracile, fluorotan, cancer, crown-ether, catalyze.

Описано новий препаративний метод синтезу гетероциклічних біс-аддуктів 5(6)-заміщених урацилів з фторотаном при каталізі 18-краун-6-комплексом. Будову синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ-, ЯМР¹H-спектроскопії, а індивідуальність – методами тонкошарової та газорідної хроматографії. Встановлено, що синтезовані сполуки належать до малотоксичних: ЛД₅₀ їх коливає від 515 мг/кг до 125 мг/кг. Виявлено високий протипухлинний ефект біс-аддукту 5-фторурацилу: гальмування росту пухлини Лімфосаркоми Пліса сягало 75,3%.

Описан новый препаративный метод синтеза гетероциклических бис-аддуктов 5(6)-замещенных урацилов с фторотаном при катализе 18-краун-6-комплексом. Строение синтезированных соединений подтверждено данными элементного анализа, УФ-, ИК-, ЯМР¹H-спектроскопии, а индивидуальность – методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии. Установлено, что синтезированные соединения относятся к малотоксичным: ЛД₅₀ их колеблется от 515 мг/кг до 125 мг/кг. Высокий противоопухолевый эффект зарегистрирован для бис-аддукта 5-фторурацила: торможение роста опухоли Лимфосаркомы Плисса достигало 75,3%.

A new convenient synthesis method of heterocyclic bis-adducts of 5(6)-substituted uraciles with fluorotan with 18-crown-6-complex as catalyst was described. The structure of synthesized compounds has been confirmed by data of elemental analysis, UV-, IR- and NMR¹H-spectra. The purity has been tested by method of thin-layer and gas-liquid chromatography. It was discovered that compounds, which were synthesized apply to low toxic preparations: LD₅₀ makes from 515 mg/kg to 125 mg/kg. High antitumour effect of bis-adduct of 5-fluorouracile has been discovered: growth relaxation of Lymphosarcoma Plissa tumour mass was 75,3%.

Одним з перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби є створення нових антиметаболітів пуринового та піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот та малих активних молекул [1]. Актуальність досліджень підтверджується численними роботами вітчизняної та світової літератури [2,3]. Відомо, що пухлини використовують молекули урацилу активніше, ніж нормальні клітини. Оскільки ван-дер-ваальсові радіуси водню та фтору близькі, можна очікувати, що 5-фторурацил або його похідні будуть виконувати роль субстрату та/або інгібітору ферментів і переважно поглинатися тканинами пухлини.

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 молекул. Крім того, введення фтор(галоген) вмісних фармакофорів в гетероциклічну молекулу призводить до підвищення розчинності сполук в ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспортування в організмі [4]. Зазначена увага до фторвмісних фрагментів в нових молекулах викликана також підсиленням антиметаболітних властивостей цих сполук.

Описано метод введення до аліфатичного ланцюгу або ароматичного кільця фармакофорної групи -CF₂CHBrCl при використанні доступного реагенту та лікарського засобу фторотану з метою синтезу біологічно активних сполук [5]. Взаємодія фторотану з основою супроводжується елімуванням фтористого водню та генеруванням проміжного про-

дукту 2-бром-1,1-дифтор-2-хлоретилену, який безпосередньо реагує з молекулами спиртів при каталізі основою. Ця реакція дозволяє виявити нову стратегію для синтезу селективно поліфункціональних молекул, хімічна будова яких дозволяє введення в молекулу нових фармакофорних фрагментів.

МЕТА РОБОТИ: полягає в означенні преформованих піримідинів, їх синтезі, вивченні хімічних та фізико-хімічних характеристик, вивченні їх біологічних властивостей, а саме гострої токсичності та протипухлинної дії.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Нові гетероциклічні біс-похідні, синтезовані на основі 5(6)-заміщених урацилів та фторотану. Абсолютні розчинники одержують наступним способом: ацетонітрил перегаляють над P₂O₅, діетиловий ефір – над металевим натрієм, диметилформамід та бензол – у вакуумі. Індивідуальність синтезованих сполук контролюють методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol-254 в системі ацетонітрил-гексан 2:1. ІЧ спектри записують на спектрофотометрі UR-20 (виробник «Charles Ceise Hena», Germany).

ГРХ проводять на газорідному хроматографі «Perkin Elmer» з УФ-детектором (виробник «Perkin», Germany). Спектри ¹H ЯМР записують на приладах «Bruker WP-200» (виробник «Bruker», Switzerland), «Varian T-60» (виробник «Varian», USA) з робочою частотою 200-132 МГц у DMSO-d₆ з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту.

*N*_{(1)'}*N*_{(1)'}-(2-бром-2-хлоретилен)-біс-(6-метилурацил)(I). Приготування розчину № 1. 0,25 г гідроксиду калію (0,0044 моль), 0,025 г дибензо-18-краун-6-ефіру в 20 мл сухого бензолу перемішують при температурі 60°C біля 15 хвилин до



утворення на стінках хімічного реактора білого полімерного нальоту, тобто утворення калієвого комплексу з дибензо-18-краун-6-ефіром. Отриманий розчин охолоджують до кімнатної температури, додають до нього краплями розчин 0,87 г (0,0044 моль) фторотану в 20 мл сухого ефіру.

Приготування розчину №2. 1,11 г (0,0088 моль) 6-метилурацилу розчиняють в 40 мл сухого диметилформаміду при температурі 60°C в окремому хімічному посуді. Гарячий розчин №2 додають краплями через ділильну лійку до розчину №1, перемішують при температурі 60–80°C 1 годину (реакційна суміш мутніє та при нагріванні стає червоно-коричневою), фільтрують у гарячому стані, охолоджують, відганяють простою перегонкою розчинники. Залишок – осад промивають 30 мл суміші діетиловий ефір – гексан (1:1) та сушать у вакуумі водострумного насосу.

Сполука **I** – кристалічний порошок жовтого забарвлення, нестійкий до дії гарячого органічного розчинника; при перекристалізації розкладається до вихідного урацилу. Вихід 1,85 г (43%). Т топл. 286–287°C. Знайдено, %: С 38,80; Н 3,2; N 14,8. $C_{12}H_{10}BrClN_4O_4$. Обчислено, %: С 37,1; Н 2,58; N 14,38. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 515, 550, 690, 850 (C–Cl, C–Br); 960–970 (trans–C=C); 1710, 1750 (C=O); 2800–3000 (CH_3). 1H ЯМР: 2.004 (6H, с., 2 CH_3), 5.313 (2H, с., 2 $C_{(5)}$ -H), 10.832 (2H, д., 2 $N_{(3)}$ H, J_{NH} 9.6 Гц).

Аналогічно синтезують сполуки: $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(5-метилурацил) (**II**) із 0,87 г (0,0044 моль) фторотану та 1.11 г (0,0088 моль) 5-метилурацилу, $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) (**III**) із 0,87 г (0,0044 моль) фторотану та 1,15 г (0,0088 моль) 5-фторурацилу, $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(5-бромуррацил) (**IV**) із 0,87 г (0,0044 моль) фторотану та 1,67 г (0,0088 моль) 5-бромуррацилу, $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(5-нітроурацил) (**V**) із 0,87 г (0,0044 моль) фторотану та 1,38 г (0,0088 моль) 5-нітроурацилу.

Сполука **II** – кристалічний порошок кремового забарвлення, кристалізується з суміші розчинників етанол-гексан (1:1). Вихід 1.58 г (36,8%). Т топл. з осмоленням 265–268°C. Знайдено, %: С 37,60; Н 3,08; N 14,53. $C_{12}H_{10}BrClN_4O_4$. Обчислено, %: С 37,1; Н 2,58; N 14,38. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 515, 615 (C–Hal), 1710, 1750 (C=O), 2800–3000 (CH_3). 1H ЯМР: 1.712 (6H, д., J_{NH} 5 Гц, 2 CH_3), 7.229 (2H, д., J_{NH} 5 Гц, 2 $C_{(6)}$ -H), 10,7 (2H, уш. с., 2 $N_{(3)}$ -H).

Сполука **III** – кристалічний порошок кремового забарвлення. Вихід 1.75 г (50%). Т топл. 238–240 °C. Знайдено, %: С 30,08; Н 1,15; N 13,78. $C_{10}H_4BrF_2ClN_4O_4$. Обчислено, %: С 30,21; Н 1,13; N 14,09. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 510, 550, 690 (C–Cl, C–Br); 1150, 1210 (C–F); 1735, 1750 (C=O). 1H ЯМР: 4.532 (2H, уш. с., 2 $N_{(3)}$ -H), 7.447 (2H, д., 2 $C_{(6)}$ -H).

Сполука **IV** – кристалічний порошок кремового забарвлення. Вихід 1,36 г (30%). Т топл. з осмоленням 270–275°C. Знайдено, %: С 22,8; Н 1,02; N 11,01; Br 45,96. $C_{10}H_4Br_3ClN_4O_4$. Обчислено, %: С 23,13; Н 0,77; N 10,78; Br 46,1. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 550–695 (C–Br), 1710, 1750 (C=O). 1H ЯМР: 4,048 (2H, с., 2 $N_{(3)}$ -H in H_2O), 7,66 (2H, с., 2 $C_{(6)}$ -H).

Сполука **V** – кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 2,24 г (56,5 %). Т топл. з осмоленням 290–295°C. Знайдено, %: С 26,67; Н 1,02; N 17,79. $C_{10}H_4BrClN_6O_8$. Обчислено, %: С 26,59; Н 0,89; N 18,60. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 550–690 (C–Hal), 1710, 1750 (C=O). 1H ЯМР: 8.861 (2H, с., 2 x $C_{(6)}$

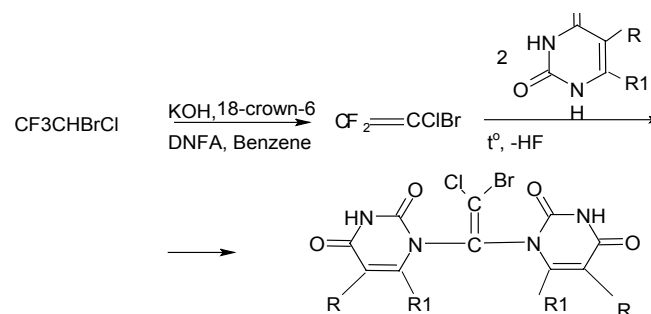
H), 10.226 (2H, с., 2 $N_{(3)}$ -H).

Для визначення середньотоксичної дози LD_{50} синтезованих сполук використовували експрес-метод В.Б. Прозоровського [6]. Дослідження проводили на білих нелінійних мишах-самцях вагою $22,0 \pm 2,0$ г; шлях введення – підшкірний.

Вивчення протипухлинної активності здійснювали згідно рекомендацій Фармакологічного центру МОЗ України на моделях експериментального пухлинного росту різного генезу. Препарати вводили в дозах, які відповідали 1/4–1/6 LD_{50} . Одержані результати оброблено статистично [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану у якості фторвмісного синтону та урацилів у молярному співвідношенні 1:2, в системі розчинників (бензол – диметилформамід – діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром в лужному середовищі синтезовано нові біс-похідні урацилів з фармакофорною групою $=C=CBrCl$, (**I–V**) (схема 1).



де, R = H, R1 = CH_3 (**I**); R = CH_3 , R1 = H (**II**); R = F, R1 = H (**III**); R = Br, R1 = H (**IV**); R = NO_2 , R1 = H (**V**)

Схема 1. Біс-похідні урацилів.

В ІЧ спектрах сполук (**I–V**) ідентифіковано сигнали зв'язків C–Hal при 510–1210 cm^{-1} , інтенсивні сигнали карбонільних груп C=O гетероциклічних фрагментів молекули при 1710, 1735, 1750 cm^{-1} , сигнали CH_3 -груп для сполук (**I, II**) при 2800–3000 cm^{-1} . Співвідношення інтегральних інтенсивностей сигналів в ЯМР 1H спектрах сполук (**I–V**) підтверджує відсутність протону при атомі $N_{(1)}$, які спостерігаються в молекулах вихідних урацилів при 11,00–11,25 м.д., а також наявність протонів в положеннях $C_{(5)}$ -H (**I**) та $C_{(6)}$ -H (**II–V**) гетероциклічних ядер при 5,313 м.д. та 7,229 – 8.861 м.д. відповідно, протонів в положенні $N_{(3)}$ -H гетероциклічних ядер при 4,048–10,832 м.д., які частково дейтеруються.

5-фторурацил з його властивостями в процесі метаболізму утворювати інтермедіати, що включаються до структури ДНК, РНК, гальмують активність тимідилатсинтетази, яка забезпечує синтез ДНК та РНК його попередниками, стоїть в центрі уваги пошуку нових сполук із зазначеною спрямованістю дії. Для подальших досліджень біологічних властивостей відібрано біс-похідні 5-метилурацилу (сполука **II**), 5-фторурацилу (сполука **III**) та 5-бромуррацилу (сполука **IV**), які за хімічною будовою та наявністю фармакофорних груп є найбільш близькими до відомого лікарського засобу – 5-фторурацилу. Практичний інтерес до

Таблиця 1

Параметри гострої токсичності гетероциклічних біс-похідних

№ п/п	Біс-похідне	ЛД ₅₀ , мг/кг
1.	Сполука II	515
2.	Сполука III	125
3.	Сполука IV	415
4.	5-фторурацил (контроль)	375

потенційних лікарських засобів зумовлений їх постійною дією на макроорганізм. Дослідження глибоких перетворень чутливих клітин під впливом цих речовин є важливим аспектом фармакології. Визначення одного з головних фармакологічних індексів гетероциклічних біс-похідних – гострої токсичності показало, що сполуки II та IV належать до малотоксичних: ЛД₅₀ їх дорівнює 515 мг/кг та 415 мг/кг, відповідно (табл. 1). Сполука III належить також до малотоксичних сполук, ЛД₅₀ її становить 125 мг/кг, що перевищує токсичність попередніх сполук у 4,12 та 3,32 рази, відповідно. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук в літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил. Препарат порівняння належить до малотоксичних сполук і має середньотоксичну дозу 375 мг/кг. При введенні вищевказаних хімічних речовин у дослідних тварин спостерігалися тонічні та клоніко-тонічні судоми впродовж 1 – 2 годин, блювота і після 3 – 5 годин – тремор.

Оцінка протипухлинної активності біс-похідних проводилася за показниками % гальмування росту пухлин на двох типах пухлинної хвороби: Лімфосаркомі Пліса та Саркомі 45. В якості контролю використовували, як і в досліді токсичності, 5-фторурацил, який виявляє активність при іноперабельній та рецидивній пухлині шлунку, товстої та прямої кишки, пухлин молочної та підшлункової залоз, яєчників [8]. Під час вивчення протипухлинної активності значний інтерес становило похідне загального анестетика фторотану та 5-фторурацилу (III). Згідно зауваженням клініцистів, фторотан є найбільш зручним лікарським засобом, який дає позитивні результати при операційних втручаннях у онкологічних хворих. Саме ця сполука N₍₁₎, N_(1')-(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) (III) була вивчена в онкофармакологічних експериментах. Для синтезованої сполуки III відмічено значну протипухлинну дію відносно Ліфосаркоми Пліса (75,3 %) та відсутність протипухлинної дії ефекту на Саркомі 45 (16,9 %). Одержані дані представлені в табл. 2.

Таким чином, висока протипухлинна активність синтезованих гетероциклічних біс-похідних дозволяє розглядати ці сполуки як потенційні лікарські протипухлинні засоби і відкриває нові перспективи для подальших робіт в цьому напрямку онкофармакології.

ВИСНОВКИ

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією

Відомості про авторів:

Вельчинська О.В., к. хім. н., доцент каф. біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії НМУ ім. О.О. Богомольця МОЗ України.
Шарикіна Н.І., д.мед.н., професор, зав. відділу онкофармакології Інституту фармакології та токсикології АМН України.
Вільчинська В.В., студентка 5 курсу фармацевтичного факультету НМУ ім. О.О. Богомольця МОЗ України.

Адрес для переписки:

Вельчинська Олена Василівна. Україна, м. Київ, 02068, вул. Анни Ахматової, 16 «Г», 14.
E-mail: elena_wvu@ukr.net. Тел.: 585-52-81, 234-80-11, 050 501-12-87

Таблиця 2

Протипухлинна активність сполуки III

Препарат	Доза, мг/кг	Середня маса пухлини, г		Гальмування росту пухлини, %
		контроль	дослід	
Лімфосаркома Пліса				
Сполука III	50,0	27,66	6,83	75,3*
5-фторурацил (контроль)				55,0**
Саркома 45				
Сполука III	30,0	62,7	52,12	16,9
5-фторурацил (контроль)				18,4**

Примітка: * –загибель однієї тварини у дослідній групі; ** – за [6]

фторотану у якості фторвмісного синтону та урацилів у молярному співвідношенні 1:2, в системі розчинників (бензол – диметилформамід - діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром в лужному середовищі синтезовано нові біс-похідні урацилів з фармакофорною групою =C=СВrCl.

Встановлено, що сполуки II та IV належать до малотоксичних: ЛД₅₀ їх дорівнює 515 мг/кг та 415 мг/кг відповідно. Сполука III відноситься також до малотоксичних сполук, ЛД₅₀ її становить 125 мг/кг, що перевищує токсичність попередніх сполук у 4,12 та 3,32 рази відповідно.

Для похідного загального анестетика фторотану та 5-фторурацилу (III) відмічено значну протипухлинну дію відносно Ліфосаркоми Пліса (75,3 %) та відсутність протипухлинної дії ефекту на Саркомі 45 (16,9 %).

ЛІТЕРАТУРА

- 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.
- Adjei A. A review of pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer / A. Adjei // Clin. Pharmacol. – 1999. – Vol. 48. – P. 265-277.
- Longley D.B. Mechanisms of action of 5-fluorouracil / D.B. Longley, D.P. Harkin // Nature Rev. Cancer. – 2004. – Vol. 4. – P. 230-238.
- Ягульський Л.М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М. Ягульський. – Киев: Наукова думка, 1988. – С. 90-105.
- Welchinska Hel.V. Biological activity of bacterial lectins and their molecular complexes with heterocyclic bis-adducts / Hel.V. Welchinska, B. Piecuszak, E.A. Kovalenko, N.I. Sharykina and al. // Мікробіол. журн. – 2003. – Т.65, №6. – С. 20-25.
- 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.
- Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / [под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Голдина, А. Кляйна]. – М.: Медицина, 1979. – 296 с.
- Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / [Под ред. Н.И. Переводчиковой, 2-ое изд. доп.]. – М.: Практическая медицина, 2005. – 704 с.