



О.В. Вельчинська

СИНТЕЗ І ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ МОНОПОХІДНИХ УРАЦИЛІВ З ПОТЕНЦІЙНОЮ ПРОТИПУХЛИННОЮ АКТИВНІСТЮ

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

Ключові слова: урацил, фторотан, каталіз, пухлина.

Ключевые слова: урацил, фторотан, катализ, опухоль.

Key words: uracile, fluorotan, catalysis, tumor.

Описано новий препаративний метод синтезу гетероциклічних монопохідних на основі урацилів і фторотану при каталізі 18-краун-6-комплексом. Будову і склад синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ-, ЯМР¹H-спектроскопії. Встановлено, що деякі з синтезованих сполук належать до малотоксичних – значення LD_{50} їх знаходяться в інтервалі від 485 мг/кг до 120 мг/кг. Близькість хімічної будови синтезованих сполук до будови протипухлинного препарату 5-фторурацилу, значення параметрів їх токсичності дозволяють розглядати названі сполуки як потенційні лікарські протипухлинні засоби.

Описан новый препаративный метод синтеза гетероциклических монопроизводных на основе урацилов и фторотана при катализе 18-краун-6-комплексом. Строение и состав синтезированных соединений подтверждено данными элементного анализа, ИК-, ЯМР¹H-спектроскопии. Установлено, что некоторые из синтезированных соединений относятся к малотоксичным – значения LD_{50} их находятся в интервале от 485 мг/кг до 120 мг/кг. Близость химического строения синтезированных соединений к строению противоопухолевого препарата 5-фторурацила, значения параметров их токсичности позволяют рассматривать данные соединения как потенциальные лекарственные противоопухолевые средства.

A new convenient method for the preparation of heterocyclic monoderivatives based on uraciles and fluorotan, with 18-crown-6-complex as catalyst was described. The structure and composition of synthesized compounds were confirmed by elemental analysis, IR- and ¹H NMR-spectra data. It was discovered that some of synthesized compounds applies to a little toxic preparations: value of their LD_{50} are from 485 mg/kg to 120 mg/kg. Similarity of chemical structure of the synthesized compounds and antitumour drug 5-fluorouracile, values of toxicity parameters permits to consider these compounds as potential medical antitumour substances.

Численні роботи вітчизняної та світової наукової літератури присвячені перспективним шляхам пошуку нових засобів лікування пухлинної хвороби [1–4]. Одним із таких шляхів залишається створення нових антиметаболітів піримідинового обміну, здатних впливати на структуру й функції нуклеїнових кислот, завдяки синтезу оригінальних біологічно активних сполук.

Раніше нами описано метод введення до аліфатичного ланцюга та ароматичного кільця фармакофорної групи $-CF_2CH_2BrCl$ при використанні доступного реагенту й лікарського засобу фторотану [5]. Названа реакція дозволяє виявити нову стратегію для синтезу селективно поліфункціональних і біологічно активних молекул, хімічна будова яких дозволяє введення в молекулу нових фармакофорних фрагментів.

МЕТА РОБОТИ

Означення преформованих піримідинів, їх синтез, вивчення фізико-хімічних властивостей та гострої токсичності, а саме після конструювання потенційно біологічно активних структур розроблено новий препаративний метод синтезу оригінальних монопохідних урацилів з використанням у синтезі відомого інгаляційного анестетика фторотану (2-бром-1,1,1-трифтор-2-хлоретану), які є перспективними для подальшого дослідження їх протипухлинної активності, оскільки близькі за хімічною будовою до протипухлинного препарату 5-фторурацилу та малотоксичні.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження стали монопохідні урацилів, що були синтезовані на основі урацилів і фторотану. Абсолютні розчинники одержують наступним способом:

ацетонітрил переганяють над P_2O_5 , діетиловий ефір – над металевим натрієм, диметилформамід і бензол – у вакуумі. Індивідуальність синтезованих сполук контролюють методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol-254 у системі ацетонітрил-гексан 2:1. ГРХ проводять на газорідному хроматографі «Perkin Elmer» з УФ-детектором (виробник «Perkin», Germany). ІЧ спектри записують на спектрофотометрі UR-20 (виробник «Charles Ceise Hena», Germany). Спектри ЯМР¹H записують на приладах «Bruker WP-200» (виробник «Bruker», Switzerland), «Varian T-60» (виробник «Varian», USA) з робочою частотою 200–132 МГц у $DMSO-d_6$ з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту.

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

Монопохідні урацилів **I–XII** отримують наступним чином: $N_{(1)}$ -(1', 1'-дифтор-2'-бром-2'- хлоретил)-урацил (**I**), $N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси-2'- хлоретил)-урацил (**VII**). Приготування розчину № 1. 0,5 г гідроксиду калію (0,0089 моль), 0,05 г дибензо-18-краун-6-ефіру в 20 мл сухого бензолу перемішують при температурі 60°C 15 хвилин до утворення на стінках хімічного реактору білого полімерного нальоту – калієвого комплексу з дибензо-18-краун-6-ефіром. Отриманий розчин охолоджують до кімнатної температури, додають до нього краплями розчин 1,76 г (0,94 мл, 0,0089 моль) фторотану в 20 мл сухого ефіру. Приготування розчину № 2 1 г (0,0089 моль) урацилу розчиняють у 40 мл



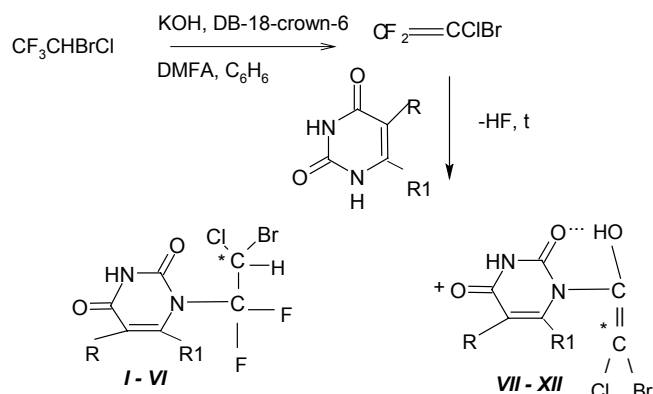
сухого диметилформаміду при температурі 60°C в окремому хімічному посуді. Гарячий розчин № 2 додають краплями через ділильну лійку до розчину № 1, перемішують при температурі 60–80°C 1 годину (реакційна суміш помутніла та набула червоно-коричневе забарвлення), фільтрують у гарячому стані, охолоджують, відганяють розчинники. Залишок – осад – промивають 30 мл суміші діетиловий ефір - гексан (1 : 1), сушать у вакуумі водострумного насосу. Кристалічний осад кремового забарвлення (I). Вихід 0,64 г (25 %). Т топл. 288–290 °С. Знайдено, %: С 25,0; Н 1,21; N 9,73; $C_6H_4BrClF_2N_2O_2$. Обчислено, %: С 24,89; Н 1,39; N 9,67. Охолоджений фільтрат залишають стояти ніч, відганяють розчинники. Залишок – масло – кристалізують із суміші діетиловий ефір–гексан (1:1). Осад, що випав, сушать на повітрі (VII). Вихід 0,47 г (20 %). Т топл. 280–283°C. Знайдено, %: С 27,0; Н 1,6; N 10,5; $C_6H_4BrClN_2O_3$. Обчислено, %: С 26,9; Н 1,5; N 10,5. Аналогічно синтезують сполуки: $N_{(1)}$ -(1', 1'-дифтор-2'-бром-2'- хлоретил)-5-метилурацил (II), $N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси-2'- хлоретеніл)-5-метилурацил (VIII) із 1,54 г (0,84 мл, 0,0079 моль) фторотану та 1 г (0,0079 моль) 5-метилурацилу; $N_{(1)}$ -(1', 1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-6-метилурацил (III), $N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси- 2'- хлоретеніл)-6-метилурацил (IX) із 1,57 г (0,84 мл, 0,0079 моль) фторотану та 1,0 г (0,0079 моль) 6-метилурацилу; $N_{(1)}$ -(1', 1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-5-фторурацил (IV), $N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси-2'-хлоретеніл)-5-фторурацил (X) із 1,57 г (0,84 мл, 0,0079 моль) фторотану та 1,03 г (0,0079 моль) 5-фторурацилу; $N_{(1)}$ -(1', 1'-дифтор-2'-бром-2'- хлоретил)-5-бромурацил (V), $N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси-2'- хлоретеніл)-5-бромурацил (XI) із 1,57 г (0,84 мл, 0,0079 моль) фторотану та 1,51 г (0,0079 моль) 5-бромурацилу; $N_{(1)}$ -(1', 1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-5-нітроурацил (VI), $N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси-2'-хлоретеніл)-5-нітроурацил (XII) із 1,57 г (0,84 мл, 0,0079 моль) фторотану та 1,24 г (0,0079 моль) 5-нітроурацилу. Сполука II – кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,76 г (32 %). Т топл. 277–280 °С. Знайдено, %: С 26,9; Н 1,88; N 9,19; Br 26,21. $C_7H_6BrClF_2N_2O_2$. Обчислено, %: С 27,7; Н 1,99; N 9,23; Br 26,32. Сполука VIII – кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,27 г (25 %). Т топл. 272–276°C. Знайдено, %: С 30; Н 2,2; N 9,9. $C_7H_6BrClN_2O_3$. Обчислено, %: С 29,9; Н 2,2; N 10. Сполука III – кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,73 г (31 %). Т топл. 280–283°C. Знайдено, %: С 27,5; Н 1,9; N 9,3; Br 26,25. $C_7H_6BrClF_2N_2O_2$. Обчислено, %: С 27,7; Н 1,99; N 9,23; Br 26,32. Сполука IX – кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,16 г (15 %). Т топл. 274–277°C. Знайдено, %: С 30,12; Н 2,08; N 9,87. $C_7H_6BrClN_2O_3$. Обчислено, %: С 29,9; Н 2,2; N 10,0. Сполука IV – кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 1,04 г (43 %). Т топл. 278–281° С. Знайдено, %: С 23,2; Н 0,89; N 9,08; Br 26,0. $C_6H_3BrClF_3N_2O_2$. Обчислено, %: С 23,4; Н 0,98; N 9,10; Br 25,99. Сполука X – кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,17 г (7,5 %). Т топл. 275–276°C. Знайдено, %: С 25,15; Н 1,1; N 9,77. $C_6H_3BrClF_2N_2O_3$. Обчислено, %: С 25,24; Н 1,05; N 9,81. Сполука

V- кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 1,22 г (42 %). Т топл. 282–285°C. Знайдено, %: С 19,24; Н 0,80; N 7,48. $C_6H_3Br_2ClF_2N_2O_2$. Обчислено, %: С 19,56; Н 0,82; N 7,60. Сполука XI – кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,28 г (10,5 %). (2.11). Т топл. 274–277°C. Знайдено, %: С 20,33; Н 0,89; N 7,88. $C_6H_3Br_2ClN_2O_3$. Обчислено, %: С 20,80; Н 0,87; N 8,08. Сполука VI – кристалічний осад жовтого кольору. Вихід 1,26 г (48 %). Т топл. 269–271°C. Знайдено, %: С 21,43; Н 0,88; N 12,34. $C_6H_3BrClF_2N_3O_4$. Обчислено, %: С 21,55; Н 0,90; N 12,55. Сполука XII – кристалічний осад жовтого забарвлення. Вихід 0,29 г (12 %). Т топл. 264–268°C. Знайдено, %: С 22,84; Н 0,86; N 13,38. $C_6H_3BrClN_3O_5$. Обчислено, %: С 23,09; Н 0,96; N 13,46.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану в якості фторвмісного синтону й урацилів у молярному співвідношенні 1:1, у системі розчинників (бензол – диметилформамід – діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром в лужному середовищі або, в іншому варіанті, в ДМСО при застосуванні прожарюваного поташу, синтезовано нові монопохідні урацилів I–XII з фармакофорними групами: $-(HO)C=CBBrCl$, $-CF_2-CHBrCl$ (схема 1).

Схема 1



де: R= R1 = H (I, VII); R= CH₃, R1 = H (II, VIII); R = H, R1= CH₃ (III, IX); R= F, R1 = H (IV, X); R= Br, R1 = H (V, XI); R= NO₂, R1 = H (VI, XII)

За допомогою методу ЯМР¹H-спектроскопії встановлено, що реакція проходить по атому водню при $N_{(1)}$ й утворюються два типи продуктів: $N_{(1)}$ -фтор(галоген)заміщені урацили I–VI та продукти їх гідролізу з подільшим, можливо, дегідрофторуванням, гідроксипохідні VII–XII, для кожного з яких характерна діастереотопність у результаті наявності в молекулах асиметричного атому вуглецю. Сполуки I–XII дають позитивний тест при гідролізі на присутність хлор- та бром-іонів – реакцію з нітратом срібла. Сполуки I–VI дають позитивний, а сполуки VII–XII – негативний тест на присутність фтор-іонів [7].

В ІЧ спектрах сполук VII–XII спостерігається інтенсивна смуга в області 3200–3400 см⁻¹, яка відповідає валентному коливанню ν_{OH} , а в ЯМР¹H спектрах цих сполук спостерігається синглет при 10,970–11,03 м.д., який належить до протону гідроксильної групи і зникає при розчиненні сполук в D₂O

Фізико-хімічні характеристики сполук I-XII

Сполука	ІЧ спектр (KBr), см ⁻¹	Спектр ЯМР ¹ H (DMCO-d ₆ TMC), δ, м.д.(J, Гц)
I	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O)	5,460 (H, д., J ³ _{H,H} 7.3 Гц, C ₍₅₎ H); 7,365 (H, д., J ³ _{H,H} 7.3 Гц, C ₍₆₎ H); 10,803 (H, с., 2 N ₍₃₎ H)
II	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820-3000 (CH ₃ -)	1,714 (3H, с., CH ₃ -); 7,219 (H, с., C ₍₆₎ H); 10,580 (H, с., 2 N ₍₃₎ H)
III	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820-3000 (CH ₃ -)	1,74 (3H, с., CH ₃ -); 7,26 (H, с., C ₍₅₎ H); 10,620 (H, с., 2 N ₍₃₎ H)
IV	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O)	7,229 (H, с., C ₍₆₎ H); 10,582 (H, с., N ₍₃₎ H)
V	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O)	7,228 (H, с., C ₍₆₎ H); 10,562 (H, с., N ₍₃₎ H)
VI	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 1370-1390 (ν ^s _{NO₂}); 1550-1580 (ν ^{as} _{NO₂})	7,238 (H, с., C ₍₆₎ H); 10,569 (H, с., N ₍₃₎ H)
VII	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 3200-3400 (OH)	5,460 (H, д., J ³ _{H,H} 7.3 Гц, C ₍₅₎ H); 7,365 (H, д., J ³ _{H,H} 7.3 Гц, C ₍₆₎ H); 10,81 (H, с., 2 N ₍₃₎ H); 10,994 (H, с., OH)
VIII	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820-3000 (CH ₃ -); 3200-3400 (OH)	1,74 (3H, с., CH ₃ -); 7,26 (H, с., C ₍₆₎ H); 10,62 (H, с., 2 N ₍₃₎ H); 11,03 (H, с., OH)
IX	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820-3000 (CH ₃ -); 3200-3400 (OH)	1,74 (3H, с., CH ₃ -); 7,26 (H, с., C ₍₆₎ H); 10,620 (H, с., 2 N ₍₃₎ H); 11,03 (H, с., OH)
X	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 3200-3400 (OH)	7,229 (H, с., C ₍₆₎ H); 10,582 (H, с., N ₍₃₎ H); 10,976 (H, с., OH)
XI	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 3200-3400 (OH)	7,228 (H, с., C ₍₆₎ H); 10,562 (H, с., N ₍₃₎ H); 10,970 (H, с., OH)
XII	550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 3200-3400 (OH); 1370-1390 (ν ^s _{NO₂}); 1550-1580 (ν ^{as} _{NO₂})	7,238 (H, с., C ₍₆₎ H); 10,569 (H, с., N ₍₃₎ H); 10,977 (H, с., OH)

[8]. В ІЧ спектрах синтезованих сполук I-XII ідентифіковано сигнали зв'язків C-Hal при 550–690 м⁻¹ інтенсивні сигнали карбонільних груп C=O гетероциклічних фрагментів молекули при 1710, 1750 см⁻¹. Співвідношення інтегральних інтенсивностей сигналів в ЯМР¹H спектрах синтезованих сполук I-XII підтверджує відсутність протону при атомі N₍₁₎ молекули урацилу при 11,00–11,25 м.д., а також наявність протонів у положеннях C₍₅₎H і C₍₆₎H гетероциклічного ядра при 5,460 м.д. і 7,219–7,365 м.д. відповідно, а також протонів у положенні N₍₃₎H гетероциклічного ядра при 10,562–10,810 м.д. Сигнал протону групи -CF₂CHBrCl у молекулах сполук I-VI, який теоретично повинен проявлятися у вигляді квартету дублетів при 5,801–5,885 м.д. (J³_{H,F} 5,4 Гц, J²_{H,Cl(Br)} 0,8 Гц), не спостерігається, оскільки заміщується на дейтерій. Дані елементного аналізу на C, H, N, Br синтезованих сполук I-XII відповідають обчисленим значенням. Віднесення сигналів в ІЧ та ЯМР¹H спектрах сполук I-XII наведено в таблиці 1.

5-фторурацил з його здатністю утворювати в процесі метаболізму інтермедіати, що включаються до структури ДНК, РНК, гальмують активність тимідилатсинтетази, яка забезпечує синтез ДНК і РНК його попередниками, стоїть в центрі уваги пошуку нових сполук із зазначеною спрямованістю дії [9,10]. Для подальших досліджень біологічних властивостей відібрано монопохідні 5-метилурацилу (сполука II), 6-метилурацилу (III), 5-фторурацилу (IV), які за хімічною будовою й наявністю фармакофорних груп є найбільш близькими до відомого лікарського засобу – 5-фторурацилу.

Визначення одного з головних фармакологічних індексів гетероциклічних похідних урацилів (II-IV) гострої токсичності показало, що названі сполуки належать до малотоксичних – ЛД₅₀ їх становить 485 мг/кг, 480 мг/кг і 120 мг/кг 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 підшкірно вищевказаних хімічних речовин у дослідних тварин спостерігалися тонічні й клоніко-тонічні судоми впродовж 1–2 годин, блювота і – після 3–5 годин – тремор (табл. 2).

Таблиця 2

Параметри токсичності сполук II, III, IV у порівнянні з 5-фторурацилом

Сполука, препарат порівняння	Шлях введення	ЛД ₅₀ (миші, мг/кг)
N ₍₁₎ -(1',1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-5-метилурацил (II)	Підшкірний	485
N ₍₁₎ -(1',1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-6-метилурацил (III)	Підшкірний	480
N ₍₁₎ -(1',1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-5-фторурацил (IV)	Підшкірний	120
5-фторурацил		375

Отже, синтезовані фармакоформісні гетероциклічні монопохідні урацилів, які за хімічною будовою близькі



до відомого лікарського засобу 5-фторурацилу і є малотоксичними, можна розглядати як потенційні лікарські протипухлинні засоби, що відкриває нові перспективи для подальших робіт у цьому напрямку онкофармакології.

ВИСНОВКИ

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану з урацилами (молярне співвідношення 1:1) в системі розчинників (бензол–диметилформамід–діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром у лужному середовищі синтезовано нові фармакофорвмісні гетероциклічні монопохідні урацилів.

Будову й склад синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ-, ЯМР¹H-спектроскопії, а індивідуальність – методами тонкошарової та газорідної хроматографії.

Установлено, що деякі з синтезованих сполук, які є найближчими за хімічною будовою до препарату порівняння 5-фторурацилу, належать до малотоксичних – значення ЛД₅₀ їх знаходяться в інтервалі від 485 мг/кг до 120 мг/кг.

Подібність хімічної будови синтезованих сполук до будови протипухлинного препарату 5-фторурацилу, значення параметрів їхньої токсичності дозволяють розглядати їх як потенційні лікарські протипухлинні засоби.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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.

2. 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.
3. Longley D.B. Mechanisms of action of 5-fluorouracil / D.B. Longley, D.P. Harkin // *Nature Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 230–238.
4. Ягупольский Л. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М. Ягупольский. – К.: Наукова думка, 1988. – С. 90–105.
5. Welchinska Hel. 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.
6. Прозоровский В. 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.
7. Вайбель С. Идентификация органических соединений / С. Вайбель. – М.: Изд-во иностр. лит., 1957. – С. 120–269.
8. Миронов В. Спектроскопия в органической химии / В.А. Миронов, С.А. Янковский. – Л.: Химия, 1985. – 232 с.
9. Longey D.B. 5-fluorouracil -mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews* / D.B. Longey, D.P. Harkin, P.G. Jonson // *Cancer.* – 2003. – Vol. 3. – P. 330–338.
10. 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.

Відомості про автора:

Вельчинська О.В., к. хім. н., доц. каф. біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця.

Адреса для листування:

Вельчинська Олена Василівна. Україна, м. Київ, 02068, вул. Анни Ахматової, 16 г, 14.

E-mail: elena_wwu@ukr.net. Тел.: 585-52-81, 234-80-11, (050) 501-12-87