

МОДИФІКОВАНІ ПОХІДНІ 6-МЕТИЛУРАЦИЛУ ТА ЇХ ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ

О.В. Вельчинська, І.В. Ніженковська,
В.В. Вільчинська

Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця
(Київ)

Вступ

Пошуки шляхів елімінації пухлинних клітин із множинною лікарською стійкістю є на сьогоднішній день цілком закономірними. 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.

Важливою є розробка сучасних лікарських засобів, що сприяють захисту організму людини від шкідливого впливу факторів навколишнього середовища.

Одним з перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби є створення нових антиметаболітів піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот. Наявність цих речовин в організмі людини і обумовила актуальність дослідження їхньої ролі у фізіології макроорганізму 1-5. Експериментально встановлено, що ряд сполук - похідних піримідину (метилурацил, пентоксил та інші) проявляють анаболічну та антикатаболічну активність. Ці препарати прискорюють процеси клітинної регенерації, сприяють загоєнню ран, стимулюють клітинні та гуморальні фактори імунітету. Так, відомий лікарський засіб "Метилурацил" проявляє протизапальну дію, є стимулятором лейкопоезу [6].

Модифікація молекул 6-заміщених урацилів за допомогою введення галоген(фтор)вмісних фармакофорів призводить до підвищення їх розчинності в ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспорту в організмі, а також наближає їх за хімічною будовою до відомого протипухлинного препарату 5-фторурацилу [7].

Мета даної роботи полягає в хімічній модифікації молекули 6-метилурацилу з подальшим вивченням біологічної активності нових синтезованих похідних 6-метилурацилу, а саме: після конструювання потенційно активних структур розроблено нові препаративні методи синтезу оригінальних гетероциклів на основі 6-метилурацилу, а також фторвмісних синтонів - загального анестетика фторотану (2-бром-1,1,1-трифтор-2-хлоретану) або 1,1-діетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену, досліджена протипухлинна активність та токсичність деяких із синтезованих похідних 6-метилурацилу.

Матеріали та методи дослідження

Об'єкти дослідження: нові гетероциклічні моно- та біс-похідні, синтезовані на основі 6-метилурацилу та фторотану або 1,1-діетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену в якості фторвмісних синтонів. Абсолютні розчинники одержують в такій спосіб: ацетонітрил переганяють над P_2O_5 , діетиловий ефір - над металевим натрієм. Диметилформамід, бензол, дихлоретан переганяють у вакуумі. Гексан, метанол, ацетон переганяють простою перегонкою, сушать над сульфатом магнію безводним. Індивідуальність синтезованих сполук контролюють методом тонкошарової хроматографії на пластинах Silufol-254 в 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 Hera", Germany). Спектри ІН ЯМР записують на приладах "Bruker WP-200" (виробник "Bruker", Switzerland), "Varian T-60" (виробник "Varian", USA) з робочою частотою 200-132 МГц в $DMSO-d_6$ з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту.

$N_{(1)}, N_{(1)}$ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-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 кімнат-

ної температури, додають до нього краплями розчин 0,87 г (0,0044 моль) фторотану в 20 мл сухого ефіру. Приготування розчину № 2. 1,11 г (0,0089 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°C 6 годин, фільтрують у гарячому стані, охолоджують, відганяють простою перегонкою розчинники. Залишок - осад промивають 30 мл суміші діетиловий ефір - гексан (1:1) та сушать у вакуумі водострунного насосу. Сполука **I** - кристалічний порошок кремового забарвлення, нестійкий до дії гарячого органічного розчинника; при перекристалізації розкладається до вихідного урацилу. Вихід 1,05 г (43%). Т пл. 286-289°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., $2CH_3$); 5,313 (2H, с., $2C(5)H$); 10,832 (2H, д., $2N(3)H$, $J_{HH} = 9.6$ Гц). Аналогічно синтезують сполуки: $N_{(1)}$ -(1',1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-6-метилурацил (**II**), $N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси-2'-хлоретил)-6-метилурацил (**III**) із 1,54 г (0,84 мл; 0,0079 моль) фторотану та 1,0 г (0,0079 моль) 6-метилурацилу. Сполука **II** - кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,73 г (31%). Т пл. 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. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820-3000 (CH_3). 1H ЯМР: 1,74 (3H, с., CH_3); 7,26 (H, с., $C(5)H$); 10,620 (H, с., $2N(3)H$). Сполука **III** - кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,16 г (15%). Т пл. 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. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820-3000 (CH_3); 3200-3400 (OH). 1H ЯМР: 1,74 (3H, с., CH_3); 7,26 (H, с., $C(5)H$); 10,62 (H, с., $2N(3)H$); 11,03 (H, с., OH).

1,1-діетилкарбокси-2-трифторметил-2-(6'-метилуридил- $N_{(1)}$ -)етилен (**IV**). Приготування розчину № 1. 6,13 г на-

трію металевого (0,268 моль) розчиняють в 250 мл метанолу безводного, додають краплями через ділильну лійку 43,0 г діетилового ефіру маленової кислоти (40 мл; 0,268 моль) та 62,0 г трифтороцтової кислоти (40 мл; 0,543 моль) при перемішуванні реакційної суміші та нагріванні. Кип'ятять суміш протягом 6 годин, охолоджують до кімнатної температури, відганяють простою перегонкою розчинник. Залишок - скловидну масу білого кольору заливають діетиловим ефіром. Осад білого кольору (продукт А), що випадає, відфільтровують та використовують на наступній стадії реакції. Приготування розчину № 2. 8,0 г (0,0287 моль) продукту А розчиняють в 55 мл сухого дихлоретану при кімнатній температурі, додають 6 г (0,0287 моль) п'ятихлористого фосфору. Реакційна суміш нагрівалася та набувала молочного забарвлення. Гарячий розчин перемішують з кип'ятінням 5 годин, охолоджують, осад, що утворився відфільтровують та промивають дихлоретаном, відганяють розчинник простою перегонкою. Залишок - масло очищують перегонкою у вакуумі (продукт В). Вихід 6,31 г (80%). Т. кип. 56-59 °C (25 мм рт. ст.), n_D^{25} 1,3010. Знайдено, %: С 39,36; Н 3,67; F 20,75. $C_9H_{10}ClF_3O_4$. Обчислено, %: С 39,37; Н 3,64; F 20,76. Приготування розчину № 3. До суміші 0,87 г (0,0069 моль) 6-метилурацилу в 30 мл диметилформаміду безводного та 0,71 г (0,94 мл; 0,0069 моль) триетиламіну безводного додають по краплям 1,92 г (0,0069 моль) продукту В у 10 мл діетилового ефіру безводного при перемішуванні реакційної суміші та нагріванні до 60-70°C. Кип'ятять суміш протягом 2-х годин, фільтрують гарячий розчин та відділяють осад $N(C_2H_5)_3 \cdot HCl$, розчинники відганяють у вакуумі. Залишок - масло жовтого забарвлення заливають гексаном та кип'ятять, зливають гексан декантацією, заливають ацетоном, осад блідо-кремового забарвлення випадає із ацетону (продукт С - **IV**). Вихід 0,80 г (33%). Т пл. 270-273 °C. Знайдено, %: С 46,13; Н 4,08; N 7,59. $C_{14}H_{15}N_2F_3O_6$. Обчислено, %: С 46,18; Н 4,15; N 7,68. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 400, 415, 470, 560 (CF_3); 600-800 (Heterocycl.); 905, 995, 1180, 1230, 1295 (CF_3); 1050-1150 (OCH_3 , OC_2H_5); 1300-1600 (Heterocycl.);

1315, 1600 (C=C); 1710, 1715, 1735 (C=O); 3010-3080 (Heterocycl.). ^1H ЯМР: 1,18 (6H, т., $J_{\text{H,H}}^3$ 7,0 Гц, 2CH_3); 1,87 (3H, с., CH_3 при $\text{C}(6)\text{H}$); 3,737- 4,315 (4H, м., $J_{\text{H,H}}^3$ 7,0 Гц, 2OCH_2); 6,26 (1H, д., $J_{\text{H,H}}^2$ 10,0 Гц, $\text{C}(5)\text{H}$); 8,59 (1H, с., $\text{N}(3)\text{H}$).

Дослідження параметрів гострої токсичності та протипухлинної активності моно- і біс-похідних 6-метилурацилу проводили в Інституті фармакології та токсикології АМН України. Для визначення середньотоксичної дози LD_{50} синтезованих сполук використовують експрес-метод В.Б. Прозоровського [8]. Дослідження проводять на білих нелінійних мишах-самцях вагою $22,0 \pm 2,0$ г; шлях введення - підшкірний. Результати досліду обраховують в альтернативній формі на 14 добу після введення. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук в літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил. При вивченні протипухлинної активності біс-похідного 6-метилурацилу як модель злякисну гліобластому людини у вигляді гетеротрансплантатів пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана [9]. При лікуванні гліобластоми людини критерієм значення був відсоток гальмування росту гетеротрансплантату гліоми людини понад 25%. Курс лікувальних впливань становив 6 введень через добу при внутрішньоочеревинному шляху введення, згідно із правилами введення речовин до організму піддослідних тварин, які рекомендовано Фармакологічним Центром МОЗ України, в інтервалі доз $1/4 - 1/5 \text{LD}_{50}$. Результати обраховувалися через 24 години після закінчення лікування. Під час вивчення специфічної протипухлинної активності біс-похідного 6-метилурацилу його розчиняли у фізіологічному розчині.

Отримані результати та їх обговорення

За новими, розробленими нами методами синтезу, взаємодією фторотану у якості фторвмісткого синтону з 6-метилурацилом у молярному співвідношенні 1:2 та 1:1 в системі розчинників (бензол-диметилформамід-діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром (лужне середовище) синтезовано нові моно- та біс-похідні з фармакофорними групами

$=\text{C}=\text{CBrCl}$, $-\text{CF}_2-\text{CHBrCl}$, $-(\text{HO})\text{C}=\text{CBrCl}$ (I-III), а при взаємодії іншого фторвмісткого синтону 1,1-діетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену з 6-метилурацилом в еквімолярних кількостях в системі розчинників (діетиловий ефір-диметилформамід-гексан-2-он) синтезовано оригінальне похідне IV, (схема 1).

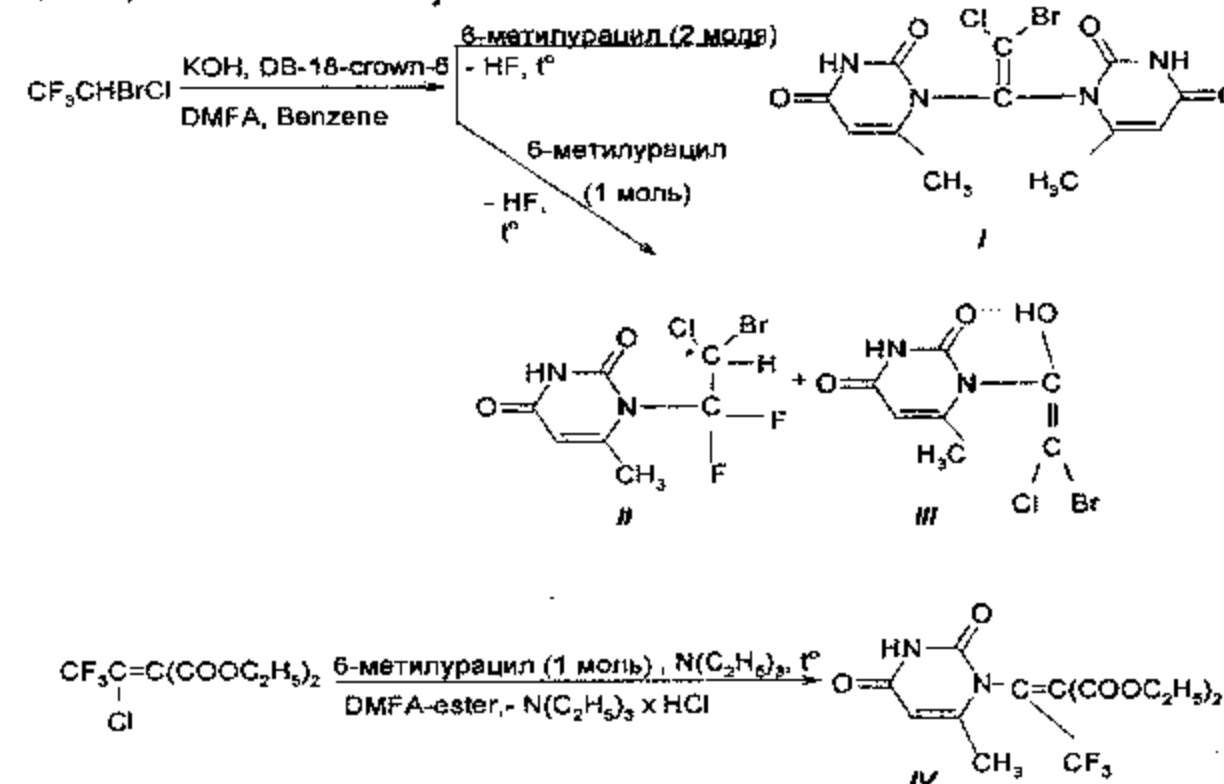


Схема 1. Моно- та біс-похідні 6-метилурацилу.

Визначення одного з головних фармакологічних індексів синтезованих сполук I-IV - гострої токсичності показало, що сполука I відноситься до малотоксичних: LD_{50} їх складає 495 мг/кг. У лабораторних тварин спостерігалися тонічні судоми впродовж 1-2 годин, блювота. Монопохідні II-IV відносяться також до малотоксичних сполук, LD_{50} їх дорівнює 480 мг/кг, 465 мг/кг та 580 мг/кг, відповідно (табл. 1). Препарат порівняння 5-фторурацил відноситься до малотоксичних сполук та характеризується наступним значенням токсичності: LD_{50} 5-фторурацилу складає 375 мг/кг.

Під час вивчення протипухлинної активності значний інтерес становило біс-похідне загального анестетика фторотану та 6-метилурацилу I, як найбільш близьке за хімічною будовою до препарату порівняння 5-фторурацилу.

Параметри токсичності сполук I-IV у порівнянні з 5-фторурацилом

№ п/п	Сполука	ЛД ₅₀ , мг/кг
1.	Сполука I	495
2.	Сполука II	480
3.	Сполука III	465
4.	Сполука IV	580
5.	5-фторурацил (контроль)	375

Крім того, згідно зауваженням клініцистів, фторотан є найбільш зручним лікарським засобом, який дає позитивні результати при операційних втручаннях у онкологічних хворих [10,11].

Біс-похідне I було досліджено нами в онкофармакологічних експериментах з використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана. Маса гетеротрансплантату злоякісної гліоми після дії біс-похідного I зменшилася до $1,89 \pm 0,091$ мг, що відповідає за результатами морфологічного контролю 30,41% гальмування росту пухлини.

При порівняльному гістологічному дослідженні клітинно-тканевих реакцій пухлини при лікуванні потенційною проти-пухлинною 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 вивчення біс-похідного I при пухлинах головного мозку.

Таким чином, можна зробити висновок, що біс-похідне I має високу протипухлинну активність на злоякісній гліобластомі людини, що дозволяє розглядати його як фізіологічно активну сполуку з перспективою подальшого вивчення за вимогами до потенційних протипухлинних засобів для лікування людини.

Монопохідні 6-метилурацилу II-IV відносяться до малотоксичних сполук, але можуть бути перспективними в подальших біологічних дослідженнях завдяки наявності в молекулах подібних за хімічною будовою до біс-похідного I фрагментів.

Висновки

1. За новими, розробленими нами методами синтезу, взаємодією фторотану або іншого фторвмісткового синтону 1,1-діетилкарбоксі-2-хлор-2-трифторметилетилену з 6-метилурацилом в молярному співвідношенні 1:2 або еквімолярних кількостях, в системах розчинників (бензол-диметилформамід-діетиловий ефір) або (діетиловий ефір-диметилформамід-гексан-ацетон) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром, синтезовано нові моно- та біс-похідні 6-метилурацилу з фармакофорними групами $=C=CBrCl$, $-CF_2-CHBrCl$, $-(HO)C=CBrCl$, $-(CF_3)C=C(COOC_2H_5)_2$.

2. Будову та склад синтезованих сполук - моно- та біс-похідних 6-метилурацилу підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ-, ¹H ЯМР-спектроскопії.

3. Встановлено, що синтезовані моно- та біс-похідні 6-метилурацилу відносяться до малотоксичних: значення ЛД₅₀ їх знаходяться в інтервалі від 580 мг/кг до 465 мг/кг.

4. При використанні пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана, на підставі результатів експериментально-морфологічних досліджень зареєстровано виражений протипухлинний ефект біс-похідного 6-метилурацилу з відсотком гальмування пухлинного росту 30,41% (критерій значущості $\geq 25\%$).

5. Біс-похідне I має високу протипухлинну активність на злоякісній гліобластомі людини, що дозволяє розглядати його як фізіологічно активну сполуку з перспективою подальшого вивчення за вимогами до потенційних протипухлинних засобів для лікування людини.

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. New 2-piperazinybenzimidazole derivatives as 5-HT3 antagonists. Synthesis and pharmacological evaluation / A. Orjales, R. Mosquera, L. Labeage, R. Rodes // *J. Med. Chem.* - 1997. - Vol. 40, N 4. - P. 586-593.

5. Мнджоян А.Л. Биологические свойства химических соединений / А.Л. Мнджоян, Ю.З. Тер-Захарян. - Ереван: Изд. АН Арм.ССР, 1962. - Вып. 1. - 246 с.

6. Машковський Д.С. Засоби, які впливають на центральну нервову систему / Д.С. Машковський. - Київ: Наукова думка, 1991. - С. 43-44.

7. Ягупольский Л.М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М. Ягупольский. - Киев: Наукова думка, 1988. - С. 90-105.

8. Прозоровский В.Б. Экспресс метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки / В.Б. Прозоровский, В.П. Прозоровский, В.М. Демченко // *Фармакология и токсикология.* - 1978. - Т. 41, № 4. - С. 407-509.

9. 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.

10. Brody G.L. Halothane anesthesia as a possible cause of massive hepatic necrosis / G.L. Brody, R.B. Sweet // *Anesthesiol.* - 1963. - Vol. 24. - P. 29-37.

11. Brown B.R. Biotransformation and hepatotoxicity of halothane / B.R. Brown, I.G. Sipes // *Biochem. Pharmacol.* - 1977. - Vol. 26. - P. 2091-2094.

Резюме

Вельчинська О.В., Ніженковська І.В., Вільчинська В.В. Модифіковані похідні 6-метилурацилу та їх протипухлинна активність.

Описано нові препаративні методи синтезу в умовах каталізу 18-краун-6-комплексом оригінальних гетероциклів на основі 6-метилурацилу та фторвмісних синтонів - загального анестетика фторотану та 1,1-диетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену. Встановлено, що синтезовані сполуки - моно- та біс-похідні 6-метилурацилу відносяться

до малотоксичних: значення LD_{50} їх знаходяться в межах від 580 мг/кг до 465 мг/кг. Виявлено значний протипухлинний ефект біс-похідного 6-метилурацилу на гетеротрансплантатах злоякісної гліоми людини в відсотком гальмування росту пухлини 30,41% (критерій значущості $> 25\%$).

Ключові слова: 6-метилурацил, фторотан, пухлина, гліома, токсичність, протипухлинний ефект.

Резюме

Вельчинская Е.В., Ниженковская И.В., Вильчинская В.В. Модифицированные производные 6-метилурацила и их противоопухолевая активность.

Описаны новые препаративные методы синтеза в условиях катализа 18-краун-6-комплексом оригинальных гетероциклов на основе 6-метилурацила и фторсодержащих синтонов - общего анестетика фторотана и 1,1-диетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену. Установлено, что синтезированные соединения - моно- и бис-производные 6-метилурацила относятся к малотоксичным: значения LD_{50} их находятся в интервале от 580 мг/кг до 465 мг/кг. Обнаружен значительный противоопухолевый эффект бис-производного 6-метилурацила на гетеротрансплантатах злокачественной глии человека с процентом торможения роста опухоли 30,41% (критерий значимости $> 25\%$).

Ключевые слова: 6-метилурацил, фторотан, опухоль, глиома, токсичность, противоопухолевый эффект.

Summary

Welchinska E.V., Nizenkovska I.V., Vilchinska V.V. Modified derivatives of 6-methyluracile and its antitumour activity.

A new convenient methods for the preparation with 18-crown-6-complex as catalyst of original heterocycles on the base of 6-methyluracile and fluorine containing sintones - common anesthetic ftorotan and 1,1-dieethylcarboxy-2-chloro-2-threefluoromethylethylene were described. It was discovered that compounds which synthesized - mono- and bis derivatives of 6-methyluracile applies to a little toxic preparations: its LD_{50} are at the interval from 580 mg/kg to 465 mg/kg. A strongly antitumour effect of bis derivative of 6-methyluracile on the heterotransplantates of mans glioma cancer with percents of growth relaxation of cancer 30,41% has been discovered (the criteria of considerable are $> 25\%$).

Key words: 6-methyluracile, ftorotan, tumour, glioma, toxicity, antitumour activity.

Рецензенти: д.мед.н., проф.Л.В.Савченкова
д.мед.н., проф.С.В.Антипова