

**ХІМІЧНО МОДИФІКОВАНІ ПОХІДНІ
5-НІТРОУРАЦИЛУ ТА ЇХ
ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ****О.В. Вельчинська***Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця
(Київ)***Вступ**

Створення нових антиметаболітів піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот та малих активних молекул залишається одним з перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби [1]. Наявність цих речовин в організмі людини і обумовила 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 [1-3]. Останнім часом значно зросла кількість досліджень щодо синтезу нових похідних 5-фторурацилу та його хімічних аналогів, вивчення їхньої біологічної активності.

Дуже важливо те, що фторо(галогено)замінені гетероциклічні молекули здатні виконувати роль відповідних синтонів в органічному синтезі. З цієї причини їх активно використовують для створення оригінальних біологічно активних молекул. Введення фторо(галогено)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, 5]. При цьому зазначена увага до фторомісних фрагментів у нових молекулах передбачає підсилення антиметаболітних властивостей сполук.

Мета даної роботи полягає в хімічній модифікації молекули 5-нітроурацилу з подальшим вивченням біологічної активності його синтезованих похідних, а саме: після конструювання потенційно

активних структур розроблено новий препаративний метод синтезу оригінальних гетероциклів на основі 5-нітроурацилу, а також фторвмістних синтонів - загального анестетика фторотану (2-бромо-1,1,1-трифторо-2-хлороетану) або 1,1-діетилкарбоксі-2-хлоро-2-трифторометилетилену, досліджено параметри токсичності та протипухлинна активність нових похідних 5-нітроурацилу.

Матеріали та методи дослідження

Об'єкти дослідження: нові гетероциклічні моно- та біс-похідні, які було синтезовано на основі 5-нітроурацилу та фторотану або 1,1-діетилкарбоксі-2-хлоро-2-трифторометилетилену, що використовували у якості фторвмістних синтонів. Абсолютні розчинники одержували перегонкою над P_2O_5 або металевим натрієм, перегонкою у вакуумі або простою перегонкою; сушили над сульфатом магнію безводним. Індивідуальність синтезованих сполук контролювали методом ТШХ на пластинах Silufol-254 в системі ацетонітрил-гексан 2:1. ГРХ виконували на газорідному хроматографі "Perkin Elmer" з УФ-детектором (виробник "Perkin", Germany). ІЧ-спектри записували на спектрофотометрі UR-20 (виробник "Charles Ceise Hena", Germany). Спектри ІН ЯМР записували 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"-бромо-2"-хлороетеніл)-біс-(5-нітроурацил)(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. 1.38 г (0,0088 моль) 5-нітроурацилу 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 (реакцій-

на 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 осад кремового забарвлення. Вихід 2.24 г (56,5%). Т пл. 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 $N_{(3)}H$). Аналогічно синтезували сполуки: $N_{(1)}$ -(1',1'-дифторо-2'-бромо-2'-хлороетил)-5-нітроурацил (**II**), $N_{(1)}$ -(2'-бромо-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-нітроурацил (**III**) із 1.57 г (0.84 мл, 0.0079 моль) фторотану та 1.24 г (0,0079 моль) 5-нітроурацилу. Сполука **II** - кристалічний осад жовтого забарвлення. Вихід 1,26 г (48%). Т пл. 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. ІЧ-спектр (KBr), cm^{-1} : 550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 1370-1390 ($\gamma^s_{NO_2}$); 1550-1580 ($\gamma^{as}_{NO_2}$). 1H ЯМР: 7,238 (H, с., $C_{(6)}H$); 10,569 (H, с., $N_{(3)}H$). Сполука **III** - кристалічний осад жовтого забарвлення. Вихід 0,29 г (12%). Т пл. 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. ІЧ-спектр (KBr), cm^{-1} : 550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 3200-3400 (OH); 1370-1390 ($\gamma^s_{NO_2}$); 1550-1580 ($\gamma^{as}_{NO_2}$). 1H ЯМР: 7,238 (H, с., $C_{(6)}H$); 10,569 (H, с., $N_{(3)}H$); 10,977 (H, с., OH). 1,1-діетилкарбоксі-2-трифторометил-2-(5'-нітроуридил-N(1')-)-етилєн (**IV**). *Приготування розчину № 1.* 6,13 г натрію металевого (0,268 моль) розчиняли в 250 мл метанолу безводного, додавали краплями через ділильну лійку 43,0 г діетилового ефіру малонової кислоти (40 мл; 0,268 моль) та 62,0 г трифтороцтової кислоти (40 мл; 0,543 моль) при перемішуванні реакційної суміші та нагріванні. Кип'ятили суміш протягом 6 годин, охолоджували до кімнатної температури, відганяли простою перегонкою розчинник. Залишок - скловидну масу білого кольору заливали діетиловим ефіром. Осад білого кольору (продукт А), що випадав, відфільтровували та використовували на наступній стадії реакції. *Приготування розчину № 2.*

8,0 г (0,0287 моль) продукту А розчиняли у 55 мл сухого дихлоретану при кімнатній температурі, додавали 6 г (0,0287 моль) п'ятихлористого фосфору. Реакційна суміш нагрівалася та набувала молочно забарвлення. Гарячий розчин перемішували з кип'ятінням 5 годин, охолоджували; осад, що утворився відфільтровували та промивали дихлоретаном, відганяли розчинник простою перегонкою. Залишок - масло очищували 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 2,26 г (0,014 моль) 5-нітроурацилу в суміші 200 мл піридину та 50 мл ДМФА безводних та 1,42 г (2,5 мл; 0,014 моль) триетиламіну безводного додають по краплям 3,8 г (0,014 моль) продукту В у 10 мл ДМФА безводного при перемішуванні реакційної суміші та нагріванні до 60-70°C. Кип'ятять суміш протягом 10 годин (реакційна суміш темно-червоного забарвлення), фільтрують гарячий розчин та відділяють осад $N(C_2H_5)_3 \cdot HCl$, відганяють розчинники у вакуумі. Залишок - масло жовтого забарвлення заливають гексаном та кип'ятять, зливають гексан декантацією, заливають ацетоном. Осад блідо-жовтого забарвлення випадав із ацетону. Т пл. 156-159°C, вихід 2,5 г (45%). Знайдено, %: С 41,0; Н 3,35; N 11,09. $C_{13}H_{12}F_3N_3O_8$. Обчислено, %: С 39,51; Н 3,05; N 10,63. ІЧ-спектр (KBr), см⁻¹: 400, 415, 470, 560 (-CF₃); 600-800 (Cycl.); 905, 995, 1180, 1230, 1295 (-CF₃); 1050-1150 (-OCH₃, -OC₂H₅); 1300-1600 (Cycl.); 1315, 1600 (C=C); 1710, 1750 (C=O); 1370 (-NO₂); 3010-3080 (Cycl.). ¹H ЯМР: 1.005-1.355 (6H, м., J³H,H 7.0 Гц, 2CH₃); 3.737-4.315 (4H, м., J³H,H 7.0 Гц, 2OCH₂); 7.78 (1H, т., J²H,H 10.0 Гц, -C₍₆₎H (Cycl.)); 11.69 (1H, с., -N₍₃₎H (Cycl.)).

Під час проведення хіміко-біологічних досліджень нами було відібрано серед значної кількості синтезованих преформованих піримідинів та досліджені сполуки із значущою протипухлинною дією [6].

Слід зазначити, що в молекулах більшості із цих сполук гетероциклічні фрагменти пов'язані залишком молекули загального анестетика фторотану, який широко використовується в хірургічній онкологічній практиці [7, 8].

Гостру токсичність (LD_{50}) вивчено у порівнянні з препаратом 5-фторурацил. Протипухлинну активність нової сполуки $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2"-бromo-2"-хлороетеніл)-біс-(5-нітроурацил) (**I**) досліджена з використанням операційного та біопсійного матеріалу з пухлиною мозку людини.

Дослідження параметрів гострої токсичності та протипухлинної активності нових сполук виконано в Інституті фармакології та токсикології АМН України. Вивчення гострої токсичності (LD_{50}) проведено на білих нелінійних мишах - самцях з масою тіла 22+2 г при підшкірному шляху введення. Результати досліджу обраховано у альтернативній формі на 14 добу після введення. Статистична обробка проведена за [9]. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук в літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил. Доза речовини при підшкірному шляху введення становила від 200 до 600 мг/кг. У піддослідних тварин спостерігалися тонічні судоми впродовж 1-2 годин, блювання.

Отримані результати та їх обговорення

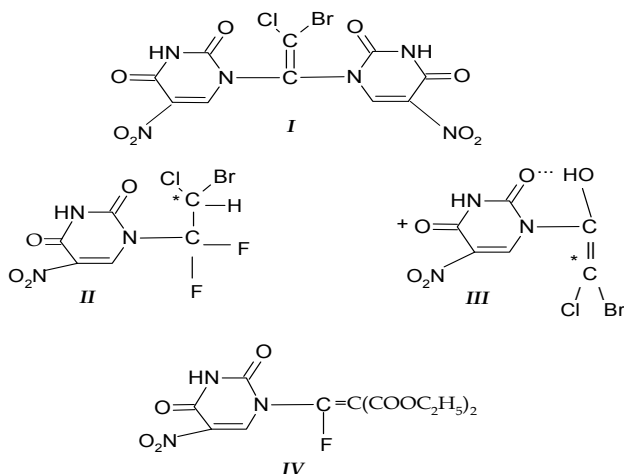
За новими, розробленими нами методами синтезу, взаємодією фторотану у якості фторовмісного синтону з 5-нітроурацилом у молярному співвідношенні 1:2 та 1:1 в системі розчинників (бензол-ДМФА-діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром (лужне середовище) синтезовано нові моно- та біс-похідні 5-нітроурацилу з фармакофорними групами $=C=SVrCl$, $-CF_2-CHBrCl$, $-(HO)C=SVrCl$ (**I-III**), а при взаємодії іншого фторовмісного синтону 1,1-діетилкарбоксі-2-хлоро-2-трифторометилетилену з 5-нітроурацилом в еквімолярних кількостях в системі розчинників (діетиловий ефір-ДМФА-гексан-ацетон) синтезовано оригінальне похідне IV наступної формули (схема 1).

Дослідження гострої токсичності синтезованих сполук **I**, **II** (табл. 1) показало, що похідні 5-нітроурацилу **I**, **II** більш токсичні (у 0,49-0,69 рази), ніж 5-фторурацил. Значення їх LD_{50} знаходяться в межах від 185 мг/кг до 262 мг/кг.

Протипухлинна дія синтезованих сполуки **I** 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 гетеротранспланта ту гліоми людини понад 25%. Курс лікувальних впливів становив 6 введень через добу при внутрішньоочеревинному шляху введення, в інтервалі доз 1/4- 1/5 ЛД₅₀. Результати обраховано через 24 години після закінчення лікування [10].

Схема 1



Таблиця 1

Параметри токсичності сполук I, II у порівнянні з 5-фторурацилом

№ п/п	Сполука	ЛД ₅₀ , мг/кг
1.	N _{(1),N₍₁₎} -(2"-бromo-2"-хлороетил)-біс-(5-нітроурацил) (I)	262
2.	N ₍₁₎ -(1',1'-дифторо-2'-bromo-2'-хлороетил)-5-нітроурацил (II)	185
3.	5-фторурацил (препарат порівняння)	375

Виявлено, що протипухлинна активність біс-похідного 5-нітроурацилу I значно перевищує прийнятий критерій значущості (>25,0% гальмування пухлинного росту). Маса гетеротрансплантау злоякісної гліоми після дії біс-похідного 5-нітроурацилу I зменшилася до 1,86±0,091 мг, що відповідає за результатами морфологічного контролю 30,0% гальмування росту пухлини. Це в 1,2 рази більше прийнятого критерію

активності при лікуванні гліобластоми 25%, що підтверджено при проведенні морфологічного контролю. При порівняльному гістологічному дослідженні клітинно-тканевих реакцій пухлини при лікуванні потенційною протипухлинною сполукою - біс-похідним 5-нітроурацилу **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 5-нітроурацилу **I** при пухлинах головного мозку.

Визначення одного з головних фармакологічних індексів похідних 5-нітроурацилу **I, II** - гострої токсичності показало, що синтезовані сполуки відносяться до малотоксичних: значення LD_{50} їх знаходяться в межах від 185 мг/кг до 262 мг/кг. Вони у 0,49-0,69 рази більш токсичні, ніж препарат порівняння 5-фторурацил. Виявлено, що біс-похідне 5-нітроурацилу **I** має значну протипухлинну дію відносно гетеротрансплантату гліоми людини (30,0%), що у 1,2 рази більше прийнятого критерію активності при лікуванні гліобластоми 25%.

Висновки

1. За новими, розробленими нами методами синтезу, взаємодією фторотану або іншого фторовмісного синтону 1,1-діетилкарбоксі-2-хлоро-2-трифторометилетилену з 5-нітроурацилом в молярному співвідношенні 1:2 або еквімолярних кількостях, в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром, синтезовано нові моно- та біс-похідні 5-нітроурацилу з фармакофорними групами.

2. Встановлено, що синтезовані моно- та біс-похідні 5-нітроурацилу відносяться до малотоксичних: значення LD_{50} їх знаходяться в межах від 185 мг/кг до 262 мг/кг.

3. 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 5-нітроурацилу з відсотком гальмування пухлинного росту 30,0% (критерій значущості > 25%).

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. Барлоу Р. Введение в химическую фармакологию / Р. Барлоу. - М.: Изд. ин. лит., 1959. - С. 107.
5. Ягупольский Л.М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М. Ягупольский. - Киев: Наукова думка, 1988. - С. 90-105.
6. 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 [e.a.] // *Мікробіол. журн.* - 2003. - Т.65, № 6. - С. 20-25.
7. Brody G.L. Halothane anesthesia as a possible cause of massive hepatic necrosis / G.L. Brody, R.B. Sweet // *Anesthesiology.* - 1963. - Vol. 24. - P. 29-37.
8. Brown B.R. Biotransformation and hepatotoxicity of halothane / B.R. Brown, I.G. Sipes // *Biochem. Pharmacol.* - 1977. - Vol. 26. - P. 2091-2094.
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. 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.

Резюме

Вельчинська О.В. *Хімічно модифіковані похідні 5-нітроурацилу та їх протипухлинна активність.*

Описано нові препаративні методи синтезу в умовах каталізу 18-краун-6-комплексом оригінальних гетероциклів на основі 5-нітроурацилу та фторовмісних синтонів - фторотану та 1,1-диетилкарбоксі-2-хлоро-2-трифторометилетилену. Встановлено, що синтезовані моно- та біс-похідні 5-нітроурацилу відносяться до малотоксичних: значення LD_{50} їх знаходяться в межах від 185 мг/кг до 262 мг/кг. Виявлено значущий протипухлинний ефект біс-похідного 5-нітроурацилу на гетеротрансплантатах злоякісної гліоми людини з відсотком гальмування росту пухлини 30,0% (критерій значущості >25%).

Ключові слова: 5-нітроурацил, фторотан, пухлина, гліома, токсичність.

Резюме

Вельчинская Е.В. *Химически модифицированные производные 5-нитроурацила и их противоопухолевая активность.*

Описаны новые препаративные методы синтеза в условиях катализа 18-краун-6-комплексом оригинальных гетероциклов на основе 5-нитроурацила и фторосодержащих синтонов - фторотана и 1,1-диэтилкарбоксии-2-хлоро-2-трифторометилэтилена. Установлено, что синтезированные моно- и бис-производные 5-нитроурацила относятся к малотоксичным: значения LD_{50} их находятся в интервале от 185 мг/кг до 262 мг/кг. Обнаружен значительный противоопухолевый эффект бис-производного 5-нитроурацила на гетеротрансплантатах злокачественной глиомы человека с процентом торможения роста опухоли 30,0% (критерий значимости > 25%).

Ключевые слова: 5-нитроурацил, фторотан, опухоль, глиома, токсичность.

Summary

Welchinska E.V. *Chemical modified derivatives of 5-nitrouracile and its antitumour activity.*

A new convenient methods for the preparation with 18-crown-6-complex as catalyst of original heterocyclic compounds on the base of 5-nitrouracile and fluorine containing sintones - ftorotan and 1,1-diethylcarboxy-2-chloro-2-threefluoromethylethylene was described. It was discovered that mono- and bis-derivatives of 5-nitrouracile which synthesized applies to a little toxic preparations: its LD_{50} are at the interval from 185 mg/kg to 262 mg/kg. A strongly antitumour effect of bis-derivative of 5-nitrouracile on the heterotransplantates of man's glioma cancer with percents of growth relaxation of cancer 30,0% has been discovered (the criteria of considerable are >25 %).

Key words: 5-nitrouracile, ftorotan, tumour, glioma, toxicity.

Рецензент: д.мед.н., проф. В.Д. Лук'яничук