

НОВІ ПОХІДНІ 5-НІТРОУРАЦИЛУ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ У ФАРМАКОТЕРАПІЇ ГЛІОБЛАСТОМИ

О.В. Вельчинська

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

Кафедра біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії (зав. - проф. І.В. Ніженковська)

Реферат

Мета. Здійснено синтез нових моно- та біс-похідних 5-нітроурацилу з галогеновмісними фармакофорними групами $-(CF_3)C=C(COOC_2H_5)_2$, $=C=CBrCl$, $-CF_2-CHBrCl$, $-(HO)C=CBrCl$ у складі молекул, вивчено їх фізично-хімічні та біологічні властивості.

Матеріал і методи. Реакції проведено у системі розчинників: бензен-диметилформамід-діетиловий етер, в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-естером. Будову синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ- та ЯМР¹H-спектрів. Досліджено токсичність та протипухлинну активність синтезованих сполук.

Результати й обговорення. Виявлено, що оригінальне біс-похідне 5-нітроурацилу має високу протипухлинну активність на злякисній гліобластомі людини (критерій активності більш, ніж 25%).

Висновки. Отримані результати дозволяють розглядати біс-похідне 5-нітроурацилу як фізіологічно активну сполуку із перспективою подальшого вивчення як потенційного протипухлинного засобу.

Ключові слова: 5-нітроурацил, фторотан, пухлини, токсичність, краун-естер

Abstract

NEW DERIVATIVES OF 5-NITROURACILE AS POTENTIAL MEDICAL PREPARATIONS AT THE PHARMACOTHERAPY OF GLIOMA CANCER

O. V. WELCHINSKA

The O.O. Bohomolets National Medical University in Kiev

Aim. To report the synthesis, characterization, and physicochemical and biological properties of new mono- and bis-derivatives of 5-nitouracil with pharmacophoric groups $-(CF_3)C=C(COOC_2H_5)_2$, $=C=CBrCl$, $-CF_2-CHBrCl$, $-(HO)C=CBrCl$.

Methods. Reactions were carried out with a system of solvents: benzene-dimethylformamide-ethyl ester under phase-transfer conditions with catalysis by the 18-crown-6-complex. The structure of synthesized compounds was confirmed by elemental analysis, IR-spectra, and NMR¹H-spectra. The acute toxicity and antitumour activity of the synthesized compounds were evaluated.

Results. A potent antitumour effect (the criterion was $\geq 25\%$) of the new bis-derivative of 5-nitouracil on heterotransplants of human glioma cancer was observed.

Conclusions. The results suggest that the bis-derivative of 5-nitouracil is a physiologically active compound that has

potential as an antitumour drug.

Keywords: 5-nitouracil, halothane, cancer, toxicity, crown-ether

Вступ

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 сполук [1-3, 7, 11]. Окрім того, введення фтор(галоген) вмісних фармакофорів у гетероциклічну молекулу призводить до підвищення розчинності сполук у ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспортування в організмі [4-6, 9, 12]. Зазначена увага до фторвмісних фрагментів у нових молекулах викликана також підсиленням антиметаболітних властивостей цих сполук. Взаємодія фторотану з основою супроводжується елімінуванням фтористого водню та генеруванням проміжного продукту 2-бром-1,1-дифтор-2-хлоретилену, який безпосередньо реагує із молекулами спиртів при каталізі основою. Ця реакція дозволяє виявити нову стратегію для синтезу селекційно поліфункціональних молекул, хімічна будова яких дозволяє подальше введення у молекулу нових фармакофорних фрагментів.

Матеріал і методи

Сполуки (I-V) синтезовано на кафедрі біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, досліджено в Інституті фармакології та токсикології НАМН України. Сполуки (I-V) отримано шляхом взаємодії фторотану або I, 1-діетилкарбокси-2-хлоро-2-трифторометилетилену в якості фторвмісних синтонів із 5-нітроурацилом у молярному співвідношенні 1:2 та 1:1 у системі розчинників (бензен-диметилформамід (ДМФА)-діетиловий етер) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-естером (лужне сереовище). Проведені реакції є типовим прикладом реакцій заміщення за гетероатомом N₍₁₎ молекули ураци-

лу із використанням у якості другої компоненти реакції відомого інгаляційного анестетика фторотану. Варіювання умов проведення реакцій та внесення змін до методу синтезу, а саме: збільшення часу нагрівання та промивання залишку - осаду під час фільтрування у вакуумі сумішшю (сухий гексан-діетиловий етер, 1:1) або сухим ацетоном дозволили збільшити практичний вихід сполук (I-V) від 45% до 80%.

Індивідуальність синтезованих сполук (I-V) контролювали методами тонкошарової хроматографії (ТШХ) та газорідинної хроматографії (ГРХ), склад підтверджували даними елементного аналізу. ТШХ виконували на пластинках Silufol-254. ГРХ визначали на газорідинному хроматографі "Perkin Elmer" із ультрафіолетовим детектором (виробник "Perkin", Germany). Інфрачервоні (ІЧ) - спектри записували на спектрофотометрі UR-20 (виробник "Charles Ceise Hena", Germany). Спектри ядерно-магнітного резонансу (ЯМР¹H) синтезованих сполук (I-V) записували на приладах "Bruker WP-200" (виробник "Bruker", Switzerland), "Varian T-60" (виробник "Varian", USA) із робочою частотою 200-132 МГц у виді розчинів ДМСО-D6 та CDCl₃ (внутрішні стандарти ТМС та ГМДС).

Хроматограми, ІЧ-, ЯМР¹H-спектри кінцевих продуктів (I-V) ідентифікували у порівнянні із хроматограмами, ІЧ-, ЯМР¹H-спектрами вихідних сполук. Дані елементного аналізу на С, N, F синтезованих сполук (I-V) відповідають обчисленим значенням.

Моно-похідні урацилів I-II отримують згідно до загальної процедури: N₍₁₎-(1',1'-дифторо-2'-бromo-2'-хлороетил)-5-нітроурацил (I), N₍₁₎-(2'-бromo-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-нітроурацил (II). Приготування розчину № 1. 0,44 г гідроксиду калію (0,0079 моль); 0,044 г дибензо-18-краун-6-естеру в 20 мл сухого бензену перемішують при температурі 60°C 15 хвилин до утворення на стінках хімічного реактору білого полімерного нальоту - калієвого комплексу із дибензо-18-краун-6-естером. Отриманий розчин охолоджують до кімнатної температури, додають до нього краплями розчин 1,57 г (0,84 мл; 0,0079 моль) фторотану в 20 мл сухого етеру. Приготування розчину № 2. 1,24 г (0,0079 моль) 5-нітроурацилу розчиняють у 40 мл сухого диметилформаміду при температурі 60°C в окремому хі-

мічному посуді. Гарячий розчин № 2 додають краплями через ділильну лійку до розчину № 1, перемішують при температурі 60-80°C 3 години, фільтрують у гарячому стані, охолоджують, відганяють розчинники. Залишок - осад промивають 30 мл суміші діетиловий етер - гексан (1:1), сушать у вакуумі водострумного насосу. Кристалічний осад блідо-жовтого забарвлення (I). Вихід 48%. Т пл. 269-271°C. Знайдено, %: N 12.44. C₆H₃BrClF₂N₃O₄. Обчислено, %: N 12.55. ІЧ-спектр γ_{\max} (KBr), см⁻¹: 550-690, 1370-1390, 1550-1580, 1710, 1750. ЯМР¹H, σ : 5.65-5.68 (1H, J³_{H,F} 5.4 Гц, J²_{H,Cl(Br)} 0.8 Гц, CF₂CHBrCl), 7.24 (1H, C₍₆₎H), 10.57 (1H, N₍₃₎H). Охолоджений фільтрат залишають стояти ніч, відганяють розчинники. Залишок (II) - масло кристалізують зі суміші діетиловий етер-гексан (1:1). Осад, що випав, сушать на повітрі. Вихід 12%. Т пл. 264-267°C. Знайдено, %: N 13.43. C₆H₃BrClN₃O₅. Обчислено, %: N 13.46. ІЧ-спектр γ_{\max} (KBr), см⁻¹: 550-690, 1370-1390, 1550-1580, 1710, 1750, 3200-3400. ЯМР¹H, σ : 7.24 (1H, C₍₆₎H), 10.57 (1H, N₍₃₎H), 10.98 (1H, OH). N₍₁₎, N₍₁₎-(2"-бromo-2"-хлороетеніл)-біс-(5-нітроурацил)(III). Продукт отримують згідно до загальної процедури. Сполука III кристалічний порошок кремового забарвлення (56,5%). Т пл.: 290-295°C. Знайдено, %: N 18.59. C₁₀H₄BrClN₆O₈. Обчислено, %: N 18.61. ІЧ-спектр γ_{\max} (KBr), см⁻¹: 550-695, 1710, 1750. ЯМР¹H, σ : 8.86 (2H, 2C₍₆₎H), 10.22 (2H, 2N₍₃₎H у H₂O). 1,1-діетилкарбокси-2-трифторометил-2-хлороетилен (IV). Суміш 6,13 г натрію металічного (0,268 моль) у 250 мл безводного метанолу, 43,0 г діетилового естеру маленової кислоти (40 мл; 0,268 моль) та 62,0 г трифторооцтової кислоти (40 мл; 0,543 моль) нагрівають з перемішуванням при 60-80°C впродовж 6 годин. До отриманого продукту - склоподібної маси додають діетиловий етер. Випадає білий осад (продукт А). Суміш 8,0 г продукту А (0,0287 моль) у 55 мл сухого дихлороетану та 6,0 г фосфору пентахлориду (0,0287 моль) нагрівають із кипінням 5 годин. Залишок промивають дихлороетаном. Продукт IV - масло (80%). Т кип.: 56-59°C (25 мм рт. ст.), n²⁵_D 1.3010. Знайдено, %: C 39.36; H 3.67; F 20.75. C₉H₁₀ClF₃O₄. Обчислено, %: C 39.37; H 3.64; F 20.76. ІЧ-спектр γ_{\max} (KBr), см⁻¹: 400, 415, 470, 560, 730, 905, 995, 1180, 1230, 1295, 1315, 1600, 1735, 2800-3000. ЯМР¹H, σ : 1.19 (6H, J³_{H,H} 7.2 Гц, 2CH₃), 4.10 (4H, J³_{H,H} 7.2 Гц,

2OCH₂). 1,1- діетилкарбоксі-2-трифторометил-2-(5'-нітроуридин-N_(1')-етилен (V). Суміш 2,26 г 5-нітроурацилу (0,014 моль) у 50 мл сухого ДМФА, 1,42 г безводного триетиламіну (2,5 мл; 0,014 моль) та 3,8 г продукту IV (0,014 моль) у 10 мл сухого ДМФА нагрівають при 60-70°C 6 годин, кип'ять впродовж 10 годин; фільтрують, N(C₂H₅)₃ х HCl видаляють. Залишок - жовте масло промивають 10 мл гексану, 10 мл ацетону. Продукт V - порошок жовтого забарвлення (45%). Т. пл.: 156-159°C. Знайдено, %: N 10.55. C₁₃H₁₂F₃N₃O₈. Обчислено, %: N 10.63. ІЧ-спектр γ_{\max} (KBr), см⁻¹: 400, 415, 470, 560, 600-800, 905, 995, 1180, 1230, 1295, 1050-1150, 1315, 1370, 1600, 1710, 1715, 3010-3080. ЯМР¹H, σ : 1.00-1.35 (6H, J_{H,H}³ 7.0 Гц, 2CH₃), 3.73-4.31 (4H, J_{H,H}³ 7.0 Гц, 2OCH₂), 7.78 (1H, J_{H,H}² 10.0 Гц, C₍₆₎H (Het)), 11.69 (1H, N₍₃₎H (Het)).

Для визначення середньотоксичної дози ЛД₅₀ синтезованих сполук I-V використовували експрес-метод В.Б. Прозоровського [8]. Дослідження проводили на білих нелінійних мишах-самцях вагою 17,0±2,0 г віком 2-3 місяці; шлях введення - підшкірний. Вивчення протипухлинної активності здійснювали згідно рекомендацій Фармакологічного центру МОЗ України в онкофармакологічних експериментах із використанням пухлини головного мозку людини. Препарати вводили в дозах, які відповідали 1/4-1/5 ЛД₅₀. Одержані результати опрацьовували статистично [10].

Результати й обговорення

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану або 1,1-діетилкарбоксі-2-хлоро-2-трифторометилетилену в якості фторвмісних синтонів з 5-нітроурацилом у молярному співвідношенні 1:2 та 1:1 у системі розчинників (бензен-ДМФА-діетиловий етер) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-естером (лужне середовище) синтезовано нові моно- та біс-похідні I-V з фармакофорними групами - (CF₃)C=C(COOC₂H₅)₂, =C=CBrCl, -CF₂-CHBrCl, -(HO)C=CBrCl (схема 1).

Визначення одного із головних фармакологічних індексів деяких із синтезованих гетероциклічних моно- та біс-похідних 5-нітроурацилу - гострої токсичності показало, що вони відносяться до малотоксичних: значення ЛД₅₀ їх коливаються в інтервалі від 262 мг/кг до 185 мг/кг. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук у літературі не описано, препаратами порівняння були відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил (5-ФУ). Препарат порівняння 5-ФУ відноситься до малотоксичних сполук і має середньотоксичну дозу 375 мг/кг [8]. При введенні підшкірно речовин I-III у піддослідних тварин ми спостерігали тонічні та клоніко-тонічні судоми впродовж 1-2 годин, блювання і після 3-5 годин - тремор (табл. 1).

Біс-похідне III досліджено нами в онкофармакологічних експериментах із використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) у підкапсульному тесті за методом Богдена. Маса гетеротрансплантату злякисної гліоми після дії біс-похідного III зменшилася від 2.68±0.102 мг до 1.85±0.102 мг, що відповідає за результатами морфологічного контролю 27.48% гальмування росту пухлини (критерій ≥25.0% гальмування росту клітин пухлини). Це у 1,1 рази більше, ніж % гальмування росту клітин пухлини стандартного критерію. При порівняльному гістологічному дослідженні клітинно-тканевих реакцій пухлини при лікуванні потенційним протипухлинним препаратом - біс-похідним III в умовах субклітинного тестування встановлено залежність між вираженими регресійними змінами пухлин та рівнем гальмування їх росту. Зазначений ефект вважається вираженим щодо подальшого вивчення біс-похідного III при пухлинах головного мозку.

Висновки

1. Опрацьовано ефективний метод синтезу нових моно- та біс-похідних 5-нітроурацилу із фармакофорними групами -(CF₃)C=C(COOC₂H₅)₂, =C=CBrCl, -CF₂-CHBrCl, -(HO)C=CBrCl в умовах

Таблиця 1

Параметри токсичності сполук I-III, порівняно із 5-ФУ

Продукт	ЛД ₅₀ , мг/кг
N ₍₁₎ -(1',1'-дифторо-2'-бромо-2'-хлороетил)-5-нітроурацил (I)	185.00
N ₍₁₎ -(2'-бромо-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-нітроурацил (II)	241.00
N ₍₁₎ ,N _(1') -(2''-бромо-2''-хлороетеніл)-біс-(5-нітроурацил) (III)	262.00
5-ФУ (контроль) [8]	375.00

РЕАКЦІЇ В УМОВАХ МІЖФАЗНОГО КАТАЛІЗУ В ЛУЖНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

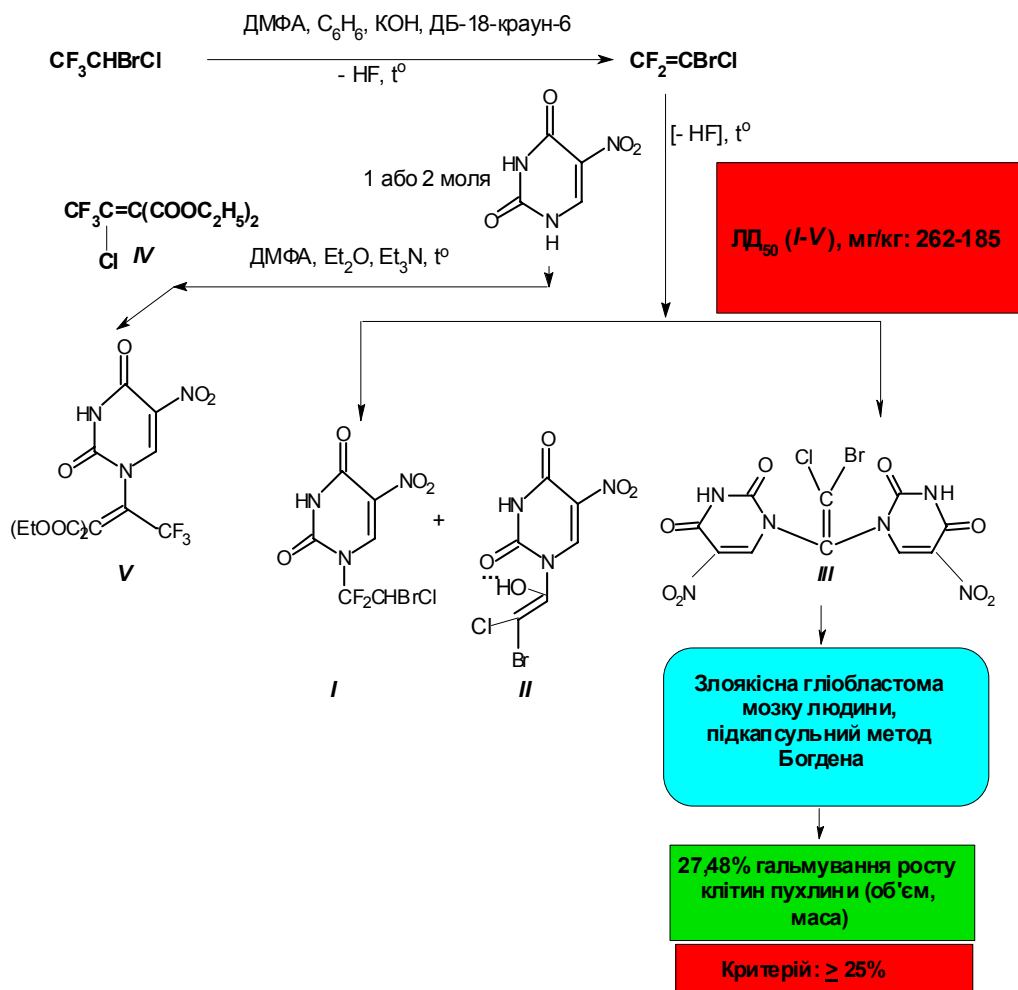


Схема 1

міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-естером.

2. Варіювання умов проведення реакцій та внесення змін до методів синтезу дозволили отримати синтезовані сполуки високої чистоти та збільшити їх практичний вихід до 80%.

3. Будову синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ-, ЯМР¹H-спектроскопії, а індивідуальність - методами тонкошарової та газорідинної хроматографії.

4. Встановлено, що більшість із синтезованих сполук відносяться до малотоксичних сполук: значення їх LD₅₀ коливається в інтервалі від 262 мг/кг до 185 мг/кг.

5. Синтезовані похідні досліджено в онкофармакологічних експериментах із використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) у підкапсульному тесті за методом Богдена.

6. Встановлено, що маса гетеротрансплантату злоякісної гліоми після дії біс-похідного 5-нітро-

урацилу зменшується. Зазначений протипухлинний ефект вважається вираженим щодо подальшого вивчення біс-похідного 5-нітроурацилу при пухлинах головного мозку.

Література

1. Adjei A: A review of pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer. Clin Pharmacol 1999, 48, 265-277.
2. Barlow R. Introduction to the chemical pharmacology / R. Barlow. - Moscow.: Izdatelstvo inostrannoy literatury, 1959. - 107 p. Russian (Барлоу Р. Введение в химическую фармакологию / Р. Барлоу. - М.: Издательство иностранной литературы, 1959. - 107с.).
3. Herus I.I., Kolicheva M.T., Yaguposkij Yu.L., Kukhar V.P. 1-Alcoxy(aryloxy)-1,1-difluoro-2-chloro-2-bromoethans. Journal of organic chemistry 1989; 25: 2020-2021. Russian (Герус И.И., Кольчева М.Т., Ягупольский Ю.Л., Кухар В.П. 1-Алкокси (арилокси)-1,1-дифтор-2-хлор-2-бромэтань. Журнал органической химии 1989; 25: 2020-2021).
4. Isikava N., eds. Fluoro-compounds. Synthesis and using. - Moscow: Mir, 1990. - 265 p. Russian (Исикава Н., ред. Соединения фтора. Синтез и применение. - М.: Мир,

1990. - 265с.).
5. Longey DB, Harkin DP, Jonson PG: 5-fluorouracil - mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews. Cancer* 2003, 3, 330-338.
 6. Milano G, Chamorey AL: Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *Chronobiol Intern* 2002, 19(1), 177-189.
 7. Noordhuis P, Holwerda U: 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthetase inhibition human colorectal cancer. *Annals of oncol* 2004, 15, 1025-1032.
 8. Prozorovskij V.B., Prozorovskij V.P., Demchenko V.M. Express method of determination of the middle dose's effectivity and its mistakes. *Pharmacology and toxicology* 1978; 41(4): 407-509. Russian (Прозоровский В.Б., Prozorovskij V.П., Демченко В.М. Экспресс метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки. *Фармакология и токсикология* 1978; 41(4): 407-509).
 9. Radchenko O.A., Proshakova E.V., Il'chenko A.Ya. 2-Bromo-1,1-difluoro-2-chloroethylation of acetylenes alcohols. *Journal of organic chemistry* 1991; 27: 2231-2232. Russian (Радченко О.А., Прошаклова Е.В., Ильченко А.Я. 2-Бром-1,1-дифтор-2-хлорэтилирование ацетиленовых спиртов. *Журнал органической химии* 1991; 27: 2231-2232).
 10. Soph'ina Z.P., Syrkin A.B., Holdin A., Klyin A., eds. *Experimental marking of antitumour drugs in SSSR and USA. Moscow: Medicine, 1979. - 296 p. Russian (Софьина З.П., Сыркин А.Б., Голдин А., Кляйн А., редакторы. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. М.: Медицина, 1979.- 296 с.).*
 11. Welchinska O.V., Sharikina N.I., Kovalenko E.O. Finding of anticancer medical drugs by way of creation of new ant metabolites of pyrimidin's change - bis-derivatives of 5(6)-substituted uraciles and their molecular complexes with bacterial lectines. *Naukovy zapyski Ternopolskogo natsionalnogo pedagogichnogo universitetu imeny V. Hnatuka. Seria: biology* 2008; 1(35): 62-68. Ukrainian (Вельчинська О.В., Шарикіна Н.І., Коваленко Е.О. Пошук засобів лікування пухлинної хвороби шляхом створення нових антиметаболітів піримідинового обміну - біс-похідних 5(6)-заміщених урацилів та їх молекулярних комплексів з бактерійними лектинами. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер.: біологія* 2008; 1 (35): 62-68).
 12. Yagupolskij L.M. Aromatic and heterocyclic compounds with fluorocontaining substitutes/ L.M. Yagupolskij. - Kyiv.: Naukova dumka, 1988. - 105 p. Russian (Ягупольский Л.М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М. Ягупольский. - К.: Наукова думка, 1988. - 105 с.).