

УДК 547.854.4 + 547.431.4 + 547.96

ХІМІКО-БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ 5-БРОМОУРАЦИЛУ

¹О.В. Вельчинська, ¹В.В. Вільчинська, ²Н.Є. Чумак

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

²ДП "Науковий токсикологічний центр імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України, м. Київ

РЕЗЮМЕ. Описано нові препаративні методи синтезу в умовах каталізу ДБ-18-краун-6-ефіром оригінальних похідних на основі 5-бромоурацилу та синтонів - фторотану та 1,1-діетилкарбоксі-2-хлор-2-трифлуорометилетилену. Встановлено, що синтезовані моно- та біс-похідні 5-бромоурацилу відносяться до малотоксичних: значення ЛД₅₀ їх знаходяться в інтервалі від 415 мг/кг до 396 мг/кг. Виявлено значний протипухлинний ефект біс-похідного 5-бромоурацилу на гетеротрансплантатах злоякісної гліоми людини з відсотком гальмування росту пухлини 43,8% (критерій $\geq 25\%$).

Ключові слова: 5-бромоурацил, фторотан, пухлина, токсичність.

РЕЗЮМЕ. Описаны новые препаративные методы синтеза в условиях катализа ДБ-18-краун-6-эфиром оригинальных производных на основе 5-бромоурацила и синтонов - фторотана и 1,1-диэтилкарбоксі-2-хлор-2-трифлуорометилетилену. Установлено, что синтезированные моно- и бис-производные 5-бромоурацила относятся к малотоксичным: значения ЛД₅₀ их находятся в интервале от 415 мг/кг до 396 мг/кг. Обнаружен значительный противоопухолевый эффект бис-производного 5-бромоурацила на гетеротрансплантатах злокачественной глиомы человека с процентом торможения роста опухоли 43,8% (критерий $\geq 25\%$).

Ключевые слова: 5-бромоурацил, фторотан, опухоль, токсичность.

SUMMARY. New convenient methods for the preparation with DB-18-crown-6-ether as catalyst of original derivatives on the base of 5-bromouracile and sintones - ftorotan and 1,1-diethylcarboxy-2-chloro-2-threefluoromethylethylene was described. It was discovered that mono- and bis-derivatives of 5-bromouracile which synthesized applies to a little toxic preparations: its LD₅₀ are at the interval from 415 mg/kg to 396 mg/kg. Strong antitumor effect of bis-derivative of 5-bromouracile on the heterotransplantates of the human glioma cancer with percentage of growth relaxation of cancer 43,8% has been discovered (the criteria are $\geq 25\%$).

Key words: 5-bromouracile, ftorotan, tumour, toxicity.

Лікування хворих на злоякісні новоутворення та пошук ефективних малотоксичних протипухлинних лікарських засобів — це одна з найважливіших проблем сучасної медицини та інших хіміко-біологічних наук, зокрема фармацевтичної хімії.

Знання особливостей ракової клітини, її метаболізму дозволяє прогнозувати напрямок хімічних і біологічних досліджень, проводити цілеспрямований синтез потенціальних ліків, оцінювати можливість їх застосування в онкологічній практиці в якості протипухлинних засобів.

Один з найуспішніших напрямків пошуку нових протипухлинних засобів стосується антиметаболітів піримідинового та пуринового обміну. Вони беруть участь як переформовані сполуки в біосинтетичних процесах (ДНК, РНК, специфічні білки), гальмуючи пухлинний ріст [1-4].

В арсеналі протипухлинних засобів значне місце посідають ліки, що відносяться до гетероциклічних систем (рак кишково-шлункового тракту та ін. [4-6].

Означена проблема пошуку нових протипухлинних засобів серед пуринових і піримідинових систем є вкрай актуальною. Але аналіз літературних наукових джерел показав: нині бракує сучасної інформації щодо даної проблеми у світлі останніх досягнень різних галузей науки.

Молекули 5(6)-фторо(галогено)заміщених урацилів та їх похідних здатні виконувати роль галогеновмісних синтонів в органічному синтезі, тому їх активно використовують для створення оригінальних біологічно активних молекул. Крім того, введення вказаних фармакофорів до гетероциклічної молекули призводить до підвищення розчинності сполук у ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими завдяки здатності легкого їхнього транспортування в організмі [7]. При цьому зазначена увага до фторо(галогено)вмісних фрагментів у нових молекулах передбачає підсилення антиметаболітних властивостей сполук.

Мета даної роботи полягає в хімічній модифікації молекули 5-бромоурацилу з подальшим вивченням біологічної активності нових синтезованих похідних 5-бромоурацилу. Після конструювання потенційно активних структур розроблено нові препаративні методи синтезу оригінальних гетероциклів на основі 5-бромоурацилу, а також фторовмісних синтонів — загального анестетика фторотану (2-бром-1,1,1-трифтор-2-хлоретану) або 1,1-діетилкарбоксі-2-хлор-2-трифторметилетилену; досліджено токсичність та протипухлинну активність одержаних сполук.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами дослідження стали: нові гетероциклічні моно- та біс-похідні, які синтезовано

на основі 5-бромоурацилу та фторотану або 1,1-діетилкарбоксі-2-хлор-2-трифторметилетилену в якості фторовмісних 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 пластинках 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 1H 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.

$N_{(1)}$ -(1',1'-дифлуоро-2'-бромо-2'-хлороетил)-5-бромоурацил (1), $N_{(1)}$ -(2'-бромо-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-бромоурацил (2). Приготування розчину № 1 проводили на основі 0.44 г (0.0079 моль) калій гідроксиду, 0.044 г ДБ-18-краун-6 в 20 мл сухого бензену та розчину 1.57 г (0.84 мл, 0.0079 моль) фторотану в 20 мл сухого етеру. Приготування розчину № 2. 1.51 г (0.0079 моль) 5-бромоурацилу розчиняють в 40 мл сухого ДМФА 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 7 годин (реакційна суміш мутніла та при нагріванні ставала коричневою), фільтрують у гарячому стані, охолоджують, відганяють простою перегонкою розчинники. Залишок — осад промивають 30 мл суміші діетиловий етер-гексан (1:1), сушать у вакуумі водострумного насосу. Кристалічний осад кремового забарвлення (1). Т пл. 282-285°C, вихід 42% (1.22 г). Знайдено, %: С 19.44; Н 0.80; N 7.53. $C_6H_3Br_2ClF_2N_2O_2$. Обчислено, %: С 19.56; Н 0.82; N 7.60. Охолоджений фільтрат залишають на ніч, відганяють розчинники. Залишок — масло кристалізують із суміші діетиловий етер-гексан (1:1). Осад, що випадав, сушать на повітрі (2). Т пл. 274-277°C, вихід 10,5% (0.28 г). 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.

Аналогічно синтезують сполуку $N_{(1)}$, $N_{(1)}$ -(2"-бромо-2"-хлороетеніл)-біс-(5-бромоурацил) (3) із 0.87 г (0.0044 моль) фторотану та 1.67 г (0,0088 моль) 5-бромоурацилу при перемішуванні реакційної суміші при температурі 80-90°C 12 годин. Синтезовану сполуку — кристалічний порошок кремового забарвлення промивають 30 мл метилового спирту, 10 мл

етилового етеру, сушать у вакуумі водострумного насосу. Т пл. з осмоленням 270-275°C, вихід 30% (3.69 г). Знайдено, %: С 22.8; Н 1.02; N 10.75; Br 45.96. $C_{10}H_4Br_3ClN_4O_4$. Обчислено, %: С 23.13; Н 0.77; N 10.78; Br 46.1.

1,1-діетилкарбоксі-2-трифлуорометил-2-хлороетилен (4).

1,1-діетилкарбоксі-2-трифлуорометил-2-(5'-бромоуридин- $N_{(1)}$ -)етилен (5).

Приготування розчину № 1 (I Стадія реакції). 6.13 г (0.268 моль) натрію металічного розчиняють в 250 мл метанолу безводного, додають краплями через ділильну лійку 43.0 г (40 мл, 0.268 моль) діетилового естеру малонової кислоти та 62.0 г (40 мл, 0.543 моль) трифлуороцтової кислоти при перемішуванні реакційної суміші та нагріванні. Кип'ятять суміш протягом 6 год, охолоджують до кімнатної температури, відганяють простою перегонкою розчинник. Залишок — скловидну масу білого кольору заливають діетиловим етером. Осад білого кольору (продукт А), що випадає відфільтровують та використовують на наступній стадії реакції.

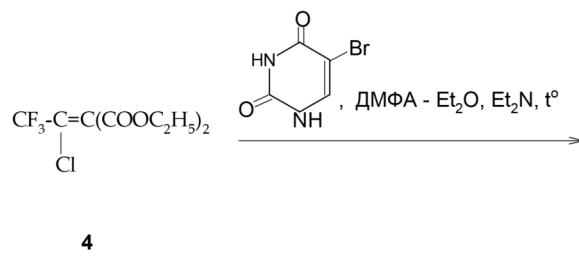
Приготування розчину № 2 (II Стадія реакції). 8.0 г (0.0287 моль) продукту А розчиняють в 55 мл сухого дихлоретану при кімнатній температурі, додають 6 г (0.0287 моль) фосфору пентахлориду. Реакційна суміш при нагріванні набуває молочного забарвлення. Гарячий розчин перемішують з кип'ятінням 5 годин, охолоджують, осад, що утворився, відфільтровують, промивають дихлоретаном, відганяють розчинник. Залишок — масло очищують перегонкою у вакуумі, Масло (продукт В) розчинне у ДМФА, діетиловому етері. Т кип. 56-59°C (25 мм рт. ст.), n_D^{25} 1.3010, вихід 80% (6.31 г) (4). 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 (III Стадія реакції). До суміші 0.34 г (0.001 моль) 5-бромоурацилу в 30 мл ДМФА безводного та 0.18 г (0.24 мл, 0.001 моль) триетиламіну безводного додають по краплях 0.5 г (0.001 моль) продукту В у 15 мл етеру діетилового безводного при перемішуванні реакційної суміші та нагріванні до 60-70°C. Кип'ятять суміш протягом 16 год (реакційна суміш яскраво-червоного забарвлення), фільтрують гарячий розчин та відділяють осад $N(C_2H_5)_3HCl$, відганяють розчинники у вакуумі. Залишок — масло жовтого забарвлення заливають гексаном та кип'ятять, зливають гексан декантацією, заливають ацетон. Осад рожевого забарвлення випадав із ацетону. Т пл. 255-260°C, вихід 33% (0.25 г) (5). Знайдено, %: С 37.03; Н 2.40; N 6.48; Br 19.0. $C_{13}H_{12}BrF_3N_2O_6$. Обчислено, %: С 36.4; Н 2.8; N 6.50; Br 18.64.

Під час проведення хіміко-біологічних досліджень нами були відібрані серед значної кількості синтезованих преформованих піримідинів та досліджено сполуки із значущою протипухлинною дією [8]. Слід зазначити, що в молекулах більшості з цих сполук гетероциклічні фрагменти пов'язані залишком молекули загального анестетика фторотану, який широко використовується в хірургічній онкологічній практиці [9, 10].

Дослідження параметрів гострої токсичності та протипухлинної активності моно- і біс-похідних 5-бромоурацилу виконано в Інституті фармакології та токсикології АМН України. Вивчення гострої токсичності (ЛД₅₀) проведено на білих нелінійних мишах-самцях з масою тіла 17,0±2,0г при підшкірному шляху введення. Результати досліду обраховано в альтернативній формі на 14 добу після введення. Статистична обробка проведена за [11]. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук у літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил. Доза речовини становила від 600 до 250 мг/кг. У піддослідних тварин спостерігалися тонічні судоми впродовж 1-2 годин, блювання.

Протипухлинну активність нових сполук: *N*₍₁₎-(1',1'-дифлуоро-2'-бромо-2'-хлороетил)-5-бромоурацил (**1**), *N*₍₁₎-(2'-бромо-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-бромоурацил (**2**), *N*₍₁₎,*N*_(1')-(2''-бромо-2''-хлороетеніл)-біс-(5-бромоурацил) (**3**), 1,1-діетилкарбокси-2-трифлуорометил-2-(5'-бромоуридин-*N*_(1')-етилен) (**5**) досліджено з використанням операційного та біопсійного матеріалу з пухлини мозку людини. При лікуванні гліобластоми людини в підкапсульному тесті за методом Богдена критерієм значення був відсоток гальмування росту гетеротрансплантату гліоми людини понад 25% [9, 11]. Курс лікувальних впливів становив 6 введень через добу при внутрішньоочеревинному шляху введення, згідно із правилами введення речовин до організму піддослідних тварин в інтервалі доз 1/4-1/5 ЛД₅₀. Результати обраховано через 24 години після закінчення лікування. Для вивчення специфічної протипухлинної активності досліджуваних сполук, їх розчиняли у фізіологічному розчині.



Результати дослідження та їх обговорення

За новими, розробленими нами методами синтезу, взаємодією фторотану в якості фторовмісного синтону з 5-бромоурацилом у мольному співвідношенні 1:2 та 1:1 в системі розчинників (бензен-ДМФА-діетиловий етер) в умовах міжфазного каталізу ДБ-18-краун-6-ефіром (лужне середовище); іншого фторовмісного синтону 1,1-діетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену в еквімолярних кількостях у системі розчинників (діетиловий етер-ДМФА-гексан-ацетон) синтезовано нові моно- та біс-похідні з фармакофорними групами =C=CBrCl, -CF₂-CHBrCl, -(HO)C=CBrCl, -(CF₃)C=C(COOC₂H₅)₂ (**1-5**) (рисунки 1-3).

Дослідження гострої токсичності синтезованих сполук (**1-5**) (табл. 1) показало, що монопохідні 5-бромоурацилу (**1, 2**) та біс-похідне 5-бромоурацилу (**3**) менш токсичні (у 1,05-

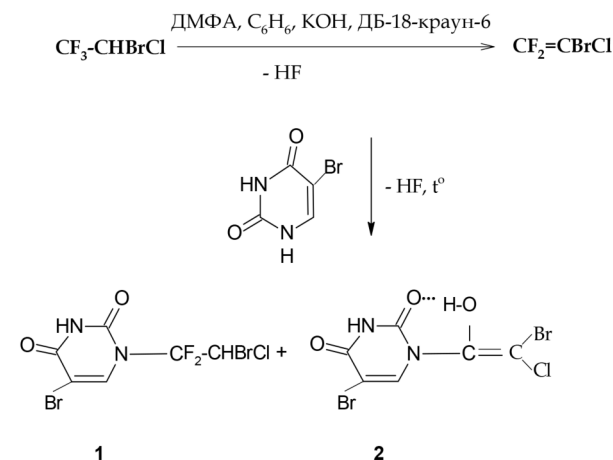


Рис. 1. Схема синтезу моно-похідних 5-бромоурацилу (**1, 2**)

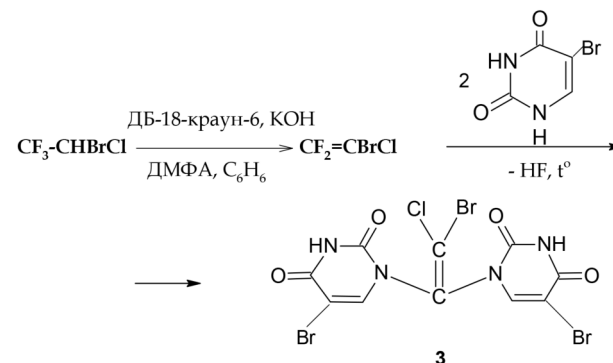


Рис. 2. Схема синтезу біс-похідного 5-бромоурацилу (**3**)

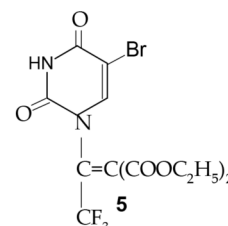


Рис. 3. Схема синтезу моно-похідного 1,1-діетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену (**4**) та 5-бромоурацилу (**5**)

1,11 рази), ніж 5-фторурацил (ЛД₅₀ становить 375 мг/кг). Значення їх ЛД₅₀ знаходяться в межах від 415 мг/кг до 396 мг/кг.

Таблиця 1

Параметри токсичності сполук (1-3) у порівнянні з 5-фторурацилом

№ п/п	Сполука	ЛД ₅₀ , мг/кг
1.	N ₍₁₎ -(1',1'-дифлуоро-2'-бромо-2'-хлороетил)-5-бромоурацил (1)	396
2.	N ₍₁₎ -(2'-бромо-1'-гідрокси-2'-хлороетеніл)-5-бромоурацил (2)	399
3.	N ₍₁₎ ,N _(1') -(2''-бромо-2''-хлороетеніл)-біс-(5-бромоурацил) (3)	415
4.	5-фторурацил (препарат порівняння)	375

Виявлено, що протипухлинна активність біс-похідного 5-бромоурацилу (3) значно перевищує прийнятий критерій значущості (>25,0% гальмування пухлинного росту). Після лікування тварин сполукою (3) маса гетеротрансплантатів злоякісної гліоми зменшувалася з 2,68±0,102 мг до 1,51±0,102 мг, що становить 43,8% гальмування росту пухлини. Це у 1,75 рази більше прийнятого критерію активності при лікуванні гліобластоми 25%, що підтверджено при проведенні морфологічного контролю.

При порівняльному гістологічному дослідженні клітинно-тканинних реакцій пухлини при лікуванні потенційною протипухлинною сполукою (3) в умовах субклітинного тестування встановлено залежність між вира-

женими регресивними змінами пухлин та рівнем гальмування їх росту. Зазначений ефект вважається вираженим щодо подальшого вивчення біс-похідного (3) при пухлинах головного мозку.

Таким чином, можна зробити висновок, що біс-похідне (3) має високу протипухлинну активність на злоякісній гліобластомі людини, значно перевищує протипухлинну активність препарату порівняння 5-фторурацилу, що дозволяє розглядати її як фізіологічно активну з перспективою подальшого вивчення за критеріями сучасних вимог до потенційних протипухлинних засобів для лікування людини.

Висновки

1. За новими, розробленими нами методами синтезу, взаємодією фторотану або 1,1-діетилкарбоксі-2-хлор-2-трифторметилетилену з 5-бромоурацилом в молярному співвідношенні 1:2 або еквімолярних кількостях в умовах міжфазного каталізу ДБ-18-краун-6-ефіром синтезовано нові моно- та біс-похідні 5-бромоурацилу.
2. Дослідження гострої токсичності синтезованих сполук показало, що вони малотоксичні: значення їх ЛД₅₀ коливаються в межах від 415 мг/кг до 396 мг/кг.
3. При використанні пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдена, на підставі результатів експериментально-морфологічних досліджень зареєстровано виражений протипухлинний ефект біс-похідного 5-бромоурацилу з відсотком гальмування пухлинного росту 43,8% (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. 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.
6. Brown B.R. Biotransformation and hepatotoxicity of halothane / B.R. Brown, I.G. Sipes // *Biochem. Pharmacol.* — 1977. — Vol. 26. — P. 2091–2094.
7. Ягупольский Л.М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М. Ягупольский. — Киев: Наукова думка, — 1988. — С. 90–105.
8. Welchinska Hel.V. Biological activity of bacterial lectins and their molecular complexes with heterocyclic bis-adducts / Hel.V. Welchinska, V. Piecuszak, E.A. Kovalenko, N.I. Sharykina [et al.] // *Мікробіол. журн.* — 2003. — Т.65, №6. — С. 20–25.
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.
11. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / [Под ред. Н.И. Переводчиковой, 2-ое изд. доп.]. — М.: Практическая медицина, 2005. — 704 с.

Надійшла до редакції 1.02.2013 р.