

УДК 547.854.4+547.431.4+547.96

О. В. Вельчинська<sup>1</sup>, канд. хім. наук, доц.,  
Е. О. Коваленко<sup>2</sup>, д-р біол. наук,  
Н. І. Шарикіна<sup>3</sup>, д-р мед. наук, проф.

## ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ НОВИХ АНТИМЕТАБОЛІТІВ ПІРИМІДИНОВОГО ОБМІНУ — БІС-ПОХІДНИХ 5(6)-ЗАМІЩЕНИХ УРАЦИЛІВ

<sup>1</sup>Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ,

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ,

<sup>3</sup>Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ

### Вступ

Одним із перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби є створення нових антиметаболітів пуринового та піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот і малих активних молекул [1]. Актуальність досліджень підтверджується чисельними роботами вітчизняної та світової літератури [2; 3]. Відомо, що пухлини використовують молекули урацилу активніше, ніж нормальні клітини. Оскільки ван-дер-ваальсові радіуси водню та фтору близькі, можна очікувати, що 5-фторурацил або його похідні будуть виконувати роль субстрату та/або інгібітора ферментів і переважно поглинатися тканинами пухлини.

Молекули 5(6)-фтор(галоген)заміщених урацилів та їх похідних здатні виконувати роль фтор(галоген)вмісних синтонів у органічному синтезі, тому їх активно використовують для створення оригіналь-

них біологічно активних молекул. Крім того, введення фтор(галоген)вмісних фармакофорів у гетероциклічну молекулу приводить до підвищення розчинності сполук у ліпідах і робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспортування в організмі [4]. Зазначена увага до фторвмісних фрагментів у нових молекулах викликана також підсиленням антиметаболічних властивостей цих сполук.

Описано метод введення до аліфатичного ланцюга або ароматичного кільця фармакофорної групи  $-\text{CF}_2\text{CHBrCl}$  при використанні доступного реагенту та лікарського засобу фторотану з метою синтезу біологічно активних сполук [5]. Взаємодія фторотану з основою супроводжується елімінуванням фтористого водню та генеруванням проміжного продукту 2-бром-1,1-дифтор-2-хлоретилену, який безпосередньо реагує з молекулами спиртів при каталізі основою. Дана реакція дозволяє виявити нову страте-

гію для синтезу селективно поліфункціональних молекул, хімічна будова яких дозволяє введення в молекулу нових фармакофорних фрагментів.

**Мета** даної роботи полягає у визначенні преформованих піримідинів, їх синтезі, вивченні хімічних і фізико-хімічних характеристик, вивченні їх біологічних властивостей, а саме: гострої токсичності та проти-пухлинної дії.

### Матеріали та методи дослідження

Нові гетероциклічні біс-похідні синтезовані на основі 5(6)-заміщених урацилів і фторотану. Абсолютні розчинники дістають у такий спосіб: ацетонітрил переганяють над  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 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. Інфрачервоні (ІЧ) спектри записують на

спектрофотометрі UR-20 (виробник “Charles Ceise Hena”, Німеччина).

Газорідинну хроматографію (ГРХ) проводять на газорідинному хроматографі “Perkin Elmer” з УФ-детектором (виробник “Perkin”, Німеччина). Спектри ЯМР<sup>1</sup>H записують на приладах “Bruker WP-200” (виробник “Bruker”, Швейцарія), “Varian T-60” (виробник “Varian”, США) з робочою частотою 200-132 МГц у DMSO-d<sub>6</sub> з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту.

*N*<sub>(1)</sub>,*N*<sub>(1')</sub>-(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 °С приблизно 15 хв 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:* 1,11 г (0,0088 моль) 6-метилурацилу розчиняють у 40 мл сухого диметилформаміду при температурі 60 °С в окремому хімічному посуді. Гарячий розчин № 2 додають краплями через ділильну лійку до розчину № 1, перемішують при температурі 60–80 °С 1 год (реакційна 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) і сушать у вакуумі водоструминного насоса. Сполука I — кристалічний порошок жовтого забарвлення, нестійкий до дії гарячого орга-

нічного розчинника; при пере-кристалізації розкладається до вихідного урацилу. Вихід 1,85 г (43 %); T<sub>топл</sub> 286–287 °С. Знайдено, %: С 38,80; Н 3,2; N 14,8. C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>BrClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>. Обчислено, %: С 37,1; Н 2,58; N 14,38; ІЧ-спектр (KBr), см<sup>-1</sup>: 515, 550, 690, 850 (C-Cl, C-Br); 960–970 (trans-C=C-); 1710, 1750 (C=O); 2800–3000 (CH<sub>3</sub>). ЯМР<sup>1</sup>H: 2,004 (6H, с., 2CH<sub>3</sub>), 5,313 (2H, с., 2C<sub>(3)</sub>-H), 10,832 (2H, д., 2N<sub>(3)</sub>H, J<sub>H,H</sub><sup>4</sup> 9,6 Гц).

Аналогічно синтезують сполуки: *N*<sub>(1)</sub>,*N*<sub>(1')</sub>-(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-метилурацил) (II) із 0,87 г (0,0044 моль) фторотану та 1,11 г (0,0088 моль) 5-метилурацилу, *N*<sub>(1)</sub>,*N*<sub>(1')</sub>-(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) (III) із 0,87 г (0,0044 моль) фторотану та 1,15 г (0,0088 моль) 5-фторурацилу, *N*<sub>(1)</sub>,*N*<sub>(1')</sub>-(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-бромуррацил) (IV) із 0,87 г (0,0044 моль) фторотану та 1,67 г (0,0088 моль) 5-бромуррацилу, *N*<sub>(1)</sub>,*N*<sub>(1')</sub>-(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-нітроурацил) (V) із 0,87 г (0,0044 моль) фторотану та 1,38 г (0,0088 моль) 5-нітроурацилу.

Сполука II — кристалічний порошок кремового забарвлення, кристалізується з суміші розчинників етанол — гексан (1 : 1). Вихід 1,58 г (36,8 %); T<sub>топл</sub> з осмоленням 265–268 °С. Знайдено, %: С 37,60; Н 3,08; N 14,53. C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>BrClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>. Обчислено, %: С 37,1; Н 2,58; N 14,38; ІЧ-спектр (KBr), см<sup>-1</sup>: 515, 615 (C-Hal), 1710, 1750 (C=O), 2800–3000 (CH<sub>3</sub>). ЯМР<sup>1</sup>H: 1,712 (6H, д., J<sub>H,H</sub><sup>2</sup> 5 Гц, 2CH<sub>3</sub>), 7,229 (2H, д., J<sub>H,H</sub><sup>2</sup> 5 Гц, 2C<sub>(6)</sub>H), 10,7 (2H, уш. с., 2N<sub>(3)</sub>H).

Сполука III — кристалічний порошок кремового забарвлення. Вихід 1,75 г (50 %); T<sub>топл</sub> 238–240 °С. Знайдено, %: С 30,08; Н 1,15; N 13,78. C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>BrF<sub>2</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>. Обчислено, %: С 30,21; Н 1,13; N 14,09; ІЧ-спектр (KBr), см<sup>-1</sup>: 510, 550, 690 (C-Cl, C-Br); 1150, 1210 (C-F); 1735, 1750 (C=O).

ЯМР<sup>1</sup>H: 4,532 (2H, уш. с., 2N<sub>(3)</sub>H), 7,447 (2H, д., 2C<sub>(6)</sub>-H).

Сполука IV — кристалічний порошок кремового забарвлення. Вихід 1,36 г (30 %); T<sub>топл</sub> з осмоленням 270–275 °С. Знайдено, %: С 22,8; Н 1,02; N 11,01; Br 45,96. C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>3</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>. Обчислено, %: С 23,13; Н 0,77; N 10,78; Br 46,1; ІЧ-спектр (KBr), см<sup>-1</sup>: 550–695 (C-Br), 1710, 1750 (C=O). ЯМР<sup>1</sup>H: 4,048 (2H, с., 2N<sub>(3)</sub>H in H<sub>2</sub>O), 7,66 (2H, с., 2C<sub>(6)</sub>H).

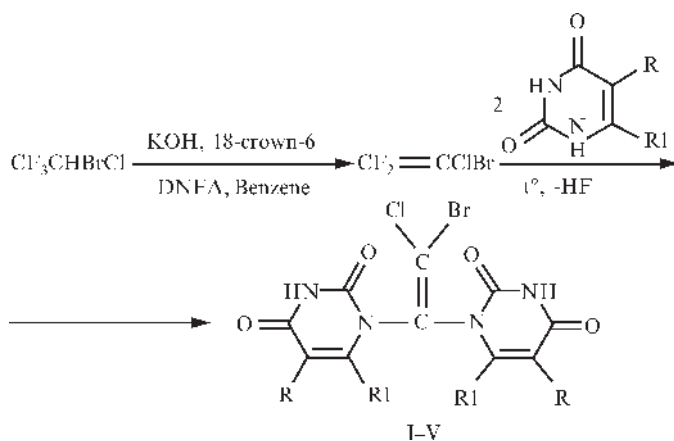
Сполука V — кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 2,24 г (56,5 %); T<sub>топл</sub> з осмоленням 290–295 °С. Знайдено, %: С 26,67; Н 1,02; N 17,79. C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>BrClN<sub>6</sub>O<sub>8</sub>. Обчислено, %: С 26,59; Н 0,89; N 18,60; ІЧ-спектр (KBr), см<sup>-1</sup>: 550–690 (C-Hal), 1710, 1750 (C=O). ЯМР<sup>1</sup>H: 8,861 (2H, с., 2×C<sub>(6)</sub>H), 10,226 (2H, с., 2N<sub>(3)</sub>H).

Для визначення середньотоксичної дози ЛД<sub>50</sub> синтезованих сполук використовували експрес-метод В. Б. Прозоровського [6]. Дослідження проводили на білих нелінійних мишах-самцях масою (22,0±2,0) г; шлях введення — підшкірний.

Протипухлинну активність вивчали згідно з рекомендаціями Фармакологічного центру МОЗ України на моделях експериментального пухлинного росту різного генезу. Препарати вводили в дозах, які відповідали 1/4–1/6 ЛД<sub>50</sub>. Одержані результати оброблено статистично [7].

#### Результати дослідження та їх обговорення

За новим, розробленим нами методом синтезу взаємодією фторотану як фторвмісного синтону й урацилів у молярному співвідношенні 1 : 2, у системі розчинників (бензол — діетилформамід — діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром у лужному середовищі син-



де R = H, R1 = CH<sub>3</sub> (I); R = CH<sub>3</sub>, R1 = H (II); R = F, R1 = H (III); R = Br, R1 = H (IV); R = NO<sub>2</sub>, R1 = H (V).

Рисунок. Біс-похідні урацилів

тезовано нові біс-похідні урацилів з фармакофорною групою =C=CBrCl, (I–V) (рисунок).

В ІЧ-спектрах сполук (I–V) ідентифіковано сигнали зв'язків C–Hal при 510–1210 см<sup>-1</sup> інтенсивні сигнали карбонільних груп C=O гетероциклічних фрагментів молекули при 1710, 1735, 1750 см<sup>-1</sup>, сигнали CH<sub>3</sub>-груп для сполук (I, II) при 2800–3000 см<sup>-1</sup>. Співвідношення інтегральних інтенсивностей сигналів у ЯМР<sup>1</sup>H-спектрах сполук (I–V) підтверджує відсутність протона при атомі N<sub>(1)</sub>, які спостерігаються в молекулах вихідних урацилів при 11,00–11,25 м. д., а також наявність протонів у положеннях C<sub>(5)</sub>H (I) та C<sub>(6)</sub>H (II–V) гетероциклічних ядер при 5,313 і 7,229–8,861 м. д. відповідно, протонів у положенні N<sub>(3)</sub>H гетероциклічних ядер при 4,048–10,832 м. д., які частково дейтеруються.

5-Фторурацил із його властивостями у процесі метаболізму утворювати інтермедіати, що включаються до структури ДНК, РНК, гальмують активність тимідилатсинтетази, яка забезпечує синтез ДНК і РНК його попередниками, знаходиться у центрі уваги пошуку нових сполук із зазначеною спрямованістю дії. Для подальших досліджень біологічних властивостей відібрано біс-по-

хідні 5-метилурацилу (сполука II), 5-фторурацилу (сполука III) і 5-бромурцилу (сполука IV), які за хімічною будовою та наявністю фармакофорних груп є найбільш близькими до відомого лікарського засобу — 5-фторурацилу. Практичний інтерес до потенційних лікарських засобів зумовлений їх постійною дією на макроорганізм. Дослідження глибоких перетворень чутливих клітин під впливом цих речовин є важливим аспектом фармакології. Визначення одного з головних фармакологічних індексів гетероциклічних біс-похідних — гострої токсичності — показало, що сполуки II та IV належать до малотоксичних: ЛД<sub>50</sub> їх дорівнює 515 і 415 мг/кг, відповідно (табл. 1). Сполука III також належить до малотоксичних сполук, ЛД<sub>50</sub> її становить 125 мг/кг, що перевищує токсичність попередніх сполук у 4,12 та 3,32 рази відповідно. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук у 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 вищевказаних хімічних речовин у дослідних тварин спостерігалися тонічні та

клоніко-тонічні судоми впродовж 1–2 год, блювання, а після 3–5 год — тремор.

Оцінка протипухлинної активності біс-похідних проводилася за показниками відсотка гальмування росту пухлин на двох типах пухлинної хвороби: лімфосаркомі Пліса та саркомі 45. Для контролю використовували, як і в дослідях токсичності, 5-фторурацил, який виявляє активність при інооперабельній і рецидивній пухлині шлунка, товстої та прямої кишки, пухлин молочної та підшлункової залоз, яєчників [8]. Під час вивчення протипухлинної активності значний інтерес становило похідне загального анестетика фторотану та 5-фторурацилу (III). Згідно із зауваженнями клініцистів, фторотан є найбільш зручним лікарським засобом, який дає позитивні результати при операційних втручаннях в онкологічних хворих. Саме ця сполука N<sub>(1)</sub>,N<sub>(1')</sub>-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) (III) була вивчена в онкофармакологічних експериментах. Для синтезованої сполуки III відмічено значну протипухлинну дію відносно лімфосаркоми Пліса (75,3 %) і відсутність протипухлинної дії при саркомі 45 (16,9 %). Одержані дані подано у табл. 2.

Таким чином, висока протипухлинна активність синтезованих гетероциклічних біс-похідних дозволяє розглядати ці сполуки як потенційні лікарські протипухлинні засоби і відкри-

Таблиця 1  
Параметри гострої токсичності гетероциклічних біс-похідних

Біс-похідне	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг
Сполука II	515
Сполука III	125
Сполука IV	415
5-фторурацил (контроль)	375

Протипухлинна активність сполуки III

Препарат	Доза, мг/кг	Середня маса пухлини, г		Гальмування росту пухлини, %
		контроль	дослід	
Лімфосаркома Пліса				
Сполука III	50,0	27,66	6,83	75,3*
5-фторурацил (контроль)				55,0**
Саркома 45				
Сполука III	30,0	62,7	52,12	16,9
5-фторурацил (контроль)				18,4**

Примітка. \* — загибель однієї тварини у дослідній групі; \*\* — за [6].

ває нові перспективи для подальшої роботи у цьому напрямку онкофармакології.

### Висновки

1. За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану як фторвмісного синтону й урацилів у молярному співвідношенні 1 : 2 у системі розчинників (бензол — диметилформамід — діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром у лужному середовищі синтезовано нові біс-похідні урацилів із фармакофорною групою =C=CBrCl.

2. Будову синтезованих сполук (I–V) підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ-, ЯМР<sup>1</sup>H-спектроскопії, а індивідуальність — методами тонко-

шарової та газорідинної хроматографії.

3. Встановлено, що сполуки II і IV належать до малотоксичних: LD<sub>50</sub> їх дорівнює 515 і 415 мг/кг відповідно. Сполука III також належить до малотоксичних сполук, LD<sub>50</sub> її становить 125 мг/кг, що перевищує токсичність попередніх сполук у 4,12 і 3,32 рази відповідно.

4. Для похідного загального анестетика фторотану та 5-фторурацилу (III) відмічено значну протипухлинну дію відносно лімфосаркоми Пліса (75,3 %) і відсутність протипухлинної дії при саркомі 45 (16,9 %).

### 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 oncology*. — 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. Longey D. B. 5-fluorouracil — mechanisms of action and clinical strategies : *Nature Reviews* / D. B. Longey, Paul D. Harkin, Patrick G. Jonson // *Cancer*. — 2003. — Vol. 3. — P. 330-338.

4. Ягупольский Л. М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л. М. Ягупольский. — К. : Наук. думка, 2006. — С. 90-105.

5. Biological activity of bacterial lectins and their molecular complexes with heterocyclic bis-adducts / Hel. V. Welchinska, B. Piecuszak, E. A. Kovalenko [et al.] // *Мікробіологічний журнал*. — 2003. — Т. 65, № 6. — С. 20-25.

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

7. Экспериментальная оценка протипухольных препаратов в СССР и США / под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина, А. Голдина, А. Кляйна. — М. : Медицина, 1979. — 296 с.

8. Противоопухольная терапия : справочник / А. М. Гарин, А. Б. Сыркин, М. Б. Бычков [и др.] ; под ред. Н. И. Переводчиковой. — М. : Медицина, 1986. — 208 с.

УДК 547.854.4+547.431.4+547.96

О. В. Вельчинська, Е. О. Коваленко, Н. І. Шарикіна  
ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ НОВИХ АНТИМЕТАБОЛІТІВ ПІРИМІДИНОВОГО ОБМІНУ — БІС-ПОХІДНИХ 5(6)-ЗАМІЩЕНИХ УРАЦИЛІВ

Описано новий препаративний метод синтезу гетероциклічних біс-аддуктів 5(6)-заміщених урацилів із фторотаном при каталізі 18-краун-6-комплексом. Будову синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ-, ЯМР<sup>1</sup>H-спектроскопії, а індивідуальність — методами тонкошарової та газорідинної хроматографії. Встановлено, що синтезовані сполуки належать до малотоксичних: LD<sub>50</sub> їх коливається від 515 до 125 мг/кг. Виявлено високий протипухлинний ефект біс-аддукту 5-фторурацилу: гальмування росту пухлини лімфосаркоми Пліса сягало 75,3 %.

**Ключові слова:** 5-фторурацил, фторотан, пухлини, краун-ефір, катализ.

UDC 547.854.4+547.431.4+547.96

О. V. Velchinska, E. O. Kovalenko, N. I. Sharykina  
PERSPECTIVES OF CREATION OF NEW ANTIMETABOLITES OF PYRIMIDINES CHANGE — BIS-DERIVATIVES OF 5(6)-SUBSTITUTED URACILES

A new convenient method for the preparation of heterocyclic bis-adducts of 5(6)-substituted uraciles with fluorotan with 18-crown-6-complex as catalyst was described. The structure of synthesized compounds has been confirmed by data of elemental analysis, UV-, IR- and NMR<sup>1</sup>H-spectra. The purity has been tested by method of thin-layer and gas-liquid chromatography. It was discovered that compounds, which synthesized apply to little toxic preparations: LD<sub>50</sub> are from 515 to 125 mg/kg. A strongly antitumour effect of bis-adduct of 5-fluorouracile has been discovered: growth relaxation of Plissa Lymphosarcoma tumour mass was 75.3%.

**Key words:** 5-fluorouracile, fluorotan, cancer, crown-ether, catalysis.