

Академік НАН України **В. С. Підгорський, О. В. Вельчинська, Е. О. Коваленко, Н. І. Шарикіна**

Шляхи створення нових антиметаболітів піримідинового обміну — біспохідних 5(6)-заміщених урацилів та їх молекулярних комплексів з бактерійними лектинами

*Описано новий препаративний метод отримання гетероциклічних бісаддуктів 5(6)-заміщених урацилів з фторотаном при каталізі 18-краун-6-комплексом. Виявлено високий протипухлинний ефект бісаддукту 5-фторурацилу та його комплексів з позаклітинними лектинами сапрофітних штампів бактерій роду *Bacillus* (*B. subtilis* 668 IMV та *B. poutuxa* 102 KDU): гальмування росту пухлини лімфосаркоми Пліса сягало 62,8–75,3%, саркоми 45 — 16,9–81,1%.*

Одним з перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби є створення нових антиметаболітів пуринового та піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот та малих активних молекул [1]. Дослідження з цього напрямку є надзвичайно актуальними, що підтверджується численними роботами [2, 3], і набули практичного інтересу після синтезу похідних урацилу, зокрема 5-фторурацилу та фторафуру, у яких встановлено високу протипухлинну активність. Відомо, що пухлини використовують молекули урацилу активніше, ніж нормальні клітини. Оскільки ван-дер-ваальсові радіуси водню та фтору близькі за значенням, 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 в органічному синтезі, тому їх активно використовують для створення оригінальних біологічно активних молекул. Крім того, введення фтор(галоген)вмісних фармакофорів у гетероциклічну молекулу сприяє підвищенню розчинності сполук у ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспортування в організмі [4]. Інтерес до фторвмісних фрагментів у нових молекулах викликаний також підсиленням антиметаболітних 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 з поліфторалкоксигрупами [5, 6]. Взаємодія фторотану з основою супроводжується елімуванням фтористого водню та генеруванням проміжного продукту 2-бром-1,1-дифтор-2-хлоретилену, який безпосередньо реагує з молекулами спиртів при каталізі основою. Дана реакція дає можливість визначити нову стратегію для синтезу селективно поліфункціональних молекул, хімічна будова яких дозволяє введення в молекулу нових фармакофорних фрагментів.

Раніше було встановлено, що позаклітинні лектини сапрофітних бактерій з унікальною специфічністю до сіалових кислот здатні розпізнавати тонкі відмінності в їх структурі та справляти селективну протипухлинну дію [7, 8]. Розроблено основи для конструювання

на базі бактерійних лектинів ефективних лікарських засобів з принципово новим механізмом дії.

Мета проведеного дослідження полягала в означенні преформованих піримідинів, їх синтезі, вивченні хімічних та фізико-хімічних характеристик, створенні молекулярних комплексів синтезованих сполук з бактерійними лектинами та аналізі їх біологічних властивостей, а саме гострої токсичності та протипухлинної дії.

Об'єктами дослідження були нові гетероциклічні біспохідні, синтезовані на основі 5(6)-заміщених урацилів та фторотану; бактерійні лектини сапрофітних штамів *Bacillus subtilis* 668 IMV та *Bacillus polymyxa* 102 KDU (далі лектин 668 та лектин 102 з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України); молекулярні комплекси синтезованих сполук з бактерійними лектинами. Абсолютні розчинники одержували таким способом: ацетонітрил переганяли над P_2O_5 , діетиловий ефір — над металевим натрієм, диметилформамід та бензол — у вакуумі. Індивідуальність синтезованих сполук контролювали методом тонкошарової хроматографії на пластинах Silufol-254 у системі ацетонітрил — гексан 2 : 1. ІЧ спектри записували на спектрофотометрі UR-20 ("Charles Ceise Nena", Німеччина).

ГРХ здійснювали на газорідному хроматографі "Perkin Elmer" з УФ-детектором ("Perkin", Німеччина). Спектри 1H ЯМР записували на приладах "Bruker WP-200" ("Bruker", Швейцарія), "Varian T-60" ("Varian", США) з робочою частотою 200–132 МГц у 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 перемішували при 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 охолоджували до кімнатної температури, додавали 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 розчиняли в 40 мл сухого диметилформаміду при 60 °С в окремому хімічному посуді. Гарячий розчин № 2 додавали краплями через ділильну лійку до розчину № 1, перемішували при 60–80 °С протягом 1 год (реакційна суміш мутніла та при нагріванні набувала червоно-коричневого забарвлення), фільтрували у гарячому стані, охолоджували, відганяли простою перегонкою розчинники. Залишок — осад промивали 30 мл суміші діетиловий ефір — гексан (1 : 1) та сушили у вакуумі водоструминного насосу.

Сполука I — кристалічний порошок жовтого забарвлення, нестійкий до дії гарячого органічного розчинника; при перекристалізації розкладається до вихідного урацилу. Вихід 1,85 г (43%). Т. пл. 286–287 °С. 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 (*транс*-C=C–); 1710, 1750 (C=O); 2800–3000 (CH₃). 1H ЯМР: 2,004 (6H, с., 2CH₃), 5,313 (2H, с., 2C(5)–H), 10,832 (2H, д., 2N(3)H, $J_{H,H}^4 = 9,6$ Гц).

Аналогічно синтезували сполуки:

$N_{(1)}$, $N_{(1')}$ -(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;

$N_{(1)}$, $N_{(1')}$ -(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;

$N_{(1)}$, $N_{(1')}$ -(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;

$N_{(1)}$, $N_{(1')}$ -(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 із суміші розчинників етанол — гексан (1 : 1). Вихід 1,58 г (36,8%). Т.пл. з осмоленням 265–268 °С. Знайдено, %: С 37,60; Н 3,08; N 14,53. $C_{12}H_{10}BrClN_4O_4$. Обчислено, %: С 37,1; Н 2,58; N 14,38. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 515, 615 (C–Hal), 1710, 1750 (C=O), 2800–3000 (CH_3). 1H ЯМР: 1,712 (6H, д., $J_{H,H}^2 = 5$ Гц, 2x CH_3), 7,229 (2H, д., $J_{H,H}^2 = 5$ Гц, 2x $C_{(6)}H$), 10,7 (2H, уш. с., 2x $N_{(3)}H$).

Сполука **III** — кристалічний порошок кремового забарвлення. Вихід 1,75 г (50%). Т. пл. 238–240 °С. Знайдено, %: С 30,08; Н 1,15; N 13,78. $C_{10}H_4BrF_2ClN_4O_4$. Обчислено, %: С 30,21; Н 1,13; N 14,09. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 510, 550, 690 (C–C1, C–Br); 1150, 1210 (C–F); 1735, 1750 (C=O). 1H ЯМР: 4,532 (2H, уш. с., 2 $N_{(3)}H$), 7,447 (2H, д., 2 $C_{(6)}H$).

Сполука **IV** — кристалічний порошок кремового забарвлення. Вихід 1,36 г (30%). Т. пл. з осмоленням 270–275 °С. Знайдено, %: С 22,8; Н 1,02; N 11,01; Br 45,96. $C_{10}H_4Br_3ClN_4O_4$. Обчислено, %: С 23,13; Н 0,77; N 10,78; Br 46,1. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 550–695 (C–Br), 1710, 1750 (C=O). 1H ЯМР: 4,048 (2H, с., 2 $N_{(3)}H$ у H_2O), 7,66 (2H, с., 2x $C_{(6)}H$).

Сполука **V** — кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 2,24 г (56,5%). Т. пл. з осмоленням 290–295 °С. 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., 2x $C_{(6)}H$), 10,226 (2H, с., 2 $N_{(3)}H$).

Культивування бактерій проводили на модифікованому середовищі Гаузе, лектини одержували з культуральної рідини як описано раніше [8].

Молекулярні комплекси біспохідних гетероциклу з бактерійними лектинами отримували механічним перемішуванням двох компонентів у фізіологічному розчині в співвідношенні 1 : 1.

Для визначення середньотоксичної дози LD_{50} синтезованих сполук, бактерійних лектинів та молекулярних комплексів використовували експрес-метод В.Б. Прозоровського [9]. Дослідження проводили на білих нелінійних мишах-самцях масою ($22,0 \pm 2,0$) г; шлях введення — підшкірний.

Вивчення протиухлинної активності здійснювали згідно з рекомендаціями Фармакологічного центру МОЗ України на моделях експериментального пухлинного росту різного генезу. Препарати вводили в дозах, які відповідали 1/4–1/6 LD_{50} . Одержані результати обробляли статистично [10].

За новим розробленим нами методом синтезу взаємодією фторотану як фторвмісного синтону та урацилів у молярному співвідношенні 1 : 2 у системі розчинників (бензол — диметилформамід — діетиловий ефір) в умовах міжфазового каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром у лужному середовищі синтезовано нові біспохідні урацилів з фармакофорною групою $=C=SBrcI$ (**I–V**) (схема 1).

В ІЧ спектрах сполук **I–V** ідентифіковано сигнали зв'язків C–Hal при 510–1210 cm^{-1} , інтенсивні сигнали карбонільних груп C=O гетероциклічних фрагментів молекули при 1710, 1735, 1750 cm^{-1} , сигнали CH_3 -груп для сполук **I**, **II** при 2800–3000 cm^{-1} . Співвідношення інтегральних інтенсивностей сигналів у ЯМР 1H спектрах сполук **I–V** підтверджує відсутність протона при атомі $N_{(1)}$, що спостерігається в молекулах вихідних урацилів при 11,00–11,25 м. д., а також наявність протонів у положеннях $C_{(5)}H$ (**I**) та $C_{(6)}H$ (**II – V**) гетероциклічних ядер при 5,313 м. д. та 7,229–8,861 м. д. відповідно, протонів у положенні $N_{(3)}H$ гетероциклічних ядер при 4,048–10,832 м. д., які частково дейтеруються.

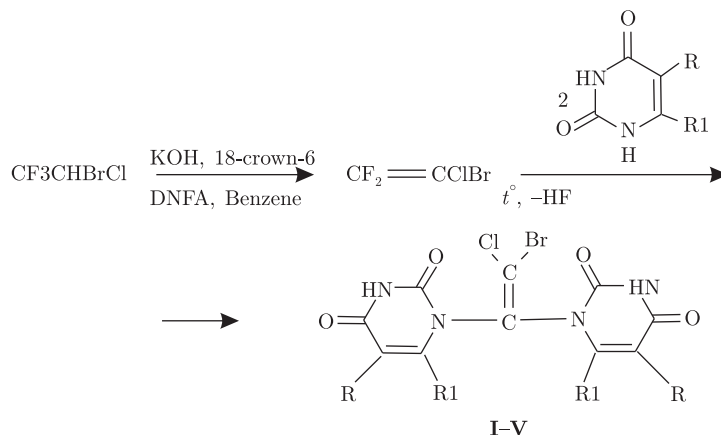


Схема 1. R = H, R1 = CH₃ (**I**); R = CH₃, R1 = H (**II**); R = F, R1 = H (**III**); R = Br, R1 = H (**IV**); R = NO₂, R1 = H (**V**).

5-фторурацил, який має здатність в процесі метаболізму утворювати інтермедіати, що включаються до структури ДНК, РНК, гальмують активність тимідилатсинтетази, яка забезпечує синтез ДНК та РНК його попередниками, знаходиться в центрі уваги пошуку нових сполук із зазначеною спрямованістю дії [11, 12]. Для подальших досліджень біологічних властивостей відібрано біспохідні 5-метилурацилу (сполука **II**), 5-фторурацилу (сполука **III**) та 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 біспохідних — гострої токсичності, показало, що сполуки **II** та **IV** належать до малотоксичних: їх ЛД₅₀ дорівнює 515 та 415 мг/кг відповідно (табл. 1). Сполука **III** також належить до малотоксичних сполук, її ЛД₅₀ 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, як препарат порівняння використовували відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил, що 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 і через 3–5 год — тремор.

Препарати бактерійних лектинів були більш токсичними порівняно зі сполуками **II** та **IV**; за показниками середньотоксичних доз вони належать до помірно токсичних (лек-

Таблиця 1. Параметри гострої токсичності гетероциклічних біспохідних, бактерійних лектинів та їх молекулярних комплексів

Біспохідне	ЛД ₅₀ , мг/кг	Бактерійний лектин	ЛД ₅₀ , мг/кг	Молекулярний комплекс	LD ₅₀ , мг/кг
Сполука II	515	Лектин 102	248	Сполука II + лектин 102	335
Сполука III	125	Лектин 668	89	Сполука III + лектин 668	137
Сполука IV	415	Лектин 102	248	Сполука IV + лектин 102	635
5-фторурацил (контроль)	375				

тин 668) та малотоксичних (лектин 102) (див. табл. 1). При вивченні клінічної картини впливу лектинів у токсичних дозах на організм тварин відмічається поява тонічних і кло-нічних судом та парез задніх кінцівок.

Молекулярні комплекси гетероциклічних біспохідних з бактерійними лектинами належать до малотоксичних речовин: їх ЛД₅₀ коливається між 635 та 137 мг/кг. Будь-яких закономірностей у виявленні токсичних властивостей для молекулярних комплексів не встановлено. Так, при з'єднанні більш токсичних речовин (сполука **III** та лектин 668) загальна токсичність молекулярного комплексу дещо зменшувалася (у 1,06 раза), а у комплексів з менш токсичними компонентами ЛД₅₀ або зростала (у 1,28 раза для сполуки **II** з лектином 102), або знижувалася (у 2,07 раза для сполуки **IV** з лектином 102).

Протипухлинну активність біспохідних, бактерійних лектинів та їх молекулярних комплексів оцінювали за процентом гальмування росту пухлин на двох типах пухлинної хвороби: лімфосаркомі Пліса та саркомі 45. За контроль використовували, як і в дослідах токсичності, 5-фторурацил, який виявляє активність при іноперабельній та рецидивній пухлині шлунка, товстої та прямої кишки, пухлин молочної та підшлункової залоз, яєчників [11]. При дослідженні протипухлинної активності значний інтерес становило похідне загального анестетика фторотану та 5-фторурацилу — N₍₁₎, N_(1')-(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) (**III**). Згідно із зауваженнями клініцистів, фторотан є найбільш зручним лікарським засобом, який дає позитивні результати при операційних втручаннях у онкологічних хворих [13, 14]. За даними онкофармакологічних експериментів синтезована сполука **III** характеризується значною протипухлинною дією відносно лімфосаркоми Пліса (75,3%) та відсутністю такої на саркомі 45 (16,9%).

Вивчення протипухлинної активності бактерійних лектинів щодо пухлин різного генезу (табл. 2) виявило виражену здатність гальмування росту експериментальних пухлин для лектину 102 на лімфосаркомі Пліса (50,0%), що дорівнювало критерію значущості, а для лектину 668 — на саркомі 45 (52,5%); останній лектин не виявляв активності відносно лімфосаркоми Пліса (9,0%). Для всіх молекулярних комплексів відмічено стабільну та виражену протипухлинну активність і високий відсоток первинного вилікування тварин: гальмування росту обох типів пухлин коливалось від 62,8 до 81,1% і перевищувало протипухлинну активність 5-фторурацилу в 1,14 раза для лімфосаркоми Пліса та в 4,46 раза для саркоми 45.

Таблиця 2. Протипухлинна активність сполуки **III**, бактерійних лектинів та їх молекулярних комплексів

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*
Лектин 668	16,0	42,0 ± 2,77	38,0 ± 3,22	9,0
Лектин 102	20,0	42,0 ± 2,77	21,0 ± 0,18	50,0
Сполука III + лектин 668	24,0	13,9 ± 1,93	1,8 ± 0,09	62,8
5-фторурацил (контроль)				55,0**
Саркома 45				
Сполука III	30,0	62,7	52,12	16,9
Лектин 668	20,0	2,5 ± 0,17	1,12 ± 0,24	52,5
Сполука III + лектин 102	30,0	13,9 ± 1,93	2,5 ± 1,30	81,1
5-фторурацил (контроль)				18,4**

*Загибель однієї тварини у дослідній групі. **За даними [9].

Таким чином, висока протипухлинна активність синтезованих гетероциклических біспохідних, бактерійних лектинів та їх молекулярних комплексів дозволяє розглядати ці сполуки як потенційні лікарські протипухлинні засоби і відкриває нові перспективи для подальших робіт у цьому напрямку онкофармакології.

1. Преображенская М. Н. Поиски противоопухолевых препаратов среди компонентов нуклеиновых кислот // Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. М. Менделеева. – 1973. – № 6. – С. 643–656.
2. Noordhuis P., Holwerda U. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthetase inhibition human colorectal cancer // Ann. oncol. – 2004. – 15. – P. 1025–1032.
3. Adjei A. A review of pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer // Clin. Pharmacol. – 1999. – 48. – P. 265–277.
4. Ягупольский Л. М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями. – Киев: Наук. думка, 1988. – С. 90–105.
5. Герус И. И., Колычева М. Т., Ягупольский Ю. Л., Кухарь В. П. 1-Алкокси(арилокси)-1,1-дифтор-2-хлор-2-бромэтаны // Журн. орган. хим. – 1989. – 25, вып. 9. – С. 2020–2021.
6. Вельчинская Е. В., Кузьменко И. Й., Ильченко А. Я. Гетероциклические соединения с фармакофорной галогензамещенной группой I. 2-бром-1,1-дифтор-2-хлорэтирование гетероциклических соединений с двумя гетероатомами // Хим. гетероцикл. соединения. – 1997. – № 7 (361). – С. 967–971.
7. Коваленко Э. А. Внеклеточные лектины бактерий // Микробиол. журн. – 1990. – 52, № 3. – С. 92–99.
8. Подгорский В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А. Лектины бактерий. – Киев: Наук. думка, 1992. – 203 с.
9. Прозоровский В. Б., Прозоровский В. П., Демченко В. М. Экспресс метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. – 1978. – 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. – Москва: Медицина, 1979. – 296 с.
11. Longey D. B., Harkin D. P., Jonson P. G. 5-fluorouracil – mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews // Cancer. – 2003. – 3. – P. 330–338.
12. Противоопухолевая терапия. Справочник / А. М. Гарин, А. Б. Сыркин, М. Б. Бычков и др.; Под ред. Н. И. Переводчиковой. – Москва: Медицина, 1986. – 208 с.
13. Brody G. L., Sweet R. B. Halothane anesthesia as a possible cause of massive hepatic necrosis // Anesthesiology. – 1963. – 24. – P. 29–37.
14. Brown B. R., Sipes I. G. Biotransformation and hepatotoxicity of halothane // Biochem. Pharmacol. – 1977. – 26. – P. 2091–2094.

Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Надійшло до редакції 11.09.2008

Academician of the NAS of Ukraine **V. S. Pidgorskyy, O. V. Welchinska, E. O. Kovalenko, N. I. Sharykina**

Ways of creation of new antimetabolites of pyrimidines change — bis-derivatives of 5(6)-substituted uraciles and their molecular complexes with bacterial lectins

A new convenient method for the preparation of heterocyclic bis-adducts of 5(6)-substituted uraciles with fluorotan with 18-crown-6-complex as a catalyst is described. A strong antitumor effect of bis-adduct of 5-fluorouracile and their complexes with saprophytic strains Bacillus genus (B. subtilis 668 IMV and B. polymyxa 102 KDU) extracellular lectins has been discovered: growth relaxation of Lymphosarcoma Plissa tumor mass was 62.8–75.3%, of Sarcoma 45: 16.9–81.1%.