



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75784** (13) **C2**  
(51) **МПК (2006)**  
**A61K 31/37** (2006.01)  
**C07D 311/12** (2006.01)  
**A61P 35/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) 3-(5-АМІНОУРАЦИЛ)-5,6-БЕНЗОКУМАРИНУ ГІДРОБРОМІД ТА ПРЕПАРАТ НА ЙОГО ОСНОВІ**

1

(21) 20040706070

(22) 21.07.2004

(24) 15.05.2006

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

(72) Марченко Михайло Маркович, Копильчук Галина Петрівна, Шмараков Ігор Олександрович, Кеца Оксана Віталіївна, Кушнір Василь Миколайович

(73) ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

(56) GB 2 014 180, A, 22.08.1979

US 4 256 900, A, 17.03.1981

US 5 744 475, A, 28.04.1998

RU 2 061 477, C1, 10.06.1996

Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США/Под ред. Софьиной З.П., Сыркина А.Б. (СССР), Голдина А., Кляйна А. (США). - М.: Медицина, 1979. - 296 с.

Будкер В.Г., Вахрушева Т.Е., Кеселева Е.В., Христолюбова Н.Б. Получение липосом с лекарственными препаратами. Химико-фармацевтический журнал. - 1987. - Т.XXI. - С. 347-352.

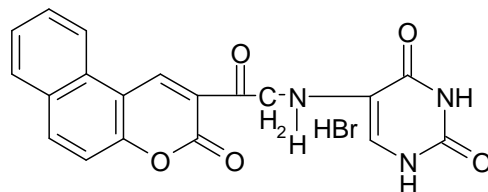
2

Орленко И. В., Коваленко С.Н. и др. Ансамбли циклов с кумариновым звеном. Физиологично активні речовини. - 2001. - № 2 (32). - С. 25-28

Машковский М.Д. Лекарственные средства: М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2002, т.2, С. 406-452.

The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Merck & Co., Inc., 1996.

(57) 1. 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарину гідробромід формули:



2. Препарат, що містить як активну сполуку 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарин гідробромід в ліпосомальній формі.

Винахід стосується нової сполуки, одержаної шляхом хімічного синтезу 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарину гідроброміду (БКУ) та ліпосомальної форми зазначеної речовини, які можуть використовуватись як протипухлинні засоби при хіміотерапії онкологічних захворювань.

Відомо, що похідні урацилу володіють протипухлинною активністю [1]. Найближчими за своєю структурною дією до даної сполуки є гетероциклічні ансамблі, що поєднують у собі структури кумарину і 5,6-бензокумарину та гетероциклів з вузловим атомом азоту, які виявляють високу активність до клітин лейкемії, а також володіють антимікробною дією [2].

Недоліки таких гетероциклічних ансамблів: низька ефективність протипухлинної дії та висока токсичність щодо солідних пухлин, відсутність антиоксидантної активності, двостадійний метод синтезу, погана розчинність препаратів у воді.

Подолання зазначених недоліків можливе шляхом створення протипухлинних препаратів, що

володіють протипухлинною активністю, поряд з низькою токсичністю при дії на солідні пухлини, які містять гетероциклічні ансамблі та поєднують у своїй структурі фрагменти урацилу та 5,6-бензокумарину.

Задача винаходу - створення протипухлинного препарату з низькою токсичністю. Задача вирішується шляхом синтезу нової сполуки 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарину гідроброміду (БКУ), що проявляє протипухлинну активність.

Відповідність критерію "новизна" полягає в тому, що ніде з літературних джерел не виявлено використання зазначеної речовини.

З відомого рівня техніки не впливає можливість використання синтезованої речовини як протипухлинного агенту. Ця обставина забезпечує відповідність критерію "винахідницький рівень".

"Промислова придатність" забезпечується можливістю впровадження в промислове вироб-

(13) **C2**

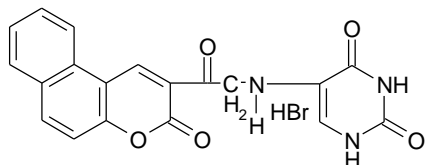
(11) **75784**

(19) **UA**

ництво, використовуючи традиційні методи синтезу та обладнання.

БКУ одержують взаємодією 5-аміноурацилу з 3-(со-бромацетил)-5,6-бензокумарином в середовищі органічних розчинників при нагріванні. До розчину 0,35г (0,0025 моль) 5-аміноурацилу в 100мл ДМФА при температурі 100°C додають розчин 0,8г (0,0025 моль) 3-(о)-бромацетил)-5,6-кумарину в 50 мл толуолу. Реакційну суміш витримують при температурі 120°C протягом 0,5 години і залишають на ніч. Оранжево-коричневі кристали фільтрують, промивають спиртом і висушують при температурі 80-90°C. Вихід: 0,7 г (60%) (Тпл 265-267°C, розклад.). ДМ80: вода, 1:6.

Речовина добре розчинна в ДМ80, ДМФА, водних розчинах лугів.



Знайдено %: С 48,92, 48,84; Н 3,10; N 9,77, 9,68; Br 18,80, 18,68.

$C_{19}H_{14}BrN_3O_5$

Вираховано %: С 48,49; Н 3,36; N 10,00; Br 19,06.

ІЧ спектр (табл. KBr),  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1730, 1720<sub>(C)</sub> (C=O); 3400, 3090 (NH).

Спектр ПМР в м.д. (DMSO- $D_6$ ) 4,48 с. (2H, N-CH<sub>2</sub>), 4,82 с. (1H, NH), 6,41 д. (1H, I=6 Гц), 7,66 м. (2H, H<sub>аром</sub>), 7,8 т. (1H, H<sub>аром</sub> I = 8 Гц), 9,4 с. (1H, H<sub>аром</sub>), 10,21 д. (1H, NH, I = 5 Гц), 11,24 с. (1H, NH<sub>имід</sub>).

Отримана речовина при введенні пухлиноносіям у вигляді водної емульсії проявляє протипухлинну активність та володіє токсичністю. З метою підвищення протипухлинної активності та зниження токсичності синтезованої речовини проводили конструювання ліпосомального препарату БКУ.

Для приготування лецитин-холестеринових ліпосом використовували кристалічний холестерин (фірми "Синбиас", Россия) та яєчний лецитин - стандарт (фірми "Біолік", Харків) у мольному співвідношенні 7:3. Ліпосоми отримували методом заморожування-відтаювання, який дозволяє залучити у ліпосоми 80% лікарського препарату [3].

Для цього брали лецитин-стандарт, холестерин і водний розчин маніту у концентрації 0,15 М.

Суміш ліпідів висушували на роторному випарнику до утворення плівки. Хімічний лікарський засіб розчиняли у диметилсульфоксиді (DMSO). До плівки ліпідів додавали 10% розчин БКУ і суміш диспергували на механічній мішалці типу GFL 3015. Суспензію ліпосом обробляли на ультразвуковому диспергаторі УЗДН 2Т із зануреним випромінювачем у режимі 44 кГц 20-30 мкА протягом 3 хвилин.

Отримані бішарові ліпосоми у закритій пробірці швидко заморожували у рідкому азоті (-195°C) й зразу поміщали пробірку у водяну баню (20-25°C). Розморожену суміш знову заморожували і процедуру повторювали 5 разів. Після останнього заморожування суміш розморожували при кімнатній температурі. Після ультрафільтрації зразки ліпосом продилялися під мікроскопом.

Як видно з фігури 1, в результаті дослідження дозування 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарину (БКУ) було встановлено, що напівлегальною дозою препарату є 14,8±4,2 мг/кг. При цьому оптимальна ефективна доза препарату становить 6 мг/кг, яка поряд з проявом протипухлинної активності володіла найнижчою токсичністю, що демонструвалася зменшенням темпів росту пухлини і збільшенням тривалості життя на 19%.

Аналіз показників протипухлинної активності досліджуваних препаратів показав, що серед обраних хіміотерапевтичних засобів найвищою активністю володіє ліпосомальна форма 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарину (лБКУ). Виявлена протипухлинна активність лБКУ, що показана на фігурі 2, кількісно та якісно переважала над цитостатичною дією немодифікованого 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарину (БКУ) та 5-фторурацилу (де, К - щури з карциною Герена, яким не вводили препарат; БКУ - пухлиноносії, яким вводили 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарин (БКУ); лБКУ - пухлиноносії, яким вводили 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарин (БКУ) в ліпосомах; Ф - пухлиноносії, яким вводили 5-фторурацил). Це у підсумку виражалось найвищими показниками гальмування росту пухлини (ГРП) і збільшенням тривалості життя (ЗТЖ) дослідних тварин.

Таблиця 1

Вплив похідних урацилу на ріст карциноми Герена

Доба	Контроль (об'єм, см <sup>3</sup> )	5-фторурацил (об'єм, см <sup>3</sup> )	БКУ(об'єм, см <sup>3</sup> )	лБКУ (об'єм, см <sup>3</sup> )
7	0,32±0,056	0,331±0,092	0,348±0,102	0,369±0,103
10	2,59±0,38	0,121±0,036*	1,86±0,28	1,62±0,21
14	6,72±0,66	-	4,71±0,57*	4,21±0,65*
17	9,61±1,42	-	6,61±0,68*	3,72±0,46 *
21	9,86±1,63	-	6,82±0,93*	2,52±0,31 *
26	10,32±1,84	-	7,44±1,32*	1,17±0,23*
28	-	-	7,68±1,43*	0,734±0,092 *
30	-	-	7,44±1,38*	0,592±0,064 *
35	-	-	-	0

Примітка:

ЧКУ- 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарину;  
лБКУ- ліпосомальний препарат БКУ.

Результати досліджень показали, що препарат БКУ володіє протипухлинною активністю, оскільки при його введенні спостерігалось гальмування росту пухлини дослідних тварин впродовж всього експерименту.

Поряд з цим відмічалася варіація показника гальмування росту пухлини (ГРП) в межах 28-31%, а у 10% спостерігалася повна регресія новоутворення. З отриманих результатів видно, що БКУ володіє протипухлинною активністю, проте ця активність фіксується на сталому рівні протягом усього експерименту. Таку відносно невисоку активність БКУ можна пояснити тим, що його дія не є пухлинне спрямованою (пасивна), а розподіл препарату відбувається по усіх тканинах організму.

З метою подолання пасивного розподілу БКУ в організмі пухлиноносія та підвищення його активності, шляхом збільшення концентрації у пухлині, препарат було введено у ліпосоми. Завдяки своїм колоїдним властивостям, невеликим розмірам, поверхневій активності, мембранотропності та біосумісності ліпосоми забезпечують доставку препаратів у кров'яне русло з мінімальними змінами його структури та активності. Проникаючи через кровоносні капіляри новоутворення, вони потрапляють безпосередньо у пухлину, "звільняючи" там свій вміст. Це пояснює високий рівень цитостатичної активності ліпосомального БКУ (лБКУ), що проявляється у зростанні відсотку гальмування росту пухлини (ГРП) до 89 % на 26-у добу експерименту, а також повною регресією карциноми Герена у 50% дослідних тварин.

Гальмування росту пухлини (90%) спостерігалось і при введенні 5-фторурацилу, але висока токсичність препарату призводила до

загибелі дослідних тварин. В той час, як ліпосомальний препарат БКУ поряд з його високим рівнем цитостатичної активності не зумовлював загибелі організму пухлиноносія.

Отже, пролонгований протипухлинний ефект лБКУ заслуговує особливої уваги, а властивість ліпосом створювати депо протипухлинного препарату в організмі відкриває нові перспективи для зниження дози цитостатика, а також моделювання режиму його введення.

Виражена м'якша дія лБКУ проявляється і у показниках збільшення тривалості життя (ЗТЖ) (рис. 3, табл. 2). Зокрема, щоденне реґос введення лБКУ збільшувало тривалість життя дослідних тварин на 71 %. Це вказує на його низьку токсичність у порівнянні з 5-фторурацилом, при введенні якого показник збільшення тривалості життя зменшувався на 60%.

Отже, ліпосомальна модифікація БКУ дозволяє вирішити дві проблеми застосування похідних урацилу для лікування злоякісних новоутворень, оскільки дана форма БКУ збільшує його цитостатичну активність поряд зі зниженням токсичної дії препарату.

Джерела інформації:

1. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). - М.: Медицина, 1979. - 296 с.

2. Ансамбли циклов с кумариновым звеном // Физиологичне активні речовини. - 2001. - № 3. - С. 25 - 28.

3. Будкер В.Г., Вахрушева Т.Е., Кеселева Е.В., Христолюбова Н.Б. Получение липосом с лекарственными препаратами // Химико-фармацевтический журнал. - 1987. - № 1. - С. 347 - 352.

Таблиця 2

Протипухлинна активність різних форм БКУ у порівнянні з 5-фторурацилом

Препарат	Доза, мг/кг	ГРП, % (доба)					ЗТЖ, %	Загибель від токсичності%	Регресія пухлини, %
		10	14	17	21	26			
БКУ	6	29	30	31	30	28	19	0	10
лБКУ	6	37	38	62	74	89	71	0	50
5-фторурацил	7,5	95	-	-	-	-	-60%	100	100

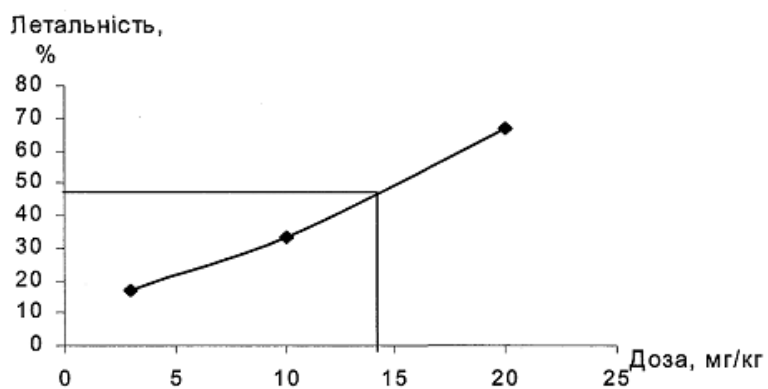
Примітка:

БКУ- 3-(5-аміноурацил)-5,6-бензокумарину;

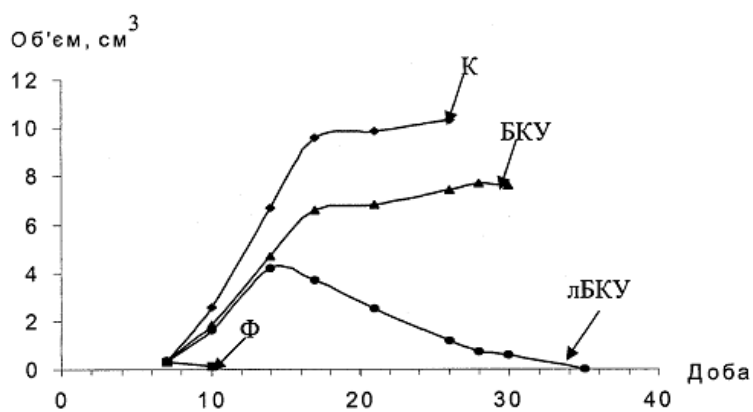
лБКУ - ліпосомальний препарат БКУ,

ГРП - гальмування росту пухлини;

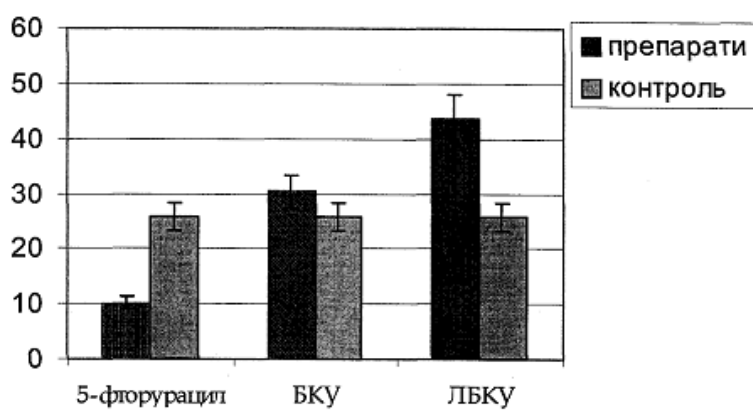
ЗТЖ - збільшення тривалості життя.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3