



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30779 (13) U

(51) МПК (2006)
C07D 239/00
C07C 21/00
A61K 33/16МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БІОТРАНСФОРМАЦІЇ СПОЛУКИ $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2"-БРОМ-2"-ХЛОРЕТЕНІЛ)-БІС-(5-ФТОРУРАЦИЛ), ЯКА МАЄ ВИРАЖЕНІ ПРОТИПУХЛИННІ ВЛАСТИВОСТІ

1

2

(21) u200712900

(22) 21.11.2007

(24) 11.03.2008

(72) ВЕЛЬЧИНСЬКА ОЛЕНА ВАСИЛІВНА, UA,
ШАРИКІНА НАДІЯ ІВАНІВНА, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, UA

(56)

(57) Спосіб визначення біотрансформації сполуки $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил), яка має виражені протиопухлинні властивості, шляхом проведення тонкошарової

хроматографії, який відрізняється тим, що до проведення хроматографування шурам-носіям пухлини вводять розчин сполуки $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) від 25 мг/кг до 32 мг/кг, через 30 хвилин проводять забір крові та отримують витяжку з пухлини, хроматографують окремо, результати хроматографування порівнюють з результатами контролю і при виявленні відповідного рівня розташування плям на хроматограмі обох сполук визначають біотрансформацію сполуки $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил).

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до розділу онкофармакології - "метаболізм протиопухлинних лікарських засобів (або субстанцій) в організмі".

Сполука $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) (далі сполука), яка має виражені протиопухлинні властивості, досліджена на моделях експериментального пухлинного зросту різного гістогенезу: Лімфосаркомі Пліса, Карциномі Герена, Саркомі 45. Структурні аналоги, які мають протиопухлинну активність, не відомі (літературний опис відсутній).

Вказані властивості дозволяє передбачити можливість використання отриманої сполуки в практичній медицині, а саме, в онкології.

Одним із найважливіших етапів дослідження нового протиопухлинного лікарського засобу є вивчення можливих шляхів його біотрансформації (метаболізму) в організмі людини, розподіл метаболітів в організмі, органах і тканинах, шляхи виведення лікарського засобу та його метаболітів із організму.

Сполука - біциклічний адукт $N_{(1)}, N_{(1')}$ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) (далі сполука), яка має виражені протиопухлинні властивості, містить в молекулі два залишки молекул 5-фторурацилу та фрагмент молекули фторотану (2-бром-1,1,1-трифтор-2-хлоретан), які

застосовуються у якості лікарських засобів при лікуванні онкологічних захворювань.

Після синтезу похідних урацилу, а особливо, 5-фторурацилу та фторафуру, які продемонстрували високу протиопухлинну активність, значно зросла кількість досліджень з цього напрямку.

Починаючи з 1981 року в світі щорічно публікують біля 100 наукових робіт та патентів, які стосуються методів синтезу, вивчення будови й хімічних властивостей урацилу та його похідних.

За останні роки кількість публікацій на дану тему зросла до 130-150 на рік. Серед них біля половини присвячена 5-фторурацилу та сполукам, які створені на його основі.

Стало 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 похідне) буде виконувати роль субстрату та/або інгібітору ферментів і буде переважно поглинатися тканинами пухлини.

З іншого боку, молекули 5 (6)-заміщеного урацилу та його похідних, інших галогеновмісних гетероциклів, здатні виконувати роль фтор(галоген)вмісних синтонів в органічному синтезі з метою створення оригінальних біологічно-активних молекул.

(13) U

(11) 30779

(19) UA

Введення фтор(галоген) вмісних фармакофорів в гетероциклічну молекулу призводить до підвищення розчинності сполук в ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспорту в організмі [1, 2].

Суть корисної моделі полягає в тому, що до проведення хроматографування щуром-носіям пухлини вводять розчин сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ від 25мг/кг до 32мг/кг, через 30 хвилин проводять забір крові та отримують витяжку з пухлини, хроматографують окремо, результати хроматографування порівнюють з результатами контролю і при виявленні відповідного рівню розташування плям на хроматограмі обох сполук визначають біотрансформацію сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$.

Спосіб здійснюється наступним чином: в умовах *in vivo* та *in vitro* за допомогою методу тонкошарової хроматографії (далі, ТШХ), що виконувався на пластинці - сілікагель F_{254} у системі розчинників - хлороформ-спирт 96% у співвідношенні 2:1, під час вивчення протипухлинної активності сполуки на моделях експериментального пухлинного зросту різного гістогенезу: Лімфосаркомі Пліса, Карциномі Герена, Саркомі 45.

Сполуку $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ (далі сполука), яка має виражені протипухлинні властивості, отримана шляхом взаємодії відомого реагенту та складової лікарських засобів 5-фторурацилу з фторотаном молярному співвідношенні 2:1,5 [3, 4].

Реакції проводилися у системі розчинників (бензол-диметилформамід) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром в лужному середовищі з метою забезпечення отримання сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ -у, яка має виражені протипухлинні властивості.

Були проведені випробування *in vivo* по розподілу сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ в організмі тварини.

Експерименти щодо визначення біотрансформації сполуки в організмі піддослідної тварини проведені на щурах з масою тіла 160 ± 20 г (кількість тварин - 10).

Оскільки структурні аналоги сполуки в літературі не описано препаратами порівняння були відібрані 5-фторурацил та препарат ФП-8 (складові: 5-фторурацил та натрієва сіль дифенілфосфорної кислоти).

Критерієм оцінки вважалася відповідність розташування плям досліджуваних сполук на хроматограмі після проявлення їх за допомогою опромінення в УФ-світлі при довжині хвилі 254нм.

На першому етапі дослідження з метою отримання даних по розподілу чистих речовин на хроматограмі хроматогрували досліджувані розчини чистих речовин - 5-фторурацилу, дифенілфосфорної кислоти та її солі у порівнянні з препаратом ФП-8 (складові: 5-фторурацил та натрієва сіль дифенілфосфорної кислоти) в системі розчинників: хлороформ-спирт 96 % (2:1). Отримані хроматограми підтверджують, що

сполука ФП-8 піднімається розчинниками по пластинці двома окремими плямами, (таблиця 1), (рисунок 1).

Дані щодо розподілу на хроматограмі чистих речовин: 5-фторурацилу та її солі у порівнянні з препаратом ФП-8 в системі розчинників

Назва сполуки	Стан (знаходження)
5-фторурацил	чиста речовина, розчин в метанолі
дифенілфосфорна кислота	чиста речовина, розчин в метанолі
дифенілфосфорної кислоти натрієва сіль	чиста речовина, розчин в метанолі
ФП-8	Розчин препарату в метанолі

На Фіг.1 зображена хроматограма розподілу чистих речовин: 5-фторурацилу, дифенілфосфорної кислоти та її солі у порівнянні з препаратом ФП-8 в системі розчинників: хлороформ-спирт - 96% (2:1).

Де: 1. Розчин ФП-8 в метанолі ($R_f \sim 0,15$ та $R_f \sim 0,6$). 2. розчин 5-фторурацилу в метанолі ($R_f \sim 0,6$). 3. розчин натрієвої солі дифенілфосфорної кислоти в метанолі ($R_f \sim 0,18$). Інших плям не спостерігається.

Речовина ФП-8 являє собою координаційну структуру (сполуку) 5-фторурацилу та натрієвої солі дифенілфосфорної кислоти. Спочатку підібрали хроматографічну пластинку та систему розчинників, щоб пляма речовини піднімалася зі старту та була компактною. Пластинка - сілікагель F_{254} , система розчинників - хлороформ-спирт 96% у співвідношенні 2:1. Після елюювання та висушування пластинку проявляли в УФ-світлі при довжині хвилі 254нм. В наданій системі розчинників (як і в інших, менш ефективних), досліджуваний препарат піднімався по пластинці двома окремими плямами. Щоб впевнитись, що ці плями відповідають 5-фторурацилу та натрієвій солі дифенілфосфорної кислоти, на одну пластинку поряд з препаратом окремо наносили розчини його складових.

На хроматограмі чітко видно, що сполука ФП-8 піднімається на пластинці двома окремими плямами, які відповідають хроматограмам розчинів 5-фторурацилу і дифенілфосфорної кислоти. При цьому пляма дифенілфосфорної кислоти в препараті дещо нижче, ніж відповідна пляма в окремому розчині.

На другому етапі дослідження проведені випробування *in vivo* по розподілу сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ в організмі тварини.

Розподіл сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ в організмі щура-пухлиноносія досліджували методом тонкошарової хроматографії у порівнянні із препаратом - стандартом 5-фторурацилом та препаратом ФП-8 (складові: 5-фторурацил та натрієва сіль дифенілфосфорної кислоти).

Спочатку з метою отримання даних по розподілу чистих речовин на хроматограмі хроматогрували досліджувані розчини чистих речовин - $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$.

фторурацил), 5-фторурацилу у порівнянні з препаратом ФП-8 (складові: 5-фторурацил та натрієва сіль дифенілфосфорної кислоти) в системі розчинників: хлороформ-спирт 96% (2:1) при $t^{\circ}20,6^{\circ}\text{C}$.

Для отримання хроматограми готували розчини:

- $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ - у 10мг в 5мл спирту 96% (10мкл);
- 5-фторурацилу 5 мг в 10 мл спирту 96 % (10 мкл);
- ФП-8 10мг в 10мл спирту 96% (10мкл).

За методикою виконувалася процедура хроматографування: пластинка - сілікагель F_{254} , система розчинників - хлороформ-спирт 96% у співвідношенні 2:1. Після елюювання та висушування пластинку проявляли в УФ-світлі при довжині хвилі 254нм. В наданій системі розчинників досліджувана сполука $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ та 5-фторурацил піднімалися по пластинці однією плямою (для кожної сполуки), що знаходилися на одному рівні. На хроматограмі чітко видно, що сполука ФП-8 піднімається на пластинці двома окремими плямами, які відповідають хроматограмам розчинів 5-фторурацилу та $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ і дифенілфосфорної кислоти, (таблиця 2), (рисунок 2).

Дані щодо розподілу на хроматограмі плям речовини $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ у порівнянні з препаратом ФП-8 в системі розчинників: хлороформ-спирт 96% (2:1) при $t^{\circ}20,6^{\circ}\text{C}$.

Дані щодо розподілу на хроматограмі плям речовини $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ у порівнянні з препаратом ФП-8 в системі розчинників: хлороформ-спирт 96% (2:1) при $t^{\circ}20,6^{\circ}\text{C}$.

Назва сполуки	Стан (знаходження)
$N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$	чиста речовина, розчин в метанолі
5-фторурацил	чиста речовина, розчин в метанолі
ФП-8	Розчин препарату в метанолі

На Фіг.2 зображена хроматограма розподілу чистих речовин: $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ у 5-фторурацилу, у порівнянні з препаратом ФП-8 в системі розчинників: хлороформ-спирт - 96% (2:1) при $t^{\circ}20,6^{\circ}\text{C}$.

Де: 1. Розчин $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ в метанолі ($R_f \sim 0,6$). 2. розчин 5-фторурацилу в метанолі ($R_f \sim 0,6$). 3. розчин ФП-8 в метанолі ($R_f \sim 0,15$ та $R_f \sim 0,6$). Інших плям не спостерігається.

Для проведення випробування in vivo по розподілу сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ в організмі тварини, у піддослідного щура-носія пухлини через 30хв. після введення лікарської дози (від 25 до 32мг/кг) сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ брали кров та пухлину. Із крові одержували центрифугуванням сироватку, а із подрібненої пухлини проводили екстракцію сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ ізоаміловим спиртом та ізотонічним

розчином (суспензії центрифугували протягом 40хв. при 8000об/хв).

Надосадочні рідини наносили на пластинку одразу після одержання (пластинка - сілікагель F_{254} , система розчинників - хлороформ-спирт 96% у співвідношенні 2:1; проявлення - УФ-опромінення. У якості препаратів-стандартів використовували 5-фторурацил та препарат ФП-8.

Із наведеної хроматограми видно, що в сироватці крові знаходиться 5-фторурацил - метаболіт сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ - пляма менш насичена, ніж на хроматограмі розподілу чистих речовин: $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$, 5-фторурацилу у порівнянні з препаратом ФП-8 в системі розчинників: хлороформ-спирт 96% (2:1) при $t^{\circ}20,6^{\circ}\text{C}$. Також спостерігаються більш насичені плями, що відповідають складовим препаратом ФП-8 (5-фторурацил та натрієва сіль дифенілфосфорної кислоти) та 5-фторурацилу, (Фіг.3).

На Фіг.3 зображена хроматограма розподілу діючої речовини: $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ -у в сироватці крові піддослідної тварини, препаратів-стандартів, штучно нанесених на хроматографічну пластинку, 5-фторурацилу, та препарату ФП-8 в системі розчинників: хлороформ-спирт - 96% (2:1).

Де: 1. Сироватка крові - пляма метаболіту сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ -у 5-фторурацилу ($R_f \sim 0,6$). 2. розчин 5-фторурацилу в метанолі ($R_f \sim 0,6$). 3. розчин ФП-8 в метанолі ($R_f \sim 0,15$ та $R_f \sim 0,6$).

Дані щодо розподілу на хроматограмі плям речовини $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ у порівнянні з препаратом ФП-8 в системі розчинників: хлороформ-спирт 96% (2:1) при $t^{\circ}20,6^{\circ}\text{C}$.

Де: 1. Витяжка з пухлини - пляма метаболіту сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ -у 5-фторурацилу ($R_f \sim 0,6$). 2. Розчин 5-фторурацилу в метанолі ($R_f \sim 0,6$). 3. розчин ФП-8 в метанолі ($R_f \sim 0,15$ та $R_f \sim 0,6$).

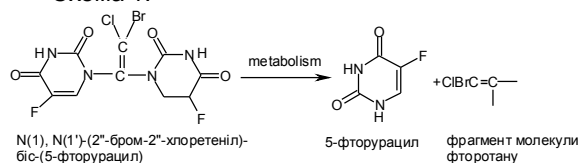
Із наведених хроматограм (Фіг.3, 4) видно, що 5-фторурацил є і в сироватці крові і в витяжці з пухлини піддослідної тварини через 30хв. після введення лікарської дози сполуки $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$, (таблиця 3).

Дані щодо розподілу на хроматограмі плям речовини $N_{(1)}$, $N_{(1)}-(2''\text{-бром- } 2''\text{-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)}$ у порівнянні з препаратом ФП-8 в системі розчинників: хлороформ-спирт 96 %

Назва сполуки	Стан (знаходження)	фторурацилу - речовина 1,1'-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) має
N ₍₁₎ , N _(1') -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)	сироватка крові	протипухлинну активність. Деклараційний патент на винахід. Дата прийняття рішення 24.02.2004. - 59324A 7C01B 7/09, C07C 21/00, Бюлетень № 8.
N ₍₁₎ , N _(1') -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил)	витяжка з пухлини	
5-фторурацил	чиста речовина, роз	
ФП-8	розчин препарату в	

Таким чином, сполука N₍₁₎, N_(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) може утворювати діючі фрагменти молекули *in vitro* (5-фторурацил та фрагмент молекули фторотану з фармакофорними властивостями =C≡CBrC I), що має бути властивістю всієї групи близьких за будовою сполук (схема 1).

Схема 1.



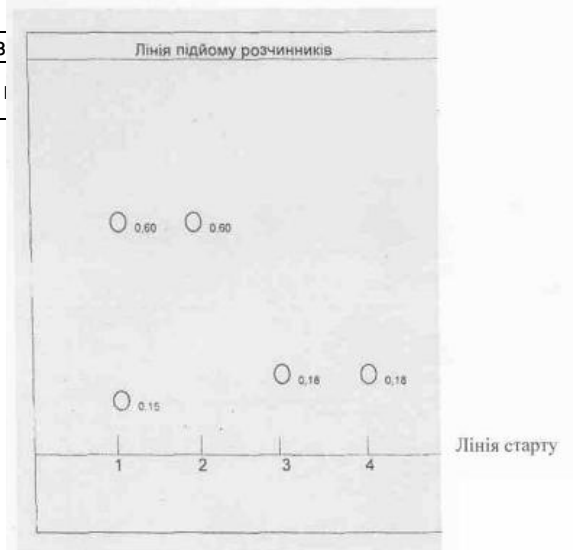
Завданням корисної моделі є спосіб визначення біотрансформації біс-адукту N₍₁₎, N_(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил), яка має виражені протипухлинні властивості, в умовах *in vivo* та *in vitro* за допомогою методу ТШХ (пластинка - сілікагель F₂₅₄, система розчинників - хлороформ-спирт 96% у співвідношенні 2:1) під час вивчення протипухлинної активності сполуки на моделях експериментального пухлинного зросту різного гістогенезу: Лімфосаркомі Плоса, Карциномі Герена, Саркомі 45.

В результаті дослідження за допомогою хроматографічного методу знайдено, що 5-фторурацил є і в сироватці крові і в витяжці з пухлини піддослідної тварини через 30хв. після введення лікарської дози сполуки N₍₁₎, N_(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил). Таким чином, можна вважати, що основним метаболітом сполуки N₍₁₎, N_(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) є 5-фторурацил.

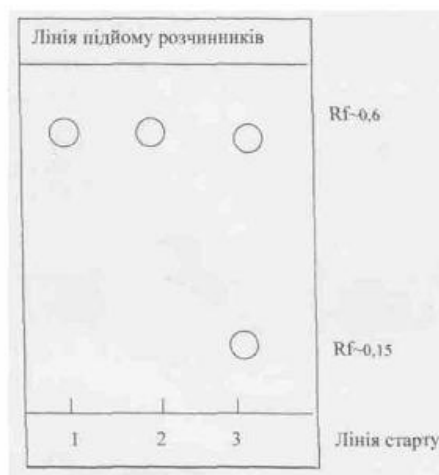
Спосіб визначення біотрансформації в умовах *in vivo* та *in vitro* біс-адукту N₍₁₎, N_(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил) розроблено у відділі онкофармакології Інституту фармакології та токсикології АМН України.

Література:

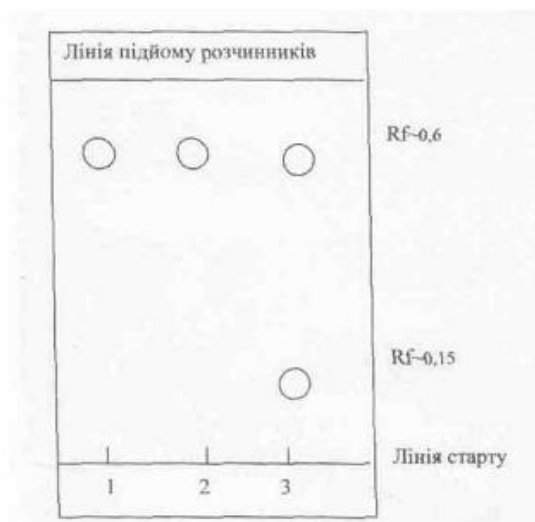
1. Соединения фтора. Синтез и применение. / Под ред. Н. Исикава. - М.: Мир, 1990. - Гл. 5. - С. 183-265.
2. Ягупольский Л.М. // Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями. - Киев: Наукова думка, 1988. - С. 90-105.
3. Вельчинська О.В. Спосіб отримання речовини з протипухлинною активністю 1,1'-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-фторурацил). Деклараційний патент на корисну модель. 6893. C07D 239/553, C07C 21/18, 21/185, A61K 33/16. Дата прийняття рішення 16.05.2005. Бюл. № 5. С. 6893.
4. Стефанов О.Ю Вельчинська О.В., Шарикина Н.І., Кудрявцева І.Г. Похідне фторотану та 5-



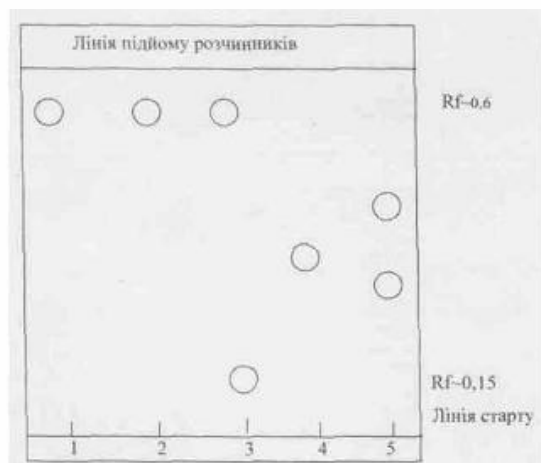
Фіг.1



Фіг.2



Фиг.3



Фиг.4