

Síntesis y Actividad Antineoplásica de 1-(4-Toluensulfonil)-4-Arilsemicarbazidas

Silvia E. ASIS, Ana M. BRUNO y Carlos H. GAOZZA*

*Centro de Síntesis y Estudio de Nuevos Compuestos Antineoplásicos.
Departamento de Química Orgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires (1113), Argentina.*

RESUMEN. Se sintetizó una serie de 1-(4-toluensulfonil)-4-arilsemicarbazidas estructuralmente relacionadas con la familia del Sulofenur. Estos compuestos fueron evaluados como antineoplásicos por el N.C.I. (USA). Un derivado con sustituyente nitro, VI, fue activo contra una variedad de tumores humanos. Se ensayó la afinidad por el ADN perfeccionando un método espectrofotométrico ya conocido. Todos estos compuestos demostraron carecer de afinidad hacia ADN de timo bovino. Las propiedades redox del compuesto VI se estudiaron mediante voltametría cíclica.

SUMMARY. "Synthesis and Antineoplastic Activity of 1-(4-Toluensulfonyl)-4-Arylsemicarbazides". A series of 1-(4-toluensulfonyl)-4-arylsemicarbazides structurally related to the Sulofenur family was synthesized and evaluated as antineoplastic at the N.C.I. (USA). One derivative carrying a nitro group, VI, was active against a variety of human tumors. DNA binding was assayed employing an improved UV method and all compounds exhibited no affinity to calf thymus DNA. Redox properties of compound VI were also studied by cyclic voltammetry.

INTRODUCCION

Algunas diarilsulfonilureas han demostrado ser activas contra una variedad de tumores humanos. Entre ellas, el Sulofenur® exhibió actividad frente a tumores murinos sólidos singeneicos, llegando a estudios clínicos en Fase I¹. Desafortunadamente, este compuesto fue poco activo a dosis bajas, mientras que a dosis mayores presentó un fuerte efecto metahemoglobinizante². Por otra parte, se han descrito algunos compuestos con cierta actividad antitumoral derivados de tiosemicarbazida³ pero aquellos derivados de semicarbazida son muy poco conocidos a la fecha⁴. Por ello, se decidió desarrollar la síntesis de una nueva serie de compuestos potenciales antineoplásicos por una modificación de sulfonilureas agregando un átomo de nitrógeno para convertirlas en sulfonilsemicarbazidas.

PALABRAS CLAVE: Actividad antineoplásica, Afinidad por el ADN, Síntesis, Tosilarilsemicarbazidas, Voltametría cíclica.

KEY WORDS: Antineoplastic Activity, Cyclic voltammetry, DNA binding, Synthesis, Tosylarylsemicarbazides.

* Autor a quien dirigir la correspondencia

MATERIALES Y METODOS

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Buchi y se expresan sin corregir. Los espectros IR se efectuaron en un espectrofotómetro Jasco A-200 en pastillas de KBr y los ^1H -RMN en un espectrómetro Bruker A80 utilizando TMS como patrón interno; los espectros UV se registraron en un espectrofotómetro Jasco 7850. Los productos comerciales de partida para las síntesis fueron calidad "puro". El análisis elemental (C, H y N) estuvo de acuerdo con los valores teóricos con un error de $\pm 0,4\%$.

Procedimiento general para la síntesis de sym-diariltioureas

A una solución de 0,25 mol de la correspondiente anilina en una mezcla de 24 ml (0,40 mol) de CS_2 y 37 ml de etanol anhidro, se agregó 0,23 g (1,88 mol) de DMAP utilizado como catalizador. La mezcla se calentó a reflujo durante 18 horas. Luego de enfriar, el producto precipitado se filtró y lavó con etanol. Los puntos de fusión estuvieron en conformidad con los de la literatura ⁵.

Arilisotiocianatos

Se disolvieron 24 g (0,08 mol) de la correspondiente sym-diariltiourea en 17 ml (0,81 mol) de anhídrido acético. La mezcla se calentó a 90 °C por 1 hora. El producto fue aislado mediante destilación por arrastre con vapor; los puntos de fusión de los productos sólidos estuvieron en conformidad con los de la literatura ⁶.

1-(4-toluensulfonyl)-4-ariltiosemicarbazidas

Una mezcla de 6,70 g (0,036 mol) de tosilhidrazida y 5,35 g (0,040 mol) del arilisotiocianato apropiado disueltos en 20 ml de etanol anhidro se calentaron a reflujo durante 3 horas. Luego de enfriar, el producto cristalizó con rendimiento casi cuantitativo. p.f.: Ar= Ph: 185-6; p- ClC_6H_4 : 191-3; p- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$: 181-4; p- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$: 180-2; m- $\text{CF}_3\text{-C}_6\text{H}_4$: 187-7,5 °C.

1-(4-toluensulfonyl)-4-arilsemicarbazidas

Compuestos I-V, método A

A una mezcla de 1-(4-toluensulfonyl)-4-ariltiosemicarbazida (6,2 mmol) e hidróxido de potasio (2% en agua) con agitación magnética, a 0-5 °C, se le adicionó lentamente y por goteo 1,5 ml de peróxido de hidrógeno (30%). La mezcla se dejó alcanzar temperatura ambiente y se le agregó 5-10 ml de etanol para precipitar el producto. Este se separó por filtración y se recrystalizó del solvente adecuado (Tabla 1).

Compuestos VI-VII. Método B

A 5,9 mmol de 1-naftilisocianato ó 4-nitrofenilisocianato disueltos en 10 ml de benceno se agregó en pequeñas porciones 1,0 g (5,4 mmol) de tosilhidrazida disuelta en 10 ml de benceno, con agitación magnética a temperatura ambiente. El producto, separado inmediatamente, se filtró y lavó con benceno y luego con etanol (Tabla 1).

Comp.	R	P.f. °C	Rend. %	Solvente de recristalización	Coeficiente de afinidad (a_{24}/a_0)	MG MID ^b		
						log GI ₅₀	log TGI	log LC ₅₀
1	H	190-191	49	tolueno	0,92	ND	ND	ND
2	p-Cl	232-233	42	DMF/etanol	0,93	-4,07	-4,00	-4,00
3	p-CH ₃	144-146	30	agua/etanol	0,93	-4,03	-4,00	-4,00
4	p-OCH ₃	187-188	53	agua/etanol	0,94	-4,10	-4,00	-4,00
5	m-CF ₃	182-184	41	tolueno	0,94	-4,17	-4,00	-4,00
6	p-NO ₂	221-224	40	a	0,95	-4,36	-4,02	-4,00
7	Ar- 1-naftil	205-208	73	a	0,95	-4,09	-4,00	-4,00

Tabla 1. Características de los compuestos sintetizados y su evaluación contra líneas celulares de tumores humanos. *a.* Comp. VI y VII cristalizaron puros de la reacción. *b.* Las letras MG MID se refieren al promedio de todas las líneas observados, GI₅₀, TGI y LC₅₀ indican la concentración del compuesto que lleva al crecimiento de las células tratadas a 50%, 0% y -50% con respecto al crecimiento de las células sin tratar. *ND*: no determinado.

Datos espectroscópicos de los productos obtenidos:

1-(4-toluensulfonil)-4-fenilsemicarbazida I

IR, ν (cm⁻¹): 3350 (NH), 1680 (C=O), 1600 (NH), 1340 y 1160 (NSO₂), 815 (CH aromático, disustituido), 750 y 700 (CH aromático, monosustituido). ¹H NMR, δ (ppm): 2.31 (3H, s, CH₃); 6.71-7.48 (7H, m, C₆H₅ y NHNH); 7,77 (2H, d, CH₃ArH); 8,33 (2H, d, SO₂ArH); 9,51 (1H, s, CONH). UV, λ (nm) agua: 223.

1-(4-toluensulfonil)-4-(4-metoxifenil)semicarbazida IV

IR, ν (cm⁻¹): 3350 (NH), 1670 (C=O), 1600 (NH), 1340 y 1160 (NSO₂), 1230 (PhOCH₃), 820 (CH aromático, disustituido). ¹H NMR, δ (ppm): 2.30 (3H, s, CH₃); 3.70 (3H, s, OCH₃); 6.60-7.50 (6H, m, C₆H₄OCH₃ y NHNH); 7.70 (2H, d, CH₃ArH); 8.20 (2H, d, SO₂ArH); 9.45 (1H, s, CONH). UV, λ (nm) agua: 223.

1-(4-toluensulfonil)-4-(4-nitrofenil)semicarbazida VI

IR, ν (cm⁻¹): 3325 (NH), 1680 (C=O), 1590 (NH), 1550 y 1370 (NO₂), 1330 y 1150 (NSO₂), 810 (CH aromático, disustituido). ¹H NMR, δ (ppm): 2.30 (3H, s, CH₃); 7.20-9.30 (10H, m, aromáticos y NHNH); 9.30 (1H, s, CONH). UV, λ (nm) agua: 223.

Interacción con ADN

Para preparar la solución de ADN se disolvieron 12,5 mg de ADN de timo bovino en 5 ml de buffer Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) mediante agitación magnética lenta durante 24 horas a 4 °C. Se tomaron 0,6 ml y se diluyó con el mismo buffer a 25 ml. La solución del compuesto a ensayar 10⁻⁴ M se preparó empleando el mínimo volumen de etanol y agua. Luego se diluyó a 2 · 10⁻⁵ M. Se mezclaron 3 ml de la solución resultante con 3 ml de solución de ADN y se registró su espectro UV a 20 °C (luego de 24 horas de agitación lenta) empleando una celda de 1 cm.

Voltametría Cíclica

Se utilizó un potenciostato EQMAT-S1, con electrodo de trabajo de carbono vítreo, electrodo de referencia de calomel y antielectrodo de alambre de oro. El electrolito soporte estuvo constituido por perclorato de terbutilamonio (TBAP) 50 mM. Concentración de muestra: 0,5 mM. Sensibilidad 25 $\mu\text{A div}^{-1}$. El solvente utilizado fue acetonitrilo (pureza electroquímica) y burbujeando nitrógeno gas inerte. La velocidad de barrido fue de 50 mV s^{-1} .

RESULTADOS Y DISCUSION

Síntesis

La reacción de tosilhidrazida con arilisotiocianatos resultó un buen procedimiento general para preparar 1-(4-toluensulfonil)-4-ariltiosemicarbazidas, las cuales pueden ser fácilmente desulfuradas por acción del peróxido de hidrógeno ⁷ (Esquema 1, método A). Como 1-(4-toluensulfonil)-4- α -naftiltiosemicarbazida se descompone en presencia de peróxido de hidrógeno, el compuesto **VII** se obtuvo por reacción directa de tosilhidrazida con α -naftilisocianato (método B). Se empleó este mismo procedimiento con 4-nitrofenil-isocianato para obtener el compuesto **VI**. Los datos espectroscópicos de IR y ¹H-RMN de esta serie estuvieron de acuerdo con las estructuras propuestas.

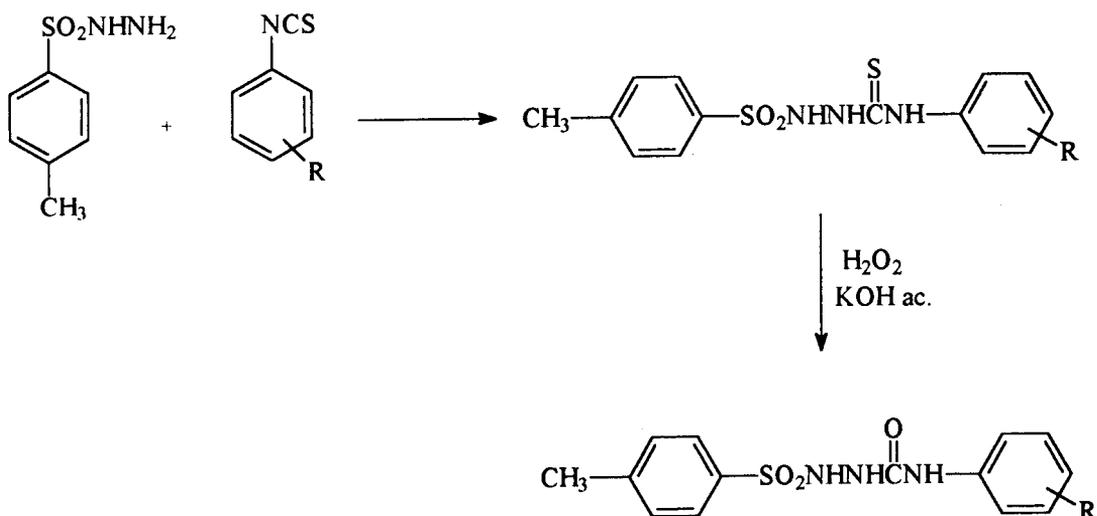
Actividad antineoplásica

Los compuestos sintetizados fueron evaluados por el National Cancer Institute (USA) frente a diversas líneas celulares de tumores humanos, entre ellas: leucemia, melanoma, pulmón, colon, sistema nervioso central (SNC), ovario, riñón, próstata y mama. Si bien todos los miembros de la serie estudiada demostraron ser débilmente activos ($-\log \text{GI}_{50} > 4,00$), el compuesto **VI**, que posee un sustituyente 4-nitro en el grupo fenilo de su molécula, sobresalió por su particular actividad contra las líneas de leucemia ($\log \text{GI}_{50} -4,43$; $3,72 \cdot 10^{-5}$ M), colon ($-4,46$; $3,47 \cdot 10^{-5}$ M), SNC ($-4,28$; $5,25 \cdot 10^{-5}$ M), ovario ($-4,50$; $3,16 \cdot 10^{-5}$ M) y mama ($-4,51$; $3 \cdot 10^{-5}$ M).

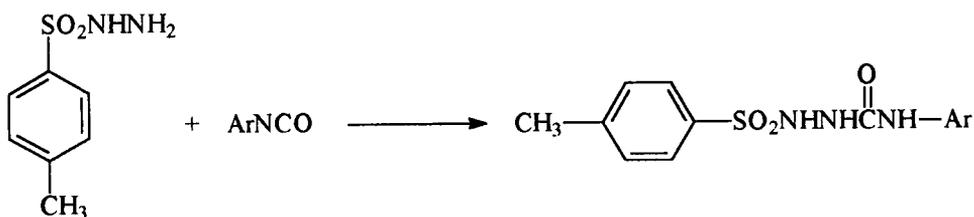
Afinidad por el ADN

A fin de detectar un posible mecanismo de acción de estos compuestos se ensayó el grado de unión al ADN de timo bovino a través de un método por espectroscopía UV ⁸. El grado de interacción se expresó mediante el cociente entre el área de absorbancia final (a_{24}) y el área de absorbancia del compuesto a igual concentración (a_0). Valores 1 ó >1 indican una carencia total de afinidad y el valor 0 indica que todo el compuesto se encuentra unido al ADN. Los compuestos de referencia para validar este método fueron los agentes intercalantes m-AMSA y mitoxantrona, y la bis-benzimida (Hoescht N° 33258) que se introduce en el surco menor. Mezclando cinco moles de ADN (en pares de bases) con respecto a un mol de droga, estos compuestos demostraron valores de 0,64, 0,00 y 0,57, respectivamente. En las mismas condiciones experimentales con nuestros compuestos se obtuvieron valores comprendidos entre 0,92 y 0,95, indicativos que esta serie no interacciona con el ADN.

La actividad del compuesto **VI** podría atribuirse a la presencia del grupo nitro en su molécula, que es reducible en medio biológico. Por esta razón se estudiaron



Método B



Ar= 4-nitrofenil, VI

Ar= 1-naftil, VII

Esquema 1.

las propiedades "redox" de este compuesto por voltametría cíclica. La molécula del compuesto sin sustituyente en el fenilo se ensayó como referencia. Cuando éste se barrió entre -2000 y +2000 mV, se obtuvo un trazado igual al correspondiente al electrolito soporte, en tanto que el compuesto VI presentó un pico de reducción de un electrón del grupo nitro a -989 mV con un trazado típico de un proceso irreversible y un potencial de media onda de 65 mV ($\Delta I = 2 \mu A$), observándose también un pico a +822 mV debido a la oxidación también irreversible de la función hidrazida. (Figura 1).

CONCLUSIONES

Las 1-(4-toluensulfonil)-4-arilsemicarbazidas preparadas demostraron no poseer afinidad por el ADN y nula o débil actividad antineoplásica, a excepción del compuesto con un grupo p-nitrofenilo en su molécula. Su estudio "redox" por voltametría cíclica no resultó concluyente para atribuirle un mecanismo de acción a través de procesos peroxidativos, por lo que se debe pensar más bien en un efecto de inhibición enzimática.

Agradecimientos. Los autores lo manifiestan al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la financiación de este trabajo y al National Cancer Institute (U.S.A.) por los ensayos de actividad antineoplásica realizados.

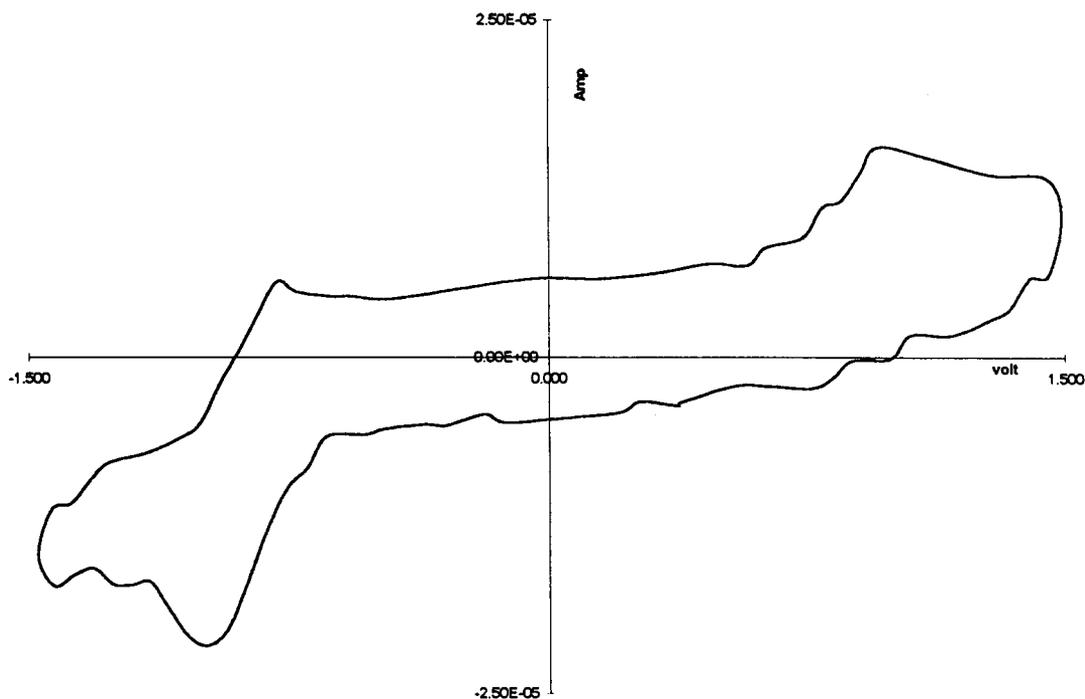


Figura 1.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Howbert, J., C. Grossman, T. Crowell, B. Rieder, R. Harper, K. Kramer, E. Tao, J. Aikins, G. Poore, S. Rinzel, G. Grindey, W. Shaw & G. Todd (1990) *J. Med. Chem.* **33**: 2393-407
2. Molthrop D. Jr., R. Wheeler, K. Hall & J. Prchal (1994) *Invest. New Drugs* **12**: 99-102
3. Wang Y., M. Liu, T. Lin & A. Sartorelli (1992) *J. Med. Chem.* **35**: 3667-71
4. Asís S., A. Bruno, D. Molina, G. Conti & C. H. Gaozza (1996) *Il Farmaco* **51**: 419-23
5. a) *Beil.* **12**, 394; b) *Beil.* **12**, 696; c) *Beil.* **12**, 948
6. a) *Beil.* **12**, 616; b) *Beil.* **12**, 956; c) *Beil.* **12**, 1244; d) *Beil.* **13**, 487
7. Hirooka, S (1962) *Nippon Kagaku Zasshi* **83**, 500. *CA* 58:11254 h
8. Seshadri, R, M. Israel & W. Pegg (1983) *J. Med. Chem.* **26**: 11-5