

УДК 547.854.4:615.272.7

СИНТЕЗ И ИНГИБИТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ «КЛАССИЧЕСКИХ» И КАРБОЦЕПНЫХ АЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОЗИДНЫХ АНАЛОГОВ - ПРОИЗВОДНЫХ 5-(ФЕНИЛАМИНО)УРАЦИЛА

¹Солодунова Г.Н., ²Маршалкин М.Ф., ¹Соболевская С.И.

¹Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1), e-mail: fibfuv@mail.ru;

²Пятигорский филиал Северо-Кавказского федерального университета, Пятигорск, Россия (357500, г. Пятигорск, пр. 40 лет Октября, 56), e-mail: kaf-oosh@pfncfu.ru

Осуществлен синтез ряда «классических» и карбоцепных ациклических нуклеозидных аналогов на основе 5-(фениламино)урацила. Алкилирование при комнатной температуре триметилсилилпроизводных 5-(фениламино)урацила и его гомологов альфа-хлорэфиром, полученным из 2-бензоилоксиэтанола, в среде безводного 1,2-дихлорэтана, с последующим удалением защитной бензоильной группы с использованием метанольного раствора аммиака приводит к соответствующим 1-(2-оксиэтоксиметил)производным. Алкилирование триметилсилилпроизводного 5-(фениламино)урацила 1-бром-4-ацетоксипутаном требует более высокой температуры и протекает при 180-185 °С. Производные 1-(4-оксибутил)-5-(фениламино)урацила были получены после депротекции с хорошим выходом. Все синтезированные соединения обладают способностью ингибировать уридинфосфорилазу клеток печени человека *in vitro*. Введение метильной группы в *meta*-положение ароматического кольца значительно увеличивает ингибиторные свойства соединений. 1-(2-Оксиэтоксиметил)- и 1-(4-оксибутил)производные 5-(*meta*-метилфениламино)урацила проявляют ингибиторную активность, сравнимую с таковой бензилациклоуридина.

Ключевые слова: уридинфосфорилаза, ингибирование, фениламиноурацил, ациклонуклеозид.

SYNTHESIS AND INHIBITORY ACTIVITY AGAINST URIDINE PHOSPHORYLASE OF THE “CLASSIC” AND CARBOCHAIN ACYCLIC NUCLEOSIDE ANALOGUES - 5-(PHENYLAMINO)URACIL DERIVATIVES

¹Solodunova G.N., ²Marshalkin M.F., ¹Sobolevskaya S.I.

¹Volgograd Medical Scientific Centre, Volgograd, Russia (400131, Volgograd, Pavshikh Bortsov Sq., 1), e-mail: fibfuv@mail.ru;

²Pyatigorsk Branch of North-Caucasian Federal University, Pyatigorsk, Russia (357500, Pyatigorsk, Avenue 40 Years of October, 56), e-mail: kaf-oosh@pfncfu.ru

Synthesis of the series of “classic” and carbochain acyclic nucleoside analogues on the basis of 5-(phenylamino)uracil have been carried out. The alkylation at room temperature of trimethylsilyl derivatives of 5-(phenylamino)uracil and its homologs by alpha-chloroester synthesized from 2-benzoyloxyethanol in dry 1,2-dichloroethane following with deprotection with methanolic ammonia leads to corresponding 1-(2-hydroxyethoxymethyl) derivatives. The alkylation of trimethylsilyl derivatives of 5-(phenylamino)uracil with 1-bromo-4-acetoxybutane requires a higher temperature and occurs at 180-185 °C. The 1-(4-hydroxybutyl)-5-(phenylamino)uracil derivatives were obtained after deprotection with a good yield. All compounds inhibit uridine phosphorylase from human liver *in vitro*. The introduction of methyl group to *meta*-position of aromatic ring strongly increases inhibitory properties of the compounds. 1-(2-Hydroxyethoxymethyl) and 1-(4-hydroxybutyl) derivatives of 5-(*meta*-methylphenylamino)uracil demonstrate inhibitory activity compared to benzylacyclouridine.

Keywords: uridine phosphorylase, inhibition, phenylaminouracil, acyclonucleoside .

Уридинфосфорилаза является одним из ключевых ферментов метаболизма нуклеиновых кислот и удобной мишенью для химиотерапевтического воздействия. Уридинфосфорилаза многих возбудителей опасных инфекций отличается по субстратной специфичности от человеческой, в связи с чем ингибиторы уридинфосфорилазы

рассматриваются как потенциальные лекарственные средства для лечения ряда инфекционных заболеваний. 5-Замещенные производные пиримидиновых нуклеозидов, например 1-(2-оксиэтоксиметил)-5-бензилурацил (бензилациклоуридин, ВАУ) и его аналоги, имеющие дополнительные заместители в ароматическом ядре, проявили выраженные ингибиторные свойства в отношении уридинфосфорилазы и усиливали противоопухолевое действие 2'-дезоксидезокси-5-фторуридина [10]. Описан синтез и ингибиторные свойства в отношении уридинфосфорилазы гетероцепных аналогов ВАУ - 1-(2-оксиэтоксиметил)производных 5-(фенилтио)- и 5-(фенилселено)урацила [9]. Однако активность соответствующих аза-аналогов - производных 5-(фениламино)урацила в отношении этого фермента ранее не была исследована.

Синтез разнообразных производных 5-(фениламино)урацила освещен в научной литературе достаточно широко. Известны производные 5-(фениламино)урацила, содержащие заместители бензильного [7] и арилоксиалкильного [8] типа, а также описаны некоторые ациклонуклеозиды на основе 5-(фениламино)урацила [5]. Некоторые из этих соединений проявляют заметную активность *in vitro* в отношении ВИЧ-1 [2-4] и вируса гепатита С [1]. Ингибиторные свойства этих соединений в отношении уридинфосфорилазы также ранее не изучались.

Цель исследования

Синтез и исследование ингибиторных свойств в отношении уридинфосфорилазы клеток печени человека ряда производных 5-(фениламино)ациклоуридина и их карбоцепных аналогов.

Материалы и методы исследования

Синтез 1-(2-оксиэтоксиметил)-5-(фениламино)урацила и его метилированных в ароматическое ядро аналогов был осуществлен по традиционной схеме синтеза «классических» ациклонуклеозидов, включающей региоселективное N¹-алкилирование силилированного пиримидинового основания альфа-галоидэфиром - (2-бензоилоксиэтокси)хлорметаном с последующим удалением защитной бензоильной группы с помощью насыщенного при 0 °С метанольного раствора аммиака. Для алкилирования силилированного 5-(фениламино)урацила менее реакционноспособным 1-бром-4-ацетоксибутаном был использован метод «сплавания» путем нагревания реагентов без растворителя при температуре 180-185 °С в течение 1 ч, как это описано для других алкилирующих агентов с невысокой реакционной способностью [6].

1-(2-Бензоилоксиэтоксиметил)-5-(фениламино)урацил. Смесь 2,0 г (9,84 ммоль) 5-(фениламино)урацила, 50 мл гексаметилдисилазана, 1 г ацетамида и 0,5 г хлорида аммония кипятят с защитой от влаги воздуха в течение 8 ч до образования прозрачного раствора.

Избыток гексаметилдисилазана упаривают в вакууме, остаток растворяют в 20 мл безводного 1,2-дихлорэтана, добавляют 2,2 г (10,2 ммоль) (2-бензоилоксиэтокси)хлорметана и перемешивают при комнатной температуре в течение суток. Последовательно добавляют 10 мл 2-пропанола, 20 мл воды и 5 мл концентрированного гидроксида аммония, перемешивают, органический слой отделяют, сушат сульфатом магния, фильтруют и упаривают в вакууме. Остаток перекристаллизовывают из смеси этилацетат - гексан (1 : 1) и получают 3,0 г светло-желтого кристаллического вещества, Т. пл. 95-98 °С, выход 80%. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (ДМСО-D₆): 3,87 т (2 H, 5 Гц, CH₂); 4,36 т (2 H, 5 Гц, CH₂); 5,18 с (2 H, N-CH₂-O); 6,27 уш. с (1 H, C⁵-NH); 6,55-7,18 м (5 H, фенил); 7,30 с (1 H, H⁶); 7,18-8,00 м (5 H, бензоил).

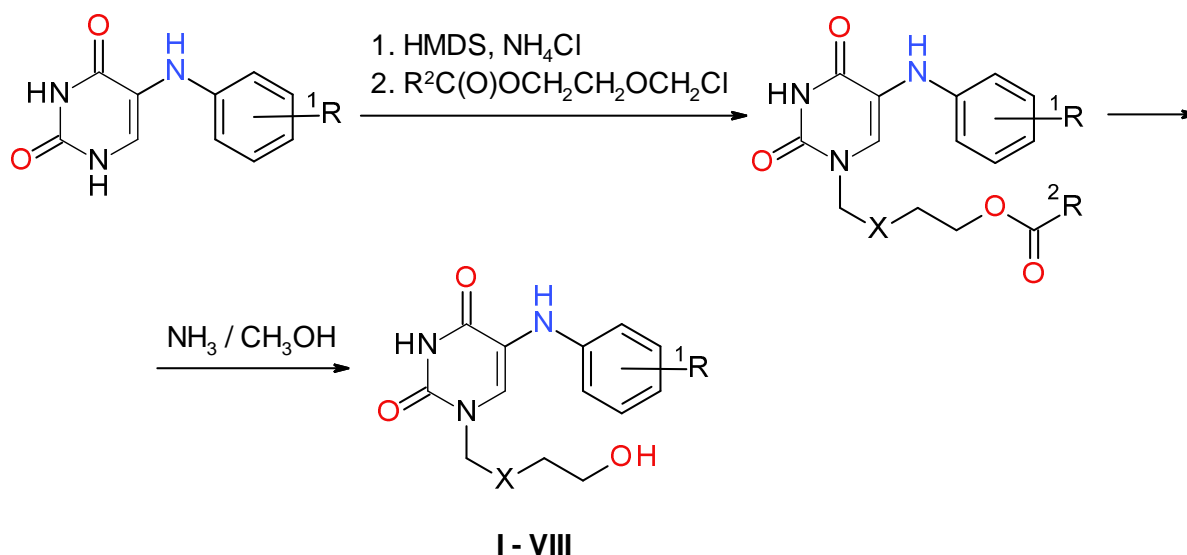
1-(2-Оксиэтоксиметил)-5-(фениламино)урацил (I). Смесь 1,5 г (3,93 ммоль) 1-(2-бензоилоксиэтоксиметил)-5-(фениламино)урацила и 25 мл насыщенного при 0 °С метанольного раствора аммиака выдерживают в герметично закрытом сосуде при комнатной температуре в течение суток, растворитель упаривают в вакууме, остаток промывают диэтиловым эфиром (2 × 15 мл), экстрагируют 50 мл кипящего 2-пропанола, горячий экстракт фильтруют, выдерживают при температуре -5 °С в течение суток, выделившийся белый кристаллический осадок отфильтровывают, промывают 10 мл диэтилового эфира и получают 0,8 г белого кристаллического вещества, Т. пл. 123-126 °С, выход 74%. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (ДМСО-D₆): 3,52 с (4 H, CH₂CH₂); 4,79 уш. с (1 H, OH); 5,10 с (2 H, N-CH₂-O); 6,60-7,22 м (6 H, фенил, C⁵-NH); 7,46 с (1 H, H⁶).

Остальные соединения получают аналогично.

Активность полученных веществ в отношении уридинфосфорилазы клеток печени человека была изучена в Университете Алабамы (г. Бирмингем, Алабама, США) профессором Mahmoud H. el Kouni по методике [10].

Результаты исследования и их обсуждение

Синтез 5-(фениламино)ацicloуридина (I) и его гомологов (II-IV), содержащих дополнительные метильные группы в ароматическом ядре, а также соответствующих карбоцепных аналогов (V-VIII) был осуществлен по схеме (рис. 1).



где: R¹ = H, *орто*-, *мета*-, *пара*-CH₃; R² = CH₃, C₆H₅; X = O, CH₂

Рис. 1. Схема синтеза производных и аналогов 5-(фениламино)ацклоуридина.

Полученные соединения представляют собой белые кристаллические вещества, мало растворимые в воде, легко растворимые в спирте и ДМСО. Химическое строение соединений доказано методом ЯМР-спектроскопии. Выход и физико-химические свойства представлены в таблице 1.

Таблица 1

Выход и физико-химические свойства синтезированных соединений

Соединение	R ¹	X	Брутто-формула	Выход, %	Т. пл., °C	R _f *
I	H	O	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₄	74	123-126	0,56
II	<i>орто</i> -CH ₃	O	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₄	76	165-167	0,56
III	<i>мета</i> -CH ₃	O	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₄	68	122-124	0,53
IV	<i>пара</i> -CH ₃	O	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₄	75	82-85	0,60
V	H	CH ₂	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	67	159-161	0,43
VI	<i>орто</i> -CH ₃	CH ₂	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃	65	105-108	0,47
VII	<i>мета</i> -CH ₃	CH ₂	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃	74	156-158	0,40
VIII	<i>пара</i> -CH ₃	CH ₂	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃	79	146-150	0,42

* Примечание: Silufol UV-254, хлороформ - метанол (9 : 1).

Результаты исследования способности синтезированных соединений ингибировать уридинфосфорилазу клеток печени человека *in vitro* представлены в таблице 2.

Таблица 2

Ингибиторная активность синтезированных соединений в отношении

уридинфосфорилазы *in vitro*

Соединение	Ингибиторная концентрация, IC ₅₀ , μM
I	51,2 ± 4,2
II	114,2 ± 9,5
III	18,6 ± 1,0
IV	112,7 ± 6,3
V	83,1 ± 4,7
VI	157,6 ± 17,7
VII	18,3 ± 1,1
VIII	131,2 ± 9,3
Бензилациклоуридин	18,9 ± 1,4

Результаты исследований свидетельствуют о том, что незамещенный 5-(фениламино)ациклоуридин (**I**) и его карбоцепной аналог (**V**) соответственно в 2,7 и 4,3 раза уступают эталонному бензилациклоуридину по способности подавлять фосфорилазную активность фермента. Дополнительное введение в структуру этих веществ метильных групп в *орто*- и *пара*-положения еще больше уменьшают ингибиторную активность соединений **II**, **IV**, **VI** и **VIII**. Однако метилирование *мета*-положения дает обратный эффект: увеличение активности соединений **III** и **VII** по сравнению с их незамещенными аналогами **I** и **V** составляет 2,8 и 4,5 раза, и по величине ингибиторной концентрации IC₅₀ 1-(2-оксиэтоксиметил)-5-(*мета*-метилфениламино)урацил (**III**) и 1-(4-оксибутил)-5-(*мета*-метилфениламино)урацил (**VII**) не уступают бензилациклоуридину. Учитывая подобный характер влияния *мета*-замещения, можно предположить, что введение других заместителей (низших алкилов, арилов, галогенов) может значительно усилить ингибиторные свойства соединений, что свидетельствует о перспективности дальнейшего поиска новых высокоактивных в отношении уридинфосфорилазы веществ на основе 5-(фениламино)урацила.

Заключение

Осуществлен синтез аза-аналогов известного селективного ингибитора уридинфосфорилазы - бензилациклоуридина. Изменение природы линкера, связывающего ароматическое ядро и положение C⁵ ациклоуридина, с метиленовой группы на фрагмент вторичного амина приводит к снижению способности веществ угнетать фосфорилазную активность фермента, однако дополнительное введение метильной группы в *мета*-положение бензольного кольца полностью восстанавливает ингибиторные свойства как в

случае с «классическим» производным ациклоуридина, так и в случае с карбоцепным аналогом. Представляет значительный теоретический и практический интерес синтез новых ациклических нуклеозидных аналогов на основе 5-(фениламино)урацила, имеющих разнообразные заместители в *мета*-положении, с целью поиска оригинальных высокоселективных ингибиторов уридинфосфорилазы.

Список литературы

1. Гуреева Е.С. Синтез и анти-ВГС активность новых 1-[4-(фенокси)бензил]-производных 5-фениламиноурацила // Фундаментальные исследования. - 2014. - № 11. - С. 1574-1578.
2. Лобачев А.А. Синтез и противовирусные свойства в отношении ВИЧ-1 новых метилированных производных 1-(бензилоксиметил)-5-(ариламино)урацила // Изв. вузов. Прикл. хим. биотехнол. - 2011. - № 1. - С. 35-37.
3. Лобачев А.А. Оптимизация структуры метилированных производных 1-(бензилоксиметил)-5-(ариламино)урацила, обладающих анти-ВИЧ-1 активностью // Вестник Волгоградск. гос. мед. ун-та. - 2012. - Вып. 1. - С. 91-93.
4. Лобачев А.А. Влияние алкильных заместителей в боковой цепи при экзоциклическом атоме азота на анти-ВИЧ-1 активность *in vitro* новых производных 1-(бензилоксиметил)-5-(ариламино)урацила // Бюлл. Волгоградск. научн. центра РАМН. - 2006. - Вып. 3. - С. 4-6.
5. Новиков М.С. Ациклические аналоги пиримидиновых нуклеозидов. Синтез 1-(2-гидроксиэтоксиметил)- и 1-(4-гидроксibuтил)-5-аминопроизводных урацила / М.С. Новиков, А.А. Озеров // Хим. гетероциклич. соед. - 1998. - Вып. 7. - С. 971-978.
6. Новиков М.С. Силильный метод синтеза 1-[2-(фенокси)этил]урацилов / М.С. Новиков, А.А. Озеров // Хим. гетероциклич. соед. - 2005. - Вып. 7. - С. 1071-1075
7. Новиков М.С. Синтез 5-(ариламино)-1-бензилурацилов / М.С. Новиков, А.А. Озеров // Хим. гетероциклич. соед. - 2005. - Вып. 6. - С. 887-892.
8. Озеров А.А. Синтез 1-(арилоксиалкил)-5-(ариламино)урацилов // Хим. гетероциклич. соед. - 1998. - № 5. - С. 691-697.
9. Goudgaon N.M. Phenylselenyl- and phenylthio-substituted pyrimidines as inhibitors of dihydrouracil dehydrogenase and uridine phosphorylase // J. Med. Chem. - 1993. - Vol. 36, No. 26. - P. 4250-4254.
10. Naguib H.M.N. Enzymes of uracil catabolism in normal and neoplastic tissue / H.M.N. Naguib, M.H. el Kouni, S. Cha // Cancer Res. - 1985. - Vol. 45. - P. 5404-5412.

Рецензенты:

Тюренков И.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биофармации ФУВ ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Волгоград;

Сысуев Б.Б., д.фарм.н., доцент, заведующий научно-производственной лабораторией ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр» Администрации Волгоградской области, г. Волгоград.