
ФАРМАКОЛОГИЯ. ТОКСИКОЛОГИЯ

А. А. Озеров, М. С. Новиков, А. И. Луганченко, Т. Хартман, Р. У. Букхайт

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармацевтической и токсикологической химии,
ImQuest BioSciences, Inc., Maryland, USA

НОВЫЕ N-[2-(БЕНЗОИЛФЕНОКСИ)ЭТИЛ]ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ — СИНТЕЗ И АНТИ-ВИЧ-1 АКТИВНОСТЬ IN VITRO

УДК 615.3: 547.854.4

Алкилированием триметилсилилпроизводных пиримидиновых оснований изомерными 1-бром-2-(бензоилфенокси)этанами синтезированы новые производные бензофенона. Орто-производные урацила и тимина продемонстрировали высокую анти-ВИЧ-1 активность *in vitro* с величиной EC_{50} 0,030 и 0,009 μM , соответственно. Мета- и пара-изомеры были полностью неактивны.

Ключевые слова: анти-ВИЧ-1 активность, пиримидин, бензофенон.

A. A. Ozerov, M. S. Novikov, A. I. Luganchenko, T. Hartman, R. W. Buckheit

NOVEL N-[2-(BENZOYLPHENOXY)ETHYL] NUCLEIC BASES DERIVATIVES — SYNTHESIS AND ANTI-HIV-1 ACTIVITY IN VITRO

New benzophenone derivatives of pyrimidine nucleic bases have been synthesized by alkylation of their trimethylsilyl derivatives with isomeric 1-bromo-2-(benzoylphenoxy)ethanes. *Ortho*-derivatives of uracil and thymine demonstrated a high antiviral activity *in vitro* with EC_{50} value of 0,030 and 0,009 μM , respectively. *Meta*- and *para*-isomers were totally inactive.

Key words: anti-HIV-1 activity, pyrimidine, benzophenone.

Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1 пиримидиновой природы представляют собой наиболее перспективный класс современных лекарственных средств комплексной терапии ВИЧ-1 инфекции [2]. Среди соединений, продемонстрировавших высокий уровень противовирусной активности, следует выделить производные бензофенона, содержащие этот двуядерный ароматический фрагмент на конце ациклической цепи в N¹-замещенных урацилах. Ранее нами были синтезированы производные 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]урацила, содержащие разнообразные заместители в бензофеноновом фрагменте. Некоторые из них оказались эффективными ингибиторами ОТ ВИЧ-1 и подавляли репродукцию различных штаммов виру-

са *in vitro* в наномолярных концентрациях [6]. Однако родоначальная структура 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]урацила, не содержащая каких-либо заместителей во фрагментах урацила и бензофенона, нами ранее получена не была. Кроме того, до сих пор остается не до конца ясным характер влияния природы нуклеинового основания и типа замещения в бензофеноновом фрагменте (орто-, мета- или пара-) на противовирусные свойства соединений данного класса. Решению этих актуальных вопросов и посвящена настоящая работа.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Синтез и исследование анти-ВИЧ-1 активности *in vitro* новых производных нуклеиновых основа-

ний, содержащих фрагменты бензофенона, отличающихся характером их присоединения к ациклической цепи.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре Bruker AMXIII-400 в растворе диметилсульфоксида- D_6 , внутренний стандарт — ТМС. Интерпретацию спектров осуществляли с помощью лицензионной программы ACD/HNMR Predictor Pro 3.0 фирмы Advanced Chemistry Development (Канада). ТСХ выполняли на пластинках Sorbfil, элюент — 2-пропанол, проявление в парах иода. Температуры плавления измерены в стеклянных капиллярах на приборе Mel-Temp 3.0 (Laboratory Devices Inc., США).

Исследование анти-ВИЧ-1 активности *in vitro* проводили в культуре CEM-SS-клеток, которые суспендировали в культуральной среде в количестве 10^5 клеток/мл и инфицировали ВИЧ-1 (штамм HTLV-III_B) при мультипликации инфекции, равной 0,2. Немедленно после инфицирования вирусом вносили растворы, содержащие различные концентрации исследуемого вещества в ДМСО, и инкубировали в течение 4 сут. при температуре 37 °С. Число живых клеток устанавливали по окончании инкубации при помощи бромидда 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия, при этом определяли концентрацию вещества, которая на 50% защищала CEM-SS-клетки от цитопатического эффекта ВИЧ-1 (EC_{50}).

Цитотоксичность соединений изучали параллельно в неинфицированных культурах клеток, при этом определяли концентрацию вещества, которая на 50% уменьшала количество живых CEM-SS-клеток (CC_{50}). Расчетным путем определяли индекс селективности, являющийся отношением цитотоксической концентрации к ингибиторной концентрации: $\text{SI} = \text{CC}_{50} / \text{EC}_{50}$ [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез новых соединений был осуществлен, исходя из соответствующих изомеров оксибензойных кислот (салициловой, мета- и пара-оксибензойной), которые реакцией с хлористым тионилом превращали сначала в хлорангидриды, а затем по реакции Фриделя-Крафтса в орто-, мета- и пара-оксибензофеноны. Кипячение последних с 1,2-дибромэтаном в безводном ацетоне в присутствии карбоната калия привело к 2-бромэтиловым эфирам, которыми по разработанному нами ранее методу [1] алкилировали триметилсилилпроизводные пириидиновых оснований — урацила, тимина и цитозина, а также калиевую соль аденина, получаемую *in situ* из аденина-основания и карбоната калия в среде безводного диметилформамида по известной методике (рис.) [3].

Выход и физико-химические свойства полученных соединений представлены в табл. 1.

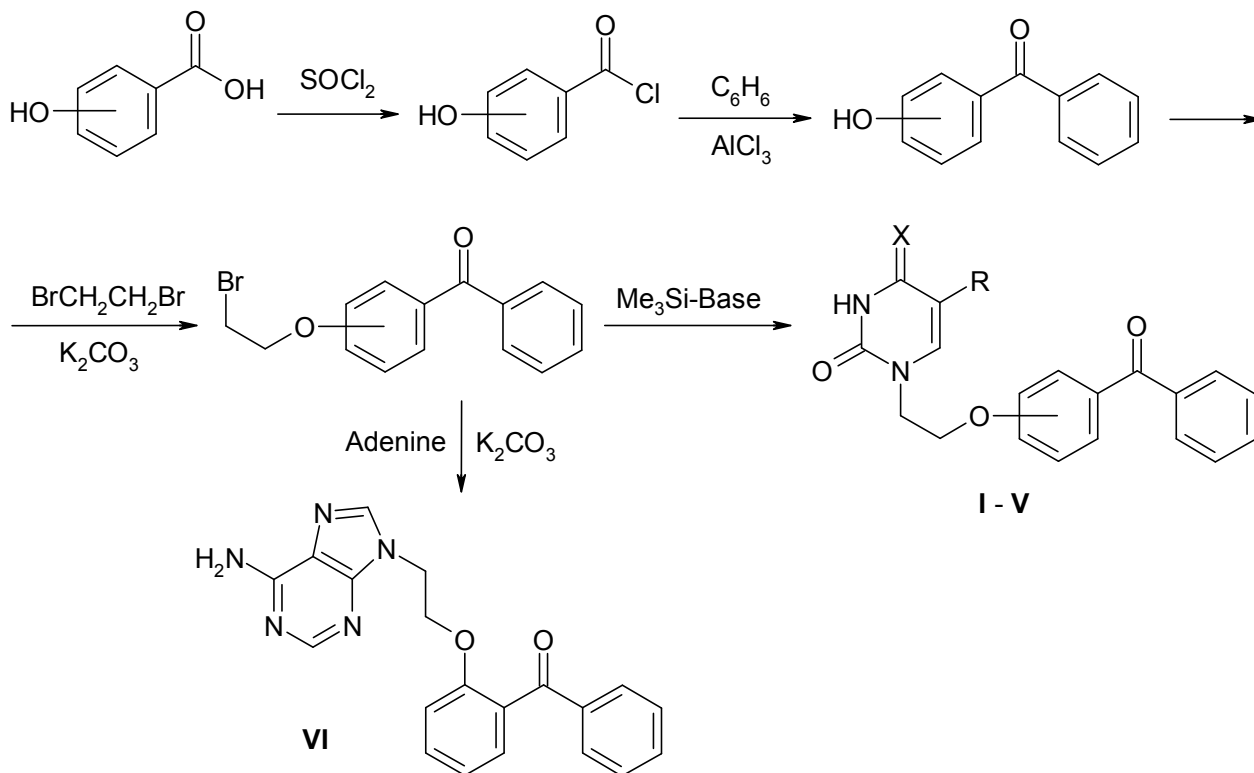


Рис. Синтез N-[2-(бензоилфенокси)этил]производных нуклеиновых оснований

ТАБЛИЦА 1

Свойства синтезированных соединений

Соединение	X	R	Тип замещения	Выход, %	Брутто-формула	T. пл., °C	R _f
I	O	H	орто	57	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄	157,0—159,5	0,67
II	O	H	мета	59	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄	209,5—212,0	0,60
III	O	H	пара	65	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄	199,0—201,5	0,52
IV	O	CH ₃	орто	52	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	178—180	0,71
V	NH	H	орто	46	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₃	214—217	0,30
VI	—	—	орто	65	C ₂₀ H ₁₇ N ₅ O ₂	199—201	0,25

Исследование противовирусных свойств синтезированных соединений в отношении дикого штамма ВИЧ-1 показало, что родоначальное соединение — 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]урацил (I), не имеющее никаких заместителей в ароматических ядрах, тем не менее обладает высокой противовирусной активностью и эффективно защищает Т-лимфоциты от цитопатического действия ВИЧ-1. Величина ингибиторной концентрации этого вещества составляет EC₅₀ = 0,030 μM при отсутствии цитотоксических свойств во всем изученном диапазоне концентраций (табл. 2). По своему противовирусному действию это вещество более чем в 2 раза превосходит невирапин (EC₅₀ = 0,075 μM [6]) и мало уступает самым активным из синтезированных нами ранее замещенных аналогов [6]. Изменение характера замещения во фрагменте бензофенона с орто- на мета- или пара- приводит к полному исчезновению противовирусных свойств и появлению заметной цитотоксичности (соединения II и III). Таким образом, наличие орто-типа замещения во фрагменте бензофенона является наиболее критичным фактором, определяющим саму способность вещества подавлять репродукцию ВИЧ-1.

ТАБЛИЦА 2

Противовирусная активность синтезированных соединений

Соединение	Ингибиторная концентрация EC ₅₀ , μM	Цитотоксическая концентрация CC ₅₀ , μM	Индекс селективности EC ₅₀ / EC ₅₀
I	0,030	> 100	> 3333
II	> 100	73,1	< 1
III	> 100	79,2	< 1
IV	0,009	> 100	> 11111
V	> 100	> 100	< 1
VI	0,670	> 100	> 149

Замена нуклеинового основания в 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]урациле (I) на цитозин (соединение V) или аденин (соединение VI) приводит к исчезновению или значительному ослаблению противовирусной активности. В противоположность этому, тиминовый аналог (соединение IV) продемонстрировал еще более выраженные противовирусные свойства с величиной EC₅₀ = 0,009 μM. Это дает основание полагать, что введение и других заместителей в положение C⁵ пиримидиновой системы базовой молекулы 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]урацила (I) может привести к получению высокоактивных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами установлено, что в ряду пиримидиновых производных бензофенона наиболее важными факторами, определяющими наличие высокой анти-ВИЧ-1 активности, являются наличие орто-замещения во фрагменте бензофенона и карбонильного атома кислорода в положении C⁴ пиримидиновой системы (урацил или тимин). При этом введение дополнительного заместителя в положение C⁵ урацила приводит к многократному усилению противовирусных свойств. Результаты исследований, в сочетании с полученными нами ранее данными о характере влияния различных заместителей в ароматических ядрах бензофенона на уровень эффективной концентрации *in vitro* и способность веществ данного ряда ингибировать ОТ ВИЧ-1, могут быть использованы для дальнейшего направленного синтеза перспективных анти-ВИЧ-1 агентов пиримидиновой природы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1-[2-(2-Бензоилфенокси)этил]урацил (I).

(А) Хлорангидрид салициловой кислоты. К 20,0 мл (0,275 моль) тионилхлорида добавляют 1,0 мл (0,013 моль) диметилформамида и при интенсивном перемешивании при температуре 5—10 °C порциями в течение 1 ч вносят 25,0 г (0,156 моль) тонкоизмельченного безводного салицилата натрия. Реакционную массу выдерживают в течение 1 сут. при комнатной температуре, избыток тионилхлорида отгоняют в вакууме водоструйного насоса при температуре бани не выше 60 °C, к остатку добавляют 200 мл n-гексана, фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме при температуре не выше 60 °C и получают 19,5 г хлорангидрида салициловой кислоты в виде светло-желтой подвижной жидкости, выход 80 %.

(Б) 2-Оксибензофенон. В трехгорлый реактор, снабженный обратным холодильником, термометром, капельной воронкой и эффективной мешалкой, помещают 100 мл (1,125 моль) бензола, 20,0 г (0,150 моль) безводного хлорида алюминия и при интенсивном перемешивании при температуре не выше 25 °C добавляют в течение 30 мин раствор 10,0 г (0,064 моль) хлорангидрида салициловой кислоты в 25 мл бензола. Реакционную массу перемешивают при температуре 55—60 °C в течение 2 ч, охлаждают до комнатной температуры и выливают при перемешивании в смесь 250 г воды со льдом. Добавляют

100 мл хлороформа, органический слой отделяют, промывают 5%-м раствором карбоната натрия, водой, сушат сульфатом магния, фильтруют и упаривают на кипящей водяной бане в вакууме водоструйного насоса. Остаток кристаллизуют из смеси н-гексан — диэтиловый эфир (9:1) и получают 9,9 г 2-оксибензофенона, Т. пл. 38—39 °С (Т. пл. 38—40 °С [5]), выход 78 %.

(В) 1-Бром-2-(2-бензоилфенокси)этан. Смесь 7,5 г (0,038 моль) 2-оксибензофенона, 15,0 мл (0,174 моль) 1,2-дибромэтана, 7,7 г (0,054 моль) безводного карбоната калия, 0,5 г (0,001 моль) дибензо-18-краун-6 и 150 мл безводного ацетона кипятят в течение 1 сут., фильтруют и упаривают на кипящей водяной бане в вакууме водоструйного насоса. Остаток растворяют в 100 мл хлороформа, промывают 5%-м раствором едкого натра, водой, 5%-м раствором хлористоводородной кислоты, водой, сушат сульфатом магния, фильтруют и упаривают на кипящей водяной бане в вакууме водоструйного насоса. Получают 9,8 г 1-бром-2-(2-бензоилфенокси)этана в виде светло-желтой вязкой жидкости, выход 85 %.

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 3,83 т (2 Н, 4 Гц, $\text{CH}_2\text{-Br}$); 4,42 т (2 Н, 4 Гц, $\text{CH}_2\text{-N}$); 7,06–7,70 м (9 Н, арил).

(Г) 1-[2-(2-Бензоилфенокси)этил]урацил. 2,0 г (0,018 моль) урацила, 25 мл (0,120 моль) гексаметилдисилазана и 0,25 г (0,005 моль) хлорида аммония кипятят с защитой от влаги воздуха до полного растворения осадка (4 ч), избыток гексаметилдисилазана отгоняют на кипящей водяной бане при остаточном давлении не менее 10 мм рт. ст., к остатку добавляют 3,0 г (0,010 моль) 1-бром-2-(2-бензоилфенокси)этана и нагревают при периодическом перемешивании при температуре 175—180 °С в течение 4 ч. Реакционную массу охлаждают, растворяют в 25 мл этилацетата, добавляют 25 мл 2-пропанола, через 30 мин выделившийся осадок отфильтровывают и фильтрат упаривают в вакууме. Остаток растворяют в 50 мл хлороформа, фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме, остаток кристаллизуют из 50 мл 2-пропанола и получают 1,9 г 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]урацила, Т. пл. 157—159,5 °С, выход 57%.

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 3,76 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-N}$); 4,15 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-O}$); 5,18 д (1 Н, 8 Гц, H^5); 6,74 д (1 Н, 8 Гц, H^6); 7,06–7,71 м (9 Н, арил); 11,13 с (1 Н, NH)

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 47,09; 65,80; 100,48; 112,83; 121,19; 128,59; 129,21; 132,12; 133,45; 137,09; 145,39; 150,73; 155,73; 163,53; 195,53.

Соединения II–VI получают аналогично.

1-[2-(3-Бензоилфенокси)этил]урацил (II).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 4,08 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-O}$); 4,25 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-N}$); 5,56 д (1 Н, 6,5 Гц, H^5); 7,25–7,72 м (10 Н, арил, H^6); 11,32 с (1 Н, NH).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 50,28; 69,00; 104,07; 118,41; 122,29; 125,94; 131,92; 132,96; 136,17; 140,31; 149,63; 154,36; 161,36; 167,11; 198,81.

1-[2-(4-Бензоилфенокси)этил]урацил (III).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 4,02 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-N}$); 4,21 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-O}$); 5,5 дд (1 Н, 8 Гц, 8 Гц, H^5); 6,99–7,62 м (10 Н, арил, H^6); 11,28 с (1 Н, NH).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 42,30; 63,70; 97,60; 105,12; 114,40; 128,70; 129,78; 129,60; 132,50; 137,80; 151,40; 153,80; 160,40; 162,60; 196,10.

1-[2-(2-Бензоилфенокси)этил]тимин (IV).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1,57 с (3 Н, CH_3); 3,75 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-N}$); 4,15 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-O}$); 6,79 с (1 Н, H^6); 7,06–7,69 м (9 Н, арил); 11,20 с (1 Н, NH).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 11,90; 46,84; 65,84; 107,98; 112,91; 121,10; 128,55; 129,17; 132,09; 133,40; 141,50; 150,72; 155,45; 164,13; 195,36.

1-[2-(2-Бензоилфенокси)этил]цитозин (V).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 3,72 т (2 Н, 7 Гц, $\text{CH}_2\text{-N}$); 4,07 т (2 Н, 7 Гц, $\text{CH}_2\text{-O}$); 7,09–7,76 м (13 Н, арил, H^5 , H^6 , NH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 48,20; 65,30; 93,19; 113,02; 121,31; 132,07; 133,55; 136,84; 146,49; 148,40; 149,67; 155,22; 161,28; 195,47.

9-[2-(2-Бензоилфенокси)этил]аденин (VI).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 4,15 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-N}$); 4,25 т (2 Н, 5 Гц, $\text{CH}_2\text{-O}$); 7,01–7,56 м (11 Н, арил, H^3 , H^8); 8,02 с (2 Н, NH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 40,20; 65,50; 112,30; 125,22; 127,4; 128,07; 130,30; 132,38; 133,47; 138,78; 139,20; 140,17; 150,30; 156,23; 157,67; 192,34.

ЛИТЕРАТУРА

- Новиков М. С., Озеров А. А. // Химия гетероциклич. соед. — 2005. — Вып. 7. — С. 1071—1075.
- Озеров А. А., Новиков М. С., Тимофеева Ю. А. и др. // Вестник ВолгГМУ. — 2012. — № 3. — С. 10—17.
- Петров В. И., Озеров А. А., Новиков М. С. и др. // Химия гетероциклич. соед. — 2004. — Вып. 1. — С. 35—42.
- Buckheit R. W., White E. L., Fliakas-Boltz V., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 1999. — Vol. 43. — P. 1827—1834.
- Martin R. Hydroxybenzophenones. — London: Springer, 2011. — 2913 p.
- Novikov M. S., Ivanova O. N., Ivanov A. V., et al. // Bioorg. Med. Chem. — 2011. — Vol. 19. — P. 5794—5902.