

УДК 577.113.3

Производные 5-ариламиноурацила как потенциальные фармакологические агенты двойного действия

Е. С. Матюгина¹, М. С. Новиков², Д. А. Бабков², В. Т. Валуев-Элистон¹, К. Ванпуть³,
С. Зикари³, А. Корона⁴, Е. Трамонтано⁴, Л. Марголис^{3*}, А. Л. Хандажинская^{1**}, С. Н. Кочетков¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

³Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

⁴Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Monserrato, 09042, Italy

*E-mail: margolil@helix.nih.gov

**E-mail: khandazhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 27.01.2015

РЕФЕРАТ Показано, что производные 5-ариламиноурацила, ранее продемонстрировавшие способность в концентрации 5–40 мкг/мл ингибировать рост *Mycobacterium tuberculosis*, являются также неконкурентными нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы ВИЧ-1, не проявляющими токсичности *in vitro* (на клетках МТ-4) и *ex vivo* (ткань миндалин человека).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА производные 5-(фениламино)урацила, 5'-норкарбоциклические аналоги нуклеозидов, сочетанные инфекции ВИЧ и *Mycobacterium tuberculosis*, двойное действие.

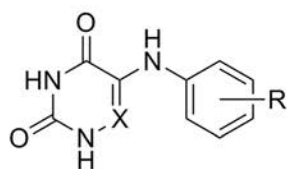
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ТБ – туберкулез; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; НИИОТ ВИЧ – нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека.

ВВЕДЕНИЕ

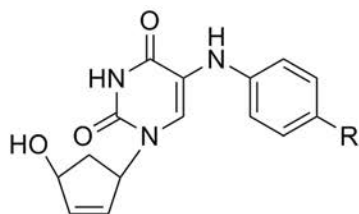
На сегодняшний день ВИЧ-инфекция и туберкулез (ТБ) считаются основными причинами смертности от инфекционных заболеваний в мире. Согласно последним оценкам ВОЗ, в 2013 году туберкулезом заболели 9 млн человек, умерли – 1.5 млн (из них у 360000 ТБ был ассоциирован с ВИЧ) [1]. В 2013 году в мире насчитывалось 35 млн больных СПИДом. В 2013 году ВИЧ-инфекция была выявлена у 2.1 млн человек, от СПИДа умерли 1.5 млн, причем ТБ остается основной причиной смерти больных с двойным инфицированием (66.5%) [2]. У ВИЧ-инфицированных повышен риск реактивации латентной формы туберкулеза (50% по сравнению с 10%), у больных ТБ ВИЧ-инфицированных отмечается высокий риск летального исхода. ВИЧ-инфицированные лица, принимающие противотуберкулезные препараты в стандартном 6-месячном режиме, имеют больший риск развития рецидива, чем

больные туберкулезом, получающие более длительный курс терапии [3]. Таким образом, одновременное заражение ТБ и ВИЧ представляет собой очень серьезную проблему и делает актуальным поиск препаратов двойного действия.

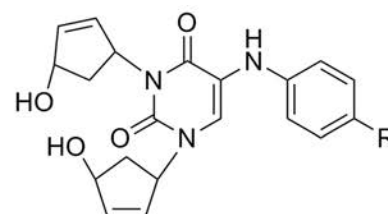
Недавно нами было показано, что определенные производные 5-ариламиноурацила обладают способностью влиять на активное деление клеток *Mycobacterium tuberculosis*. Полное ингибирование роста микобактерий соединениями (2), (3), (6), (7), (10), (15)–(17) и (19) (рис. 1) наблюдалось в концентрациях 5–40 мкг/мл, причем одно из них (19) проявило более высокую активность против штамма MS-115 с множественной лекарственной устойчивостью, включая пять основных противотуберкулезных препаратов первой линии (изониазид, рифампицин, стрептомицин, этамбутол и пиперазидин), чем в отношении чувствительного лабораторного штамма H37Rv [4].



(1)–(8): X = CH; (9)–(10): X = N
 (1): R = H; (2): R = 3-Me; (3): R = 4-Me;
 (4): R = 2,3-Me₂; (5): R = 2,5-Me₂;
 (6): R = 4-nBu; (7): R = 4-nBuO;
 (8): R = 4-PhO; (9): R = H; (10): R = 4-nBu



(11): R = H; (12): R = Me; (13): R = nBu;
 (14): R = nBuO; (15): R = PhO



(16): R = H; (17): R = Me; (18): R = nBu;
 (19): R = nBuO; (20): R = PhO

Рисунок 1.

Данная работа посвящена оценке производных 5-ариламиноурацила в качестве ННИОТ ВИЧ и более детальному изучению токсичности представительей соединений данной группы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединения (1)–(20) были синтезированы как описано ранее [4].

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензил-5-(фениламино)урацил (21)

К раствору соединения (11) (50 мг, 0.18 ммоль) в 5 мл диметилформамида (ДМФА) добавляли K₂CO₃ (36 мг, 0.26 ммоль) и VnBr (42 мкл, 0.35 ммоль). Реакционную массу перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали при помощи ТСХ. Растворитель удаляли в вакууме масляного насоса. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали системой CHCl₃–CH₃OH (98 : 2). Получили 43 мг продукта (21) (66%) в виде желтоватого порошка. R_f = 0.32 (CHCl₃–CH₃OH, 98 : 2). ¹H-ЯМР (CHCl₃): 7.50–7.49 (2H, м, H₃, H₅-Bn), 7.32–7.23 (6H, м, H₂, H₃, H₅, H₆, H₂, H₆-Bn), 6.95–6.93 (2H, м, H₃, H₄-Bn), 6.90–6.88 (1H, т, H₄), 6.20–6.18 (1H, м, H₂), 6.01 (1H, с, NH), 5.84–5.82 (1H, м, H₃), 5.61–5.58 (1H, м, H₁), 5.23–5.16 (2H, д, J = 13.70, CH₂), 4.84–4.83 (1H, м, H₄), 2.86–2.85 (1H, м, H_{a5}), 1.70–1.66 (1H, м, H_{b5}). ¹³C-ЯМР (CHCl₃): 160.80, 149.73 (C-4, C-2), 142.34 (C-4''), 139.24 (C-2'), 138.19 (C-4 Bn), 132.40 (C-3'), 129.63 (C-3'', C-5''), 129.34 (C-3, C-5 Bn), 128.63 (C-2'', C-6''), 127.91 (C-1''), 121.18 (C-1 Bn), 119.50 (C-5), 117.19 (C-6), 113.11 (C-2, C-6, Bn), 74.99 (C-1'), 61.05 (C-4'), 45.49 (C-5'), 39.94 (CH₂).

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензил-5-(n-метилфениламино)урацил (22)

Синтез проводили аналогично (21) исходя из соединения (12). Получили 35 мг продукта (22) (68%) в виде бело-желтого порошка. R_f = 0.43 (CHCl₃–CH₃OH, 98 : 2). ¹H-ЯМР (CHCl₃): 7.50–7.48 (2H, м, H₃, H₅-Bn), 7.31–7.23 (4H, м, H₂, H₄, H₆-Bn, H₅), 7.06–7.04 (2H, м, H₃, H₅), 6.87–6.85 (2H, м, H₂, H₆), 6.18–6.16 (1H, м,

H₂), 5.94 (1H, с, NH), 5.83–5.81 (1H, м, H₃), 5.58–5.56 (1H, м, H₁), 5.23–5.16 (2H, д, J = 13.76, CH₂), 4.84–4.82 (1H, м, H₄), 2.87–2.83 (1H, м, H_{a5}), 2.26 (3H, с, CH₃), 1.69–1.65 (1H, м, H_{b5}). ¹³C-ЯМР (CHCl₃): 160.75, 149.66 (C-4, C-2), 139.57 (C-4''), 139.14 (C-2'), 138.19 (C-4 Bn), 132.40 (C-3'), 130.14 (C-3'', C-5''), 129.33 (C-3, C-5, Bn), 128.67 (C-2'', C-6''), 127.88 (C-1''), 120.23 (C-1, Bn), 117.86 (C-2, C-6, Bn), 117.66 (C-5), 114.39 (C-6), 75.02 (C-1'), 61.12 (C-4'), 45.45 (C-5'), 39.94 (CH₂), 20.76 (CH₃).

Анти-ВИЧ-активность

Выделение рекомбинантной обратной транскриптазы ВИЧ-1 (гетеродимер р66/р51) и определение ее активности проводили как описано ранее [5, 6]. В качестве количественной характеристики ингибиторной активности соединений использовали константу ингибирования (K_i), рассчитанную по методу Диксона [7], для неконкурентных ингибиторов. В качестве контроля использовали ННИОТ первого поколения – невирапин.

Цитотоксичность *in vitro*

Препараты испытывали на цитотоксичность на культурах клеток МТ-4 с использованием автоматической системы подсчета клеток (ChemoMetec). Число жизнеспособных и мертвых клеток подсчитывали в контрольных и обработанных препаратами (6), (7) или (19) культурах. Препараты (6) и (7) тестировали в концентрациях 0.136–33 мкМ (0.035–9 мкг/мл), а препарат (19) – в концентрациях 0.272–66 мкМ (0.119–28 мкг/мл).

Жизнеспособные и мертвые клетки различали по накоплению йодата пропидия согласно инструкции производителя. Данные накапливали и анализировали с помощью программы Nucleoview (версия 1.0 ChemoMetec).

Токсичность *ex vivo*

Цитотоксичность препаратов (6), (7) и (19) определяли в тканях миндалин человека. Для каждой экспериментальной точки 27 тканевых фрагментов инкубировали с препаратом (19) (20 мкг/мл)

или с препаратами (6) или (7) (5 мкг/мл). Фрагменты ткани культивировали в течение 12 дней. Затем из контрольных и опытных образцов выделяли клетки, которые окрашивали комбинациями флуоресцентно меченных антител против CD3-QD605, CD4-QD655, CD8-QD705, CD25-APC, CD38-PE, HLA-DR-APC-Cy7, CXCR4-Brilliant violet 421, CCR5-PR-Cy5 CD45RA-FITC и CCR7-PE-Cy7 (Caltag Laboratories; Biolegend). Количество клеток различных фенотипов в выделенных суспензиях определяли с помощью проточной цитофлуорометрии как описано ранее [8]. Объем анализируемой суспензии контролировали с помощью бусинок Trucount (Becton Dickinson), подсчитанное число клеток нормировали по весу тканевых фрагментов, из которых они были выделены.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурное подобие соединений (1)–(20) синтезированным нами ранее производным урацила, которые являются ННИОТ ВИЧ [9, 10], дало нам основание предположить, что и эти вещества могут обладать сходными свойствами. Соединения (1)–(20) принадлежат к двум группам: (1)–(10) представляют собой 5-ариламинопроизводные урацила, а (11)–(20) содержат один или два дополнительных 4'-гидроксициклопентеновых фрагмента и могут, таким образом, рассматриваться как 5'-норкарбоциклические аналоги 2',3'-дидезокси-2',3'-уридина. Несмотря на известную структурную близость с нуклеозидами, 5'-норкарбоциклические аналоги способны ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ по неконкурентному механизму, связываясь в так называемом гидрофобном «центре связывания ненуклеозидных ингибиторов» [9, 10]. Однако соединения (1)–(20), ингибирующие рост *M. tuberculosis*, не обладали способностью ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ-1 ($K_i \gg 200$ мкМ). Единственным исключением стало соединение (15) ($K_i = 119$ мкМ), относящееся к классу 5'-норкарбоциклических аналогов уридина.

С целью повышения анти-ВИЧ-активности представителей данного класса путем увеличения их гидрофобности были синтезированы N³-бензилпроизводные (21) и (22) (рис. 2). Эти соединения были получены с приемлемыми выходами (61–69%) реакцией исходных карбоциклических аналогов (11) и (12) с бензилбромидом в присутствии поташа. Структуры и чистота синтезированных соединений были подтверждены методами ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии и ТСХ. Ингибиторная активность производного (22) в отношении обратной транскриптазы ВИЧ-1 оказалась несколько выше, чем у (21) ($K_i = 60$ и >100 мкМ соответственно) и исходных соединений (11) и (12).

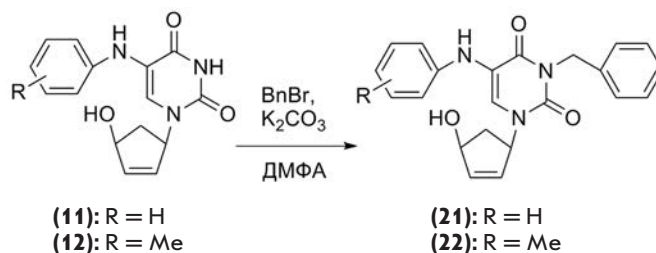


Рисунок 2.

Ранее мы оценили цитотоксичность синтезированных соединений на культурах клеток Vero, A₅₄₉, Huh7 и показали, что они нетоксичны вплоть до концентрации 50 мкг/мл ($CD_{50} \gg 100$ мкМ). Токсичность соединений (6), (7) и (19), проявивших наиболее выраженные противотуберкулезные свойства, мы дополнительно исследовали *in vitro* на культуре клеток MT-4 и *ex vivo* на системе ткани миндалин человека.

На клетках MT-4 соединения не проявили ни цитотоксических, ни цитостатических свойств в концентрациях вплоть до максимальных: 66 мкМ для (19), 33 мкМ для (6) и (7).

Оценка цитотоксичности соединений (20 мкг/мл для (19) и 5 мкг/мл для (6) и (7)) на разных типах клеток в тканевой системе показала отсутствие существенной гибели Т-клеток (CD3⁺), В-клеток (CD3⁻), CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, а также подгрупп CD4⁺ лимфоцитов: наивных (CD45RA⁺/CCR7⁺), центральных клеток памяти (CD45RA⁻/CCR7⁺), эффекторных клеток памяти (CD45RA⁻/CCR7⁻), дифференцированных эффекторных клеток памяти (Temra, CD45RA⁺/CCR7⁻), а также активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов. Последние определяли как CD4⁺/CD25⁺, CD4⁺/CD38⁺ Т-клетки или CD4⁺/HLA-DR⁺. Во всех этих группах число клеток в обработанных препаратами и контрольных тканях не различалось.

Таким образом, хотя новые производные 5-ариламиноурацила и не показали значительной анти-ВИЧ-активности, однако, даже слабая активность соединений (15) и (22) говорит о наличии их сродства к обратной транскриптазе ВИЧ-1. Структурное подобие соединений такого типа многим высокоактивным противовирусным агентам ненуклеозидной природы, применяемым при ВИЧ-инфекции в качестве компонентов комплексной высокоинтенсивной антиретровирусной терапии [11], в сочетании с выраженной противотуберкулезной активностью делает их интересными для дальнейших модификаций. ●

Работа поддержана в рамках проекта
 № 13-04-91441 НИЗ совместной программы
 РФФИ – Национальные институты здоровья
 (США) и проекта РФФИ № 13-04-00742.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global tuberculosis report 2014. WHO. http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_executive_summary.pdf?ua=1
2. Global HIV report 2014. WHO. http://www.who.int/hiv/data/epi_core_dec2014.png?ua=1.
3. Nahid P, Gonzalez L.C., Rudoy I., de Jong B.C., Unger A., Kawamura L.M., Osmond D.H., Hopewell P.C., Daley C.L. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007. V. 175. P. 1199–1206.
4. Matyugina E.S., Novikov M.S., Babkov D.A., Ozerov A.A., Chernousova L.N., Andreevskaya S.A., Smirnova T.G., Karpenko I.L., Chizhov A.O., Muthu P., et al. // *Chem. Biol. Drug Design.* 2015. Accepted article: DOI: 10.1111/cbdd.12603.
5. Novikov M.S., Valuev-Elliston V.T., Babkov D.A., Paramonova M.P., Ivanov A.V., Gavryushov S.A., Khandazhinskaya A.L., Kochetkov S.N., Pannecouque C., Andrei G., et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21. P. 1150–1158.
6. Le Grice S.F., Grüniger-Leitch F.R. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 187. P. 307.
7. Dixon M. // *Biochem. J.* 1953. V. 55. № 1. P. 170–171.
8. Grivel J.-C., Margolis L. // *Nature Protocols.* 2009. V. 4. P. 256–269.
9. Matyugina E.S., Valuev-Elliston V.T., Babkov D.A., Novikov M.S., Ivanov A.V., Kochetkov S.N., Balzarini J., Seley-Radtke K.L., Khandazhinskaya A.L. // *Med. Chem. Commun.* 2013. V. 4. P. 741–748.
10. Matyugina E.S., Valuev-Elliston V.T., Geisman A.N., Novikov M.S., Chizhov A.O., Kochetkov S.N., Seley-Radtke K.L., Khandazhinskaya A.L. // *Med. Chem. Commun.* 2013. V. 4. P. 1443–1451.
11. Tanaka H., Baba M., Saito S., Miyasaka T., Takashima H., Sekiya K., Ubasawa M., Nitta I., Walker R.T., Nakashima H., et al. // *J. Med. Chem.* 1991. V. 34. № 4. P. 1508–1511.