



УДК 547.963

АЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОЗИДОВ С АМИДНОЙ СВЯЗЬЮ

© 1995 г. С. Н. Михайлов, Е. В. Ефимцева, М. В. Фомичева,
М. С. Родионов, Е. Р. Керн*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

** Факультет педиатрии, Алабамский университет, Бирмингем, США*

Поступила в редакцию 27.04.94 г.

Описан простой синтез новых ациклических аналогов нуклеозидов, содержащих амидную связь. Структура синтезированных аналогов подтверждена данными ПМР- и УФ-спектроскопии. Полученные соединения не обладают цитотоксичностью и не проявляют активности против HIV-1 и вирусов группы герпеса при тестировании на клеточных культурах.

Ключевые слова: ациклические аналоги нуклеозидов, амидная связь.

Сообщения Ниельсона и сотр. [1, 2] о синтезе и биологических свойствах нуклеопептидов вызывают в последнее время большой интерес к изучению этого класса соединений, а также открывают широкие возможности для получения новых биологически активных соединений. Можно выделить два пути исследований в этой области. Один из них связан с синтезом неионных аналогов олигонуклеотидов, содержащих вместо фосфатной амидную группу, и с изучением их способности избирательно ингибировать репликацию вирусов [3 - 5]. Другой путь направлен на поиск противовирусных соединений в ряду ациклических аналогов нуклеозидов и нуклеотидов с элементом жесткости структуры, амидной связью [6].

В настоящей работе описан эффективный двухстадийный синтез ряда ациклических нуклеозидов (IIa - с), (IIIa - с) и (IVa - с), в которых природные гетероциклические основания присоединены к гидроксисилламинакарбонилметильному остатку, и приведены данные об их биологических свойствах.

Алкилирование бис-триметилсилильных производных тимина и цитозина этилбромацетатом приводило к N1-замещенным продуктам (Ia) и (Ib) с выходом 74 и 86% соответственно [7, 8]. Алкилированием натриевой соли аденина получали N9-производное (Ic) с выходом 40% [8, 9]. Последующее кипячение этиловых эфиров (Ia - с) с избытком аминоспирта в этаноле приводило к образованию соединений (IIa - с), (IIIa - с) и (IVa - с) с хорошим выходом. Структура синтезированных ациклических аналогов нуклеозидов подтвержде-

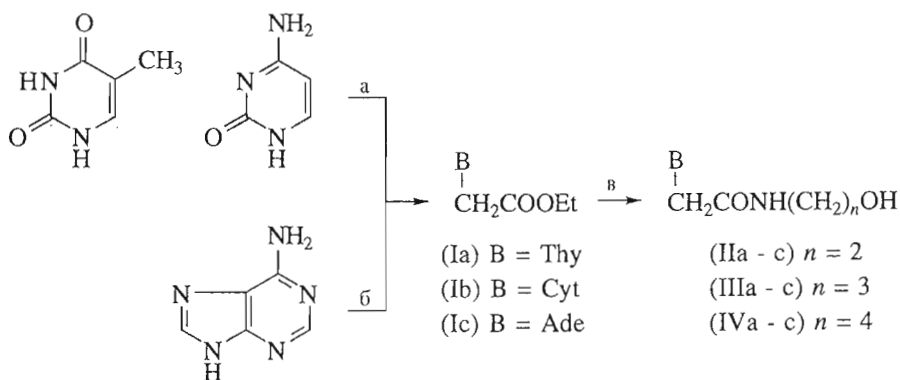
на с помощью ПМР-спектроскопии. ПМР-спектры соединений (II) - (IV) регистрировали в DMSO-*d*₆. В области 8.18 - 7.92 м. д. наблюдается триплетный сигнал N-H-протона, что доказывает образование амидной связи. Данные УФ-спектров синтезированных аналогов соответствуют спектрам природных нуклеозидов.

Результаты тестирования ациклических аналогов нуклеозидов (IIa - с), (IIIa - с) и (IVa - с) показали, что они не обладают цитотоксичностью и не активны против ВИЧ-1 (СЕМ-SS-клетки), вируса простого герпеса 1-го и 2-го типа, цитомегаловируса человека, варицелла зостер вируса (HFF-клетки) и вируса Эпштейна-Барра (DAUDI-клетки) в концентрации до 100 мкг/мл. Недавно появилось сообщение о получении трифосфата аденинового аналога (IIc) и о его включении в 3'-конец ДНК при катализе ДНК-полимеразой вируса простого герпеса 1-го типа [10]. Однако такой аналог нуклеозидтрифосфата не включается в ДНК в присутствии ДНК-полимеразы цитомегаловируса. Таким образом, данные, приведенные в работе [10], и полученные нами результаты тестирования на клеточных культурах позволяют предположить, что синтезированные ациклические аналоги нуклеозидов не превращаются в клетке в соответствующие трифосфаты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ПМР регистрировали на спектрометре Varian XL-100 (США) с рабочей частотой 100 МГц при 35°C. Значения химических сдвигов δ (в м. д.) рассчитаны относительно сигнала CHCl_3 (δ 7.2 м. д.) для соединений (Ia - с) и относительно стандарта Me_4Si (δ 0.0 м. д.) для растворов в DMSO-*d*₆ (где не указано). Величины КССВ (*J*) измерены в герцах.

Адрес: 117984, Москва, ул. Вавилова, 32, ИМБ РАН, Михайлову С.Н.



а) HMDs/(NH₄)₂SO₄, BrCH₂COOEt, C₂H₄Cl₂; б) NaH, BrCH₂COOEt, DMF; в) 5 экв. NH₂(CH₂)_nOH, C₂H₅OH, кипячение, 5 ч.

При описании спектров ПМР приняты следующие сокращения: с – синглет, д – дублет, т – триплет, к – квартет, м – мультиплет. УФ-спектры снимали в воде на приборе Specord UV VIS (ГДР). Температуры плавления определены на приборе ТП (СССР) и не исправлены. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧСФР) в системах изопропанол–конц. аммиак–вода, 7 : 1 : 2 (А); CHCl₃–EtOH, 8 : 2 (Б). Данные элементного анализа (С, Н, N) соединений (IIa - c) - (IVa - c) отличались от вычисленных значений не более чем на 0.4%.

Этиловый эфир 1-карбоксиметилтимина (Ia). Смесь 3.15 г (25 ммоль) тимина, 20 мл гексаметилдисулазана и 10 мг сульфата аммония кипятили до полного растворения (5 ч) без доступа влаги воздуха, упаривали в вакууме досуха, остаток упаривали с сухим 1,2-дихлорэтаном (10 мл). К остатку добавляли 50 мл 1,2-дихлорэтана и 3.0 мл (27 ммоль) бромэтилацетата и реакционную смесь нагревали 2.5 ч при 80°C без доступа влаги воздуха. После охлаждения до 20°C упаривали в вакууме досуха, к остатку добавляли 100 мл этанола, выпавший осадок отфильтровывали и промывали 100 мл хлороформа. Объединенные фильтраты упаривали досуха и остаток перекристаллизовывали из этанола. Выход 3.9 г (74%). R_f 0.89 (А), 0.88 (Б). Т. пл. 170 - 171°C. ПМР (CDCl₃): 7.19к (1H, J_{6,5} 1.2, H6), 4.24с (2H, CH₂), 3.98к (2H, CH₂CH₃), 1.74д (3H, 5-Me), 1.02т (3H, CH₂CH₃).

Этиловый эфир 1-карбоксиметилцитозина (Ib) получали аналогично из 2.8 г (25 ммоль) цитозина. Выход 4.0 г (86%). R_f 0.65 (А), 0.17 (Б). Т. пл. 219 - 223°C. ПМР (CDCl₃): 7.05д (1H, J_{6,5} 7.0, H6), 5.56д (1H, H5), 4.16с (2H, CH₂), 3.94к (2H, CH₂CH₃), 1.02т (3H, CH₂CH₃).

Этиловый эфир 9-карбоксиметиладенина (Ic). Суспензию 4.05 г (30 ммоль) аденина, 1.4 г (35 ммоль) 60% NaH в 100 мл DMF нагревали при 90°C до полного растворения основания. После

охлаждения до 20°C к реакционной смеси прибавляли 3.55 мл (32 ммоль) бромэтилацетата и выдерживали 2 ч. Упаривали в вакууме досуха, к остатку приливали 300 мл хлороформа и 100 мл воды. Слои разделяли, органический слой промывали водой (100 мл), сушили Na₂SO₄, фильтровали и упаривали досуха. Остаток кристаллизовали из этанола. Выход 2.65 г (40%). R_f 0.73 (А), 0.47 (Б). Т. пл. 222 - 226°C. ПМР (CDCl₃): 8.02с (1H, H8), 7.74с (1H, H2), 4.48с (2H, CH₂), 4.08к (2H, CH₂CH₃), 1.14т (3H, CH₂CH₃).

Общая методика получения гидроксикал-аминокарбонилметильных производных (IIa - c), (IIIa - c) и (IVa - c). Смесь 2 ммоль этилового эфира (Ia - c) и 10 ммоль аминок спирта в 5 мл этанола кипятили 5 ч. Осадок отфильтровывали, промывали этанолом и сушили.

1-(Гидроксиэтиламинокарбонилметил)тимин (IIa). Выход 0.43 г (95%). R_f 0.66 (А), 0.24 (Б). Т. пл. 252 - 253°C. УФ-спектр (вода): λ_{max} 272 нм (ε 9690) при pH 1 - 7; 272 нм (ε 7420) при pH 13. ПМР: 10.15ус (1H, 3-NH), 8.08т (1H, J_{NH,HC} 5.0, CONH), 7.25к (1H, J_{6,5} 1.2, H6), 4.26с (2H, CH₂), 3.35 - 3.04м (4H, 2CH₂), 1.76д (3H, H5).

1-(Гидроксиэтиламинокарбонилметил)цитозин (IIb). Выход 0.4 г (90%). R_f 0.52 (А), 0.03 (Б). Т. пл. 236 - 238°C (разл.). УФ-спектр (вода): λ_{max} 272 нм (ε 6600) при pH 7 - 13; 280 нм (ε 10090) при pH 2. ПМР: 7.96т (1H, J_{NH,HC} 5.0, CONH), 7.41д (1H, J_{6,5} 7.0, H6), 6.94с (2H, NH₂), 5.62д (1H, H5), 4.26с (2H, CH₂), 3.42 - 3.02м (4H, 2CH₂).

9-(Гидроксиэтиламинокарбонилметил)аденин (IIc). Выход 0.4 г (85%). R_f 0.70 (А), 0.06 (Б). Т. пл. > 230°C (разл.). УФ-спектр (вода): λ_{max} 261 нм (ε 13720) при pH 7 - 13; 258 нм (ε 13400) при pH 2. ПМР: 8.22т (1H, J_{NH,HC} 5.0, CONH), 8.04с (1H, H8), 7.98с (1H, H2), 7.10ус (2H, NH₂), 4.79с (2H, CH₂), 3.48 - 3.10м (4H, 2CH₂).

1-(Гидроксипропиламинокарбонилметил)тимин (IIIa). Выход 0.45 г (93%). R_f 0.66 (A), 0.25 (B). Т. пл. 244 - 246°C. УФ-спектр (вода): λ_{\max} 272 нм (ϵ 9580) при pH 1 - 7; 272 нм (ϵ 7960) при pH 13. ПМР: 10.29уc (1H, 3-NH), 7.92т (1H, $J_{\text{HN, HC}}$ 5.0, CONH), 7.39к (1H, $J_{6,5}$ 1.2, H6), 4.28с (2H, CH₂), 3.35 - 2.99м (4H, NCH₂, OCH₂), 1.76д (3H, H5), 1.63м (2H, CH₂).

1-(Гидроксипропиламинокарбонилметил)цитозин (IIIb). Выход 0.40 г (93%). R_f 0.50 (A), 0.03 (B). Т. пл. 210 - 213°C. УФ-спектр (вода): λ_{\max} 272 нм (ϵ 6860) при pH 7 - 13; 281 нм (ϵ 10100) при pH 2. ПМР: 7.94т (1H, $J_{\text{HN, HC}}$ 5.0, CONH), 7.42д (1H, $J_{6,5}$ 7.0, H6), 6.98с (2H, NH₂), 5.62д (1H, H5), 4.26с (2H, CH₂), 3.48 - 2.98м (4H, NCH₂, OCH₂), 1.55м (2H, CH₂).

9-(Гидроксипропиламинокарбонилметил)аденин (IIIc). Выход 0.40 г (80%). R_f 0.71 (A), 0.05 (B). Т. пл. > 230°C. УФ-спектр (вода): λ_{\max} 261 нм (ϵ 13970) при pH 7 - 13; 258 нм (ϵ 13630) при pH 2. ПМР: 8.18т (1H, $J_{\text{HN, HC}}$ 5.0, CONH), 8.06с (1H, H8), 8.00с (1H, H2), 7.10уc (2H, NH₂), 4.76с (2H, CH₂), 3.58 - 3.06м (4H, NCH₂, OCH₂), 1.55м (2H, CH₂).

1-(Гидроксипропиламинокарбонилметил)тимин (IVa). Выход 0.43 г (85%). R_f 0.66 (A), 0.27 (B). Т. пл. 235 - 236°C. УФ-спектр (вода): λ_{\max} 272 нм (ϵ 9390) при pH 1 - 7; 272 нм (ϵ 7820) при pH 13. ПМР: 10.25уc (1H, 3-NH), 7.98т (1H, $J_{\text{HN, HC}}$ 5.0, CONH), 7.35к (1H, $J_{6,5}$ 1.2, H6), 4.23с (2H, CH₂), 3.45 - 2.94м (4H, NCH₂, OCH₂), 1.76д (3H, H5), 1.43м (4H, 2CH₂).

1-(Гидроксипропиламинокарбонилметил)цитозин (IVb). Выход 0.40 г (87%). R_f 0.50 (A), 0.03 (B). Т. пл. 188 - 190°C. УФ-спектр (вода): λ_{\max} 272 нм (ϵ 7060) при pH 7 - 13; 281 нм (ϵ 10550) при pH 2. ПМР: 7.96т (1H, $J_{\text{HN, HC}}$ 5.0, CONH), 7.41д (1H,

$J_{6,5}$ 7.0, H6), 6.98уc (2H, NH₂), 5.61д (1H, H5), 4.25с (2H, CH₂), 3.46 - 2.94м (4H, NCH₂, OCH₂), 1.43м (4H, 2CH₂).

9-(Гидроксипропиламинокарбонилметил)аденин (IVc). Выход 0.50 г (95%). R_f 0.72 (A), 0.06 (B). Т. пл. > 230°C. УФ-спектр (вода): λ_{\max} 261 нм (ϵ 13890) при pH 7 - 13; 258 нм (ϵ 13550) при pH 2. ПМР: 8.16т (1H, $J_{\text{HN, HC}}$ 5.0, CONH), 8.06с (1H, H8), 8.00с (1H, H2), 7.10уc (2H, NH₂), 4.78с (2H, CH₂), 3.45 - 3.14м (4H, NCH₂, OCH₂), 1.44м (4H, 2CH₂).

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований за финансирование настоящей работы (проект 93-04-07607, С.Н.М.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. // Science. 1991. V. 254. № 5037. P. 1497 - 1500.
2. Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E., Berg R.H. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. № 5. P. 1895 - 1897.
3. Idziak I., Just G., Damha M.J., Giannaris P.A. // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. № 34. P. 5417 - 5420.
4. Lewis I. // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. № 36. P. 5697 - 5700.
5. Nielsen P.E., Egholm M., Buchardt O. // Bioconj. Chem. 1994. V. 5. № 1. P. 3 - 7.
6. Малахов Д.В., Семизаров Д.Г., Ясько М.В. // Биоорган. химия. 1995. В печати.
7. Niedballa U., Vorbruggen H. // J. Org. Chem. 1974. V. 39. № 25. P. 3654 - 3660.
8. Цитович А.В., Кочеткова М.В., Кузнецова Е.В., Мицнер Б.И., Швец В.И. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1086 - 1093.
9. Михайлов С.Н., Колобушкина Л.И., Крицын А.М., Падюкова Н.Ш., Флорентьев В.Л. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1974. № 11. С. 2582 - 2588.
10. Куханова М.В., Кузнецова Е.В., Краевский А.А., О'Хара Б., Беккер Дж., Морин Дж., Глазман Я. // Молекулярн. биология. 1994. Т. 28. № 3. С. 999 - 1010.

Acyclic Nucleoside Analogues with Amide Bond

S. N. Mikhailov, E. V. Efimtseva, M. V. Fomicheva, M. S. Rodionov, and E. R. Kern*

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow;

* Department of Pediatrics, University of Alabama, Birmingham, Alabama

Abstract – A simple synthesis of new acyclic nucleoside analogues with amide bond has been described, the structures being confirmed by NMR and UV spectroscopy. The obtained compounds have no anti-HIV, antiherpetic and cytotoxic activity.

Key words: nucleoside, acyclic nucleoside, amide bond.

Address: S.N. Mikhailov, Institute of Molecular Biology, Vavilov st., 32, 117984, Moscow, Russia.