



УДК 577.152.242.042

НОВЫЙ ИНГИБИТОР ПИРИМИДИНФОСФОРИЛАЗ

© 1998 г. Н. А. Дмитриева[#], О. К. Молчан, А. А. Комиссаров, В. Б. Соколов*,
А. Ю. Аксиненко*, А. Н. Пушкин*, А. Н. Чехлов*, В. Г. Дебабов

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1;

* Институт физиологически активных веществ РАН, Московская обл., Черноголовка

Поступила в редакцию 22.08.97 г. Принята к печати 15.04.98 г.

Соединение 5,5-бис(гидроксиметил)-2-оксо-2-[1-(2-трифторметил-3,3,3-трифторпропионамидо)-1-трифторметил-2,2,2-трифторэтил]-1,3,2-диоксафосфан (СА-423) является ингибитором уридин- и тимидинфосфорилаз *Escherichia coli* в опытах *in vitro*. СА-423 связывается с ферментами необратимо в отличие от широко изучаемых аналогов нуклеозидов, которые обратимо связываются с этими ферментами. LD₅₀ для СА-423 в опытах на мышах составила 40 мг/кг. В силу вовлеченности пиридинфосфорилаз в процессы канцерогенеза и относительно низкой токсичности ингибитора этих ферментов – СА-423, последний может рассматриваться как перспективное соединение для испытаний в противораковой терапии.

Ключевые слова: уридинфосфорилаза; тимидинфосфорилаза; ингибитор.

Пиридинфосфорилазы катализируют обратимый фосфоролиз нуклеозидов до рибозо-1-фосфата или дезоксирибозо-1-фосфата и соответствующего основания. У бактерий *Escherichia coli*, так же как у человека, обнаружены два фермента этого класса – уридинфосфорилаза (КФ 2.4.2.3) и тимидинфосфорилаза (КФ 2.4.2.4) [1]. Некоторые бактерии имеют один фермент – пиридинфосфорилазу, который способен преобразовывать оба субстрата (уридин и тимидин) с равной эффективностью [2]. Субстратом уридинфосфорилазы *E. coli* также может быть и тимидин, однако эффективность фермента при этом приблизительно в 10 раз меньше.

Гены уридинфосфорилазы *E. coli* [3] и человека [4] клонированы и секвенированы. Методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.5 Å изучена пространственная структура уридинфосфорилазы *E. coli* [5]; этот фермент является гексамером, состоящим из шести одинаковых субъединиц, молекулярная масса каждой из них 27.5 кДа, полипептидная цепь содержит 253 а.о. [6]. Клонированы и секвенированы также гены тимидинфосфорилаз *E. coli* [7] и человека [8]. Исследована трехмерная структура тимидинфосфорилазы *E. coli* с разрешением 2.8 Å; это димер с одинаковыми субъединицами, молекулярная масса каждой из них 90000 Да [7]. Пиридинфосфорилазы *E. coli* и человека обладают достаточно высокой гомологией (до 40% в аминокислотной последовательности). Тем не менее, несмотря на интен-

сивные работы по химической селективной модификации [9–12] и сайт-направленному мутагенезу [13, 14], структура активных центров и механизм катализа для пиридинфосфорилаз до сих пор не выяснены.

Интерес к пиридинфосфорилазам вызван рядом причин. Во-первых, эти ферменты используются в синтезе аналогов нуклеозидов, которые применяются в противораковой [15] и противовирусной [16] терапии. Во-вторых, данные ферменты принимают участие в метаболизме этих аналогов в организме. Так, 5-фторурацил (5FUra), широко применяемый в клинике, действует, либо включаясь в РНК, либо ингибируя тимидилатсинтазу. В обоих случаях первым метаболитом является 5-фторуридин (5FUrd), который образуется под действием уридинфосфорилазы/тимидинфосфорилазы. Равновесие этой реакции сдвинуто в сторону образования 5FUra. В случае подавления активности пиридинфосфорилаз теоретически стало бы возможным применять в качестве лекарства 5FUrd в концентрациях, много меньших, чем для 5FUra.

Третья причина интереса к этим ферментам связана с установлением того, что фактор роста эндотелиальных клеток человека (PD-ECGF), продуцируемый тромбоцитами и способствующий росту кровеносных сосудов в солидных опухолях, оказался на самом деле тимидинфосфорилазой [17]. Строго говоря, этот белок не является истинным ростовым фактором, так как не стимулирует деление клеток *in vitro*, тем не менее установлено, что мутационная инактивация тимидин-

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 315-04-56; e-mail: komissar@vniigen.msk.su).

фосфорилазы подавляет ангиогенез [18]. Подавление ангиогенеза – одна из серьезных задач терапии солидных опухолей. На данный момент известно, что концентрация уридин- и тимидинфосфорилаз в тканях злокачественных опухолей повышена по сравнению с окружающими ее нормальными тканями [19, 20].

Приведенные выше факты указывают на то, что пиридинфосфорилазы могут рассматриваться как новые и перспективные мишени при терапии онкологических заболеваний.

До сих пор интенсивно изучалось ингибирующее действие на эти ферменты только производных одного из двух субстратов (уридина), представляющих собой различные аналоги пиридиновых оснований [21, 22]. Среди этого класса ингибиторов найдены весьма эффективные вещества, например, 2,2'-ангидро-5-этилуридин (K_i для уридинфосфорилазы *E. coli* 0.03 мкМ) [23] и 5-бензилоксибензилациклоуридин (K_i для уридинфосфорилазы *E. coli* 0.7 мкМ) [24], нашедшие применение в клинической практике. Все эти ингибиторы относятся к классу конкурентных. Необходимо отметить, что эти соединения не инактивируют тимидинфосфорилазу *E. coli* [23]. До наших исследований ингибирующее действие аналогов другого субстрата – фосфата – на эти ферменты не было известно.

Первоначальной задачей являлось получение соединения (IV) (схема синтеза представлена ниже), в котором пентагональное окружение атома фосфора имитировало бы переходное состояние этого атома в активных центрах ферментов фос-

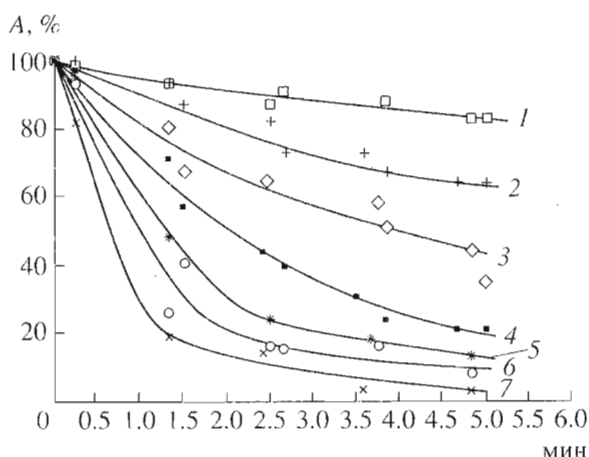
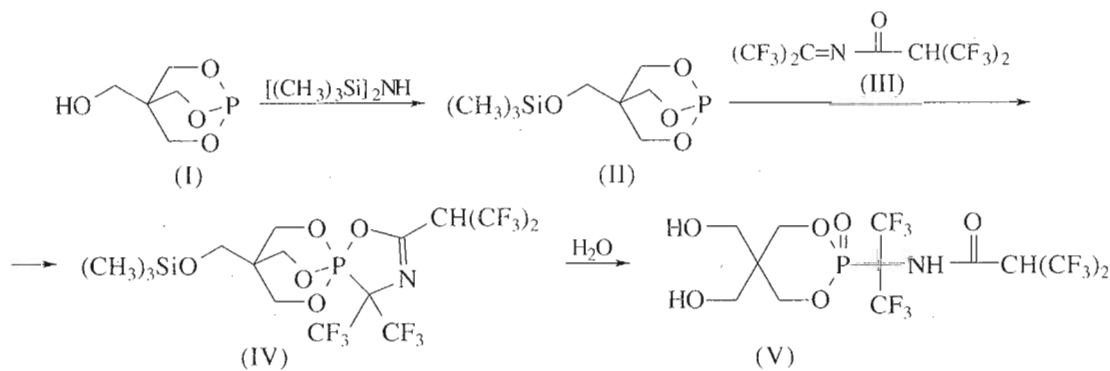


Рис. 1. Изменение активности уридинфосфорилазы *E. coli* под действием СА-423. Концентрации (мкМ): ингибитора 5 (1), 10 (2), 20 (3), 40 (4), 50 (5), 75 (6), 100 (7); [E] 0.37 мкМ.

форного обмена. Однако соединение (IV) оказалось нестабильным в водном растворе и подвергалось быстрому гидролизу до соединения (V). Дальнейшее исследование, проведенное нами, показало, что именно соединение (V) – 5,5-бис(гидроксиметил)-2-оксо-2-[1-(2-трифторметил-3,3,3-трифторпропионамидо)-1-трифторметил-2,2,2-трифторэтил]-1,3,2-диоксафосфан (названный СА-423) – является ингибитором пиридинфосфорилаз *E. coli*.

Ниже приведена схема синтеза соединения СА-423 (V).



Структура СА-423 подтверждена ЯМР-спектрами (см. Эксперимент. часть), а также рентгеноструктурным анализом, результаты которого будут опубликованы отдельно.

При взаимодействии уридинфосфорилазы *E. coli* с СА-423 наблюдается быстрая инактивация фермента, причем ее скорость возрастает с увеличением концентрации ингибитора (рис. 1).

Зависимость кажущейся константы ингибирования $k_{каж}$ от концентрации ингибитора представ-

ляет собой прямую линию (рис. 2), что свидетельствует о том, что ингибирование уридинфосфорилазы *E. coli* СА-423 происходит без образования нековалентного комплекса фермент-ингибитор. Если бы ингибирование уридинфосфорилазы СА-423 включало образование нековалентного комплекса фермент-ингибитор, то зависимость наблюдаемой константы скорости ингибирования от концентрации ингибитора имела бы гиперболический характер [24]. Константа скорости реакции

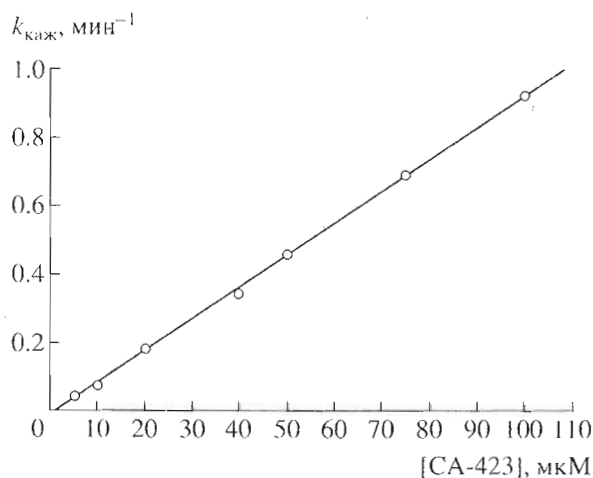


Рис. 2. Зависимость кажущейся константы скорости инактивации уридинфосфорилазы *E. coli* от концентрации СА-423; [E] 0.37 мкМ.

инактивации, рассчитанная по тангенсу угла наклона этой прямой, составила $9000 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$.

Инактивация уридинфосфорилазы СА-423 происходит необратимо. Активность фермента не восстанавливается при разбавлении, диализе или гель-фильтрации (см. Эксперимент. часть). Взаимодействие уридинфосфорилазы с СА-423 специфическое, так как скорость инактивации не изменяется в присутствии 100-кратного избытка (по сравнению с концентрацией фермента) бычьего сывороточного альбумина (данные не приведены).

Фермент от инактивации защищает один из его субстратов – фосфат. Константа связывания фосфата, рассчитанная в координатах Диксона, составила 190 мМ.

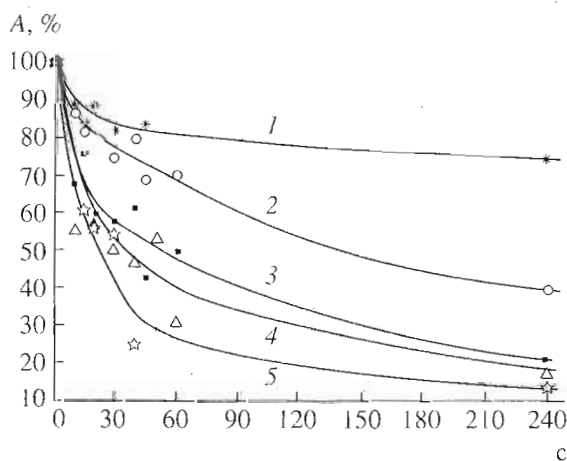


Рис. 3. Изменение активности тимидинфосфорилазы *E. coli* под действием СА-423. Концентрации (мкМ): ингибитора 5 (1), 8 (2), 10 (3), 20 (4), 50 (5); [E] 0.14 мкМ.

СА-423 инактивирует тимидинфосфорилазу *E. coli* аналогично уридинфосфорилазе (рис. 3). Константа скорости инактивации, определенная по графику зависимости $k_{\text{каж}}$ от концентрации ингибитора (рис. 4), составила $35700 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, т.е. является величиной того же порядка, что и для уридинфосфорилазы.

Таким образом, СА-423 можно отнести к новому классу ингибиторов пиримидинфосфорилаз, которые инактивируют ферменты необратимо и взаимодействуют с фосфатсвязывающей областью. Большинство исследованных до сих пор ингибиторов – производные уридина, которые инактивируют уридинфосфорилазы (из млекопитающих и *E. coli*), но не инактивируют тимидинфосфорилазы из этих же источников [25, 26]. Все эти ингибиторы относятся к классу конкурентных ингибиторов, обратимо взаимодействующих с уридинфосфорилазой.

Описанные в литературе ингибиторы являются менее эффективными по сравнению с СА-423: так, определено, что 10-миллимолярный 2,2'-ангидро-5-этилуридин инактивирует 2×10^{-4} мкмоль/л субъединиц уридинфосфорилазы *E. coli* за 1 мин [23], в то время как СА-423 в такой же концентрации инактивировал бы 3.7 мкмоль/л субъединиц этого же фермента за 1 мин.

По сравнению с уже известными ингибиторами пиримидинфосфорилаз СА-423 обладает более выраженным терапевтическим эффектом: после введения мышам 5-этил-2,2'-ангидроуридина в дозе 280 мг/кг веса мыши, вес привитой саркомы S-180 через 10 сут уменьшается на 17% [27]. Аналогичные эксперименты, проведенные с СА-423, показали, что введение мышам СА-423 (1 мг/кг веса) приводит к уменьшению веса аденокарциномы Са-755 через 11 сут на 37%.

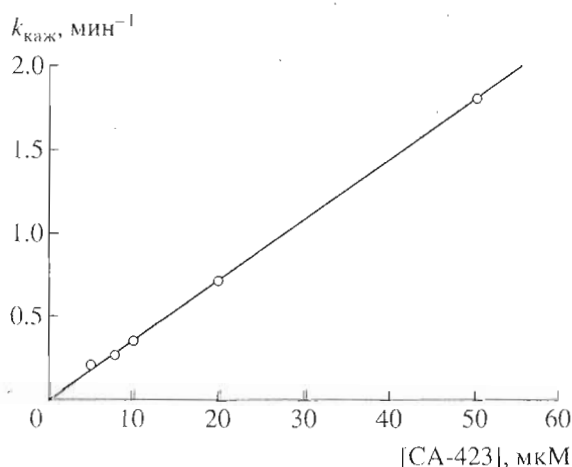


Рис. 4. Зависимость кажущейся константы скорости инактивации тимидинфосфорилазы *E. coli* от концентрации СА-423; [E] 0.14 мкМ.

В перспективе интересно исследовать фармакологические свойства СА-423. Предварительные опыты на мышах показали умеренную токсичность СА-423 в опытах *in vivo* (LD_{50} 40 мг/кг).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез 4-гидроксиметил-2,6,7,1-триоксафосфабицикло[2.2.2]октана (I) проводили по методике [28]. Имин (III) синтезировали по методике [29].

Трис, PMSF, EDTA и сульфат аммония получены от Serva (Германия), DEAE-сефадекс – от Pharmacia (Швеция), уридин – от Reanal (Венгрия), остальные реактивы отечественного производства (о.с.ч.) и применялись без дальнейшей очистки.

Спектры ЯМР 1H , ^{13}C , ^{19}F и $^{31}P\{H\}$ регистрировали на спектрометре Bruker СХР200 (Германия) относительно тетраметилсилана (внутренний), CF_3COOH и 85% H_3PO_4 (внешние) стандартов.

СА-423 синтезировали по схеме.

Раствор соединения (I) (3.2 г, 0.02 моль) в 10 мл гексаметилдисилазана кипятили 8 ч, полученную смесь перегоняли в вакууме. Получили 4.4 г (93%) белых кристаллов триметилсилильного производного (II) с т.пл. 78–80°C, т. кип. 103–106°C (3 мм рт. ст.). Найдено, %: С 40.44; Н 7.02; Р 13.20. Вычислено, %: $C_8H_{17}O_4PSi$: С 40.51; Н 7.17; Р 13.08. 1H -ЯМР-спектр ($CDCl_3$, δ , J, Гц): 0.1 с (9H, $(CH_3)_3Si$), 3.85 с (2H, CH_2OSi), 4.30 д (6H, CH_2OP , $J_{H,P}$ 7) м.д.; ^{31}P -ЯМР-спектр ($CDCl_3$, δ): 91.5 м.д.

Раствор имина (III) (2.06 г, 6 ммоль) в 5 мл абсолютного эфира прибавляли по каплям к раствору соединения (II) (1.41 г, 6 ммоль) в 5 мл эфира при комнатной температуре. Образование соединения (IV) устанавливали по ЯМР-спектрам реакционной смеси без выделения продукта реакции. ^{13}C -ЯМР-спектр (δ , J, Гц): 0.46 с (CH_3Si), 40.22 д ($\underline{C}CH_2OSi$, $^3J_{C,P}$ 39), 54.85 септ ($\underline{CH}(CF_3)_2$, $^2J_{C,F}$ 30), 77.15 д (CH_2OP , $^2J_{C,P}$ 39), 123.94 д кварт (\underline{CF}_3CP , $^1J_{C,F}$ 280, $^2J_{C,P}$ 4), 124.34 кварт (\underline{CF}_3CP , $^1J_{C,F}$ 283); 162.50 д ($C=N$, $^2J_{C,P}$ 35) м.д. ^{19}F -ЯМР-спектр (δ , J, Гц): 11.3 д (6F, $J_{F,P}$ 4), 12.3 д (6F, $J_{F,H}$ 7) м.д. ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , J, Гц): -13.11 септет ($J_{P,F}$ 4) м.д.

К реакционной смеси прибавляли 0.11 г (6.1 ммоль) воды и оставляли на ночь. Эфир упаривали и остаток перекристаллизовывали из CH_3CN . Получили 2.5 г (80%) белых кристаллов СА-423 (V) с т.пл. 173–175°C. Найдено, %: С 27.02; Н 2.53; Р 5.50. Вычислено, %: $C_{12}H_{12}F_{12}NO_6P$: С 27.44; Н 2.30; Р 5.90. 1H -ЯМР-спектр (CD_3CN , δ , J, Гц): 3.50 с (2H, CH_2OH), 3.80 с (2H, CH_2OH), 4.44–4.70 м (4H, CH_2OP), 4.66 септ (1H, $\underline{CH}(CF_3)_2$, $J_{H,F}$ 7), 7.96 д (1H, NH, $J_{H,P}$ 11) м.д. ^{13}C -ЯМР-спектр (CD_3CN , δ , J, Гц): 42.55 д ($\underline{C}CH_2$, $^3J_{C,P}$ 10), 52.77 септ ($\underline{CH}(CF_3)_2$, $^2J_{C,F}$ 30), 59.64 с (CH_2OH); 60.46 с (CH_2OH), 65.31 д септ (\underline{CF}_3CP , $^1J_{C,P}$ 140, $^2J_{C,F}$ 31),

72.86 д (CH_2OP , $^2J_{C,P}$ 8), 121.22 д кварт (\underline{CF}_3CP , $^1J_{C,F}$ 280, $^2J_{C,P}$ 4), 121.91 кварт (\underline{CF}_3CP , $^1J_{C,F}$ 286), 158.21 с ($C=O$) м.д. ^{19}F -ЯМР-спектр (CD_3CN , δ , J, Гц): 12.2 д (6F, $J_{F,P}$ 4), 13.7 д (6F, $J_{F,H}$ 7) м.д. ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , J, Гц): -0.28 септет ($J_{P,F}$ 3) м.д.

Уридинфосфоорилазу выделяли из биомассы штамма суперпродуцента *E. coli* K-12 AM 1906 [30] по описанной ранее методике [31]. Полученный белок был индивидуален по результатам электрофореза в ПААГ [32], имел удельную активность 120–150 ед./мг (25°C) и соотношение A_{280}/A_{260} , равное 1.78–1.9. За единицу удельной активности фермента принимали количество микромолей уридина, подвергшегося фосфоролиту за 1 мин в расчете на 1 мг белка. Активность выделенного нами фермента практически совпадает с литературными данными [33]. Концентрацию белка (с последующим пересчетом на одну субъединицу фермента) определяли спектрофотометрически по методу Брэдфорд при 280 нм, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [34].

Тимидинфосфоорилазу выделяли по модифицированной методике [35] из штамма *E. coli* C-600 с высоким уровнем синтеза тимидинфосфоорилазы [36]. Биомассу ресуспендировали в 100 мМ Трис-НСI-буфере, рН 7.6, содержащем 1 мМ PMSF и 1 мМ EDTA, и разрушали ультразвуковой обработкой, клеточный дебрис удаляли центрифугированием (20000 об/мин, 30 мин). К полученному супернатанту добавляли сульфат аммония до 0.43 от насыщения; суспензию центрифугировали, осадок отбрасывали. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 0.73 от насыщения. Полученный после второго центрифугирования суспензии (20000 об/мин, 30 мин) осадок растворяли в минимальном объеме 100 мМ Трис-НСI-буфера, рН 7.6, содержащего 1 мМ EDTA, 1 мМ 2-меркаптоэтанол. Раствор наносили на колонку (2 × 20 см) с сефадексом G-100, уравновешенным 10 мМ Трис-НСI-буфером, рН 6.8, содержащим 1 мМ EDTA и 50 мМ NaCl (буфер А). Белок элюировали тем же буфером. Собирали фракции по 2 мл, объединяли те из них, которые содержали тимидинфосфоорилазную активность, белок в них осаждали сульфатом аммония. Полученный осадок, содержащий тимидинфосфоорилазу, растворяли в минимальном объеме буфера А и наносили на колонку (2.5 × 12 см) с DEAE-сефадексом, уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили в линейном градиенте концентраций NaCl (50 → 300 мМ) в том же буфере. Собирали фракции объемом 7.6 мл, объединяли те из них, в которых присутствовала тимидинфосфоорилазная активность, белок в них осаждали сульфатом аммония.

Полученный белок был индивидуален по результатам электрофореза в ПААГ [32], имел

удельную активность 70–100 ед./мг и соотношение A_{280}/A_{260} , равное 1.5–1.7. За единицу удельной активности фермента принимали количество микромолей тимидина, подвергнувшегося фосфоролиту за 1 мин в расчете на 1 мг белка при 37°C. Концентрацию белка (с последующим пересчетом на одну субъединицу фермента) определяли спектрофотометрически по методу Брэдфорд при 280 нм, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [34]. Значение удельной активности выделенной нами тимидинфосфорилазы коррелирует с данными, описанными в литературе (122 ед./мг) [37].

Определение активности уридинфосфорилазы и тимидинфосфорилазы. Активность уридинфосфорилазы определяли по скорости накопления урацила, регистрируя поглощение при 280 нм при 25°C с помощью спектрофотометра Graphi-cord UV-240 (Shimadzu, Япония) [31]. Реакционная смесь (объем 600–1000 мкл) содержала 100 мМ фосфат натрия, pH 7.8 и 0.4 мМ уридин. Реакцию начинали добавлением аликвоты фермента. Молярный коэффициент поглощения принимали равным $1015 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [37].

Активность тимидинфосфорилазы определяли по скорости накопления тимина, регистрируя поглощение при 300 нм при 37°C с помощью спектрофотометра Graphi-cord UV-240 (Shimadzu, Япония) [35]. Реакционную смесь (объем 900 мкл), содержащую 50 мМ борат-цитратный буфер, pH 7.8, и фермент, инкубировали при 37°C в течение 2 мин. Реакцию начинали добавлением 100 мкл раствора 40 мМ тимидина и 100 мМ фосфата. Через определенные интервалы времени (0–15 мин) реакцию останавливали добавлением 800 мкл 0.5 М NaOH к 200 мкл реакционной смеси. Молярный коэффициент поглощения принимали равным $3610 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [37].

Реакция уридинфосфорилазы и тимидинфосфорилазы с СА-423. Раствор СА-423 (1.0–50 мМ) готовили в изопропанол (ранее методом ЯМР было показано, что СА-423 не гидролизует в условиях реакции ингибирования). Фермент (0.14–10 мкМ субъединиц) инкубировали с СА-423 (10 нМ–1 мМ) в 50 мМ боратном буфере, pH 7.8, содержащем 10% изопропанол, при 37°C. Контрольный образец инкубировали в тех же условиях без добавления реагента. За ходом инактивации следили, помещая аликвоту (50–100 мкл) реакционной смеси через определенные промежутки времени (0–15 мин) в систему для определения ферментативной активности. Степень инактивации фермента определяли, сравнивая скорости реакции в опытном и контрольном образцах.

Инактивация ферментов под действием СА-423 в присутствии субстратов и продуктов. Фермент (0.37–0.73 мкМ субъединиц) инкубировали с 2 мМ Urd, 2 мМ Ura, 0–500 мМ фосфатом на-

трия, со смесью 2 мМ Urd и 100 мМ фосфата или с 2 мМ Ura и 100 мМ фосфата в течение 30 мин при 20°C. Затем к инкубированному ферменту добавляли 25 мкМ СА-423; за ходом реакции следили, как описано ранее. Контролем служила система, не содержащая субстратов или продуктов.

Авторы благодарны проф. А.С. Миронову за предоставленный штамм – продуцент уридинфосфорилазы и методические консультации, д.б.н. В.П. Вейко за предоставленный штамм тимидинфосфорилазы, д.б.н. А.М. Козлову за проведение опытов по токсичности *in vivo* СА-423.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Neuhard J., Nygaard P.* // *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology* / Eds F.C. Neidhart, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanic, M. Schaechter, H.E. Umbarger. Amer. Soc. Microbiol., Washington, 1987. P. 445–473.
2. *Okuyama K., Hamamoto T., Noguchi T., Midorikawa Y.* // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996. V. 60. P. 1655–1659.
3. *Walton L., Richards C.A., Elwell L.P.* // *Nucl. Acid Res.* 1989. V. 17. P. 6741.
4. *Watanabe S., Uchida T.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 216. P. 265–272.
5. *Morgunova E.Yu., Mikhailov A.M., Popov A.N., Blagova E.V., Smirnova E.A., Vainshtein B.K., Mao Ch., Armstrong Sh.R., Ealick S.E., Komissarov A.A., Linkova E.V., Burlakova A.A., Mironov A.S., Debabov V.G.* // *FEBS Lett.* 1995. V. 367. P. 183–187.
6. *Cook W.J., Kosalka G.W., Hall W.W., Narayana S.V.L., Ealick S.E.* // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 262. P. 2852–2853.
7. *Walter M.R., Cook W.J., Cole L.B., Short S.A., Kosalka G.W., Krenitsky T.A., Ealick S.E.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 14016–14022.
8. *Moghaddam A., Bicknell R.* // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 12141–12146.
9. *Drabikowska A.K., Wozniak G.* // *Biochem. J.* 1990. V. 270. P. 319–323.
10. *Komissarov A.A., Romanova D.V., Dmitrieva N.A., Linkova E.V., Mironov A.S., Debabov V.G.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1994. V. 1205. P. 54–58.
11. *Komissarov A.A., Debabov V.G.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1995. V. 1252. P. 239–244.
12. *Komissarov A.A., Romanova D.V., Debabov V.G.* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 10050–10055.
13. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Миронов А.С., Андриюхина Р.В., Дебабов В.Г.* // *ДАН.* 1994. Т. 339. С. 819–821.
14. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И.* // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 835–838.
15. *Iigo M., Nishikata K., Nakajima Y., Szinai J., Veres Z., Szabolcs A., De Clercq E.* // *Biochem. Pharmacol.* 1990. V. 39. P. 1247–1253.
16. *Cheng Y.-C., Grill S., Dutchman G.* // *Biochem. Pharmacol.* 1979. V. 28. P. 3529.

17. Furukawa T., Yoshimura A., Sumizawa T. // Nature. 1992. V. 356. P. 668.
18. Moghaddam A., Hua-Tang Zhang, Fan Tai-Ping D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 998–1002.
19. Pauli J.L., Shuller M.G., Zelcer A.A. // J. Natl. Cancer Inst. 1977. V. 58. P. 1587–1590.
20. Yoshimura A., Kuwazuru Y., Fukukawa T., Yoshida H., Yamada K., Akiyama S.-Y. // Biochem. Biophys. Acta. 1990. V. 1034. P. 107–113.
21. El Kouni M.H., Naguib F.N.M., Niedzwicki J.G., Iltzsch M.N., Cha S. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 6081–6086.
22. Ynoe Y., Ling F., Kimura A. // Agric. Biol. Chem. 1991. V. 55. P. 629–631.
23. Veres Z., Neszmelyi A., Szabolcs A., Denes G. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 178. P. 173–181.
24. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 2. С. 530–534.
25. Park K.S., el Kouni M.N., Krenitski T.A., Chu S.N., Cha S. // Biochem. Pharmacol. 1986. V. 35. P. 3853–3855.
26. Veres Z.S., Neszmelyi A., Szabolcs A., Denes G. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 178. P. 173–181.
27. Veres Z.S., Szinai I., Szabolcs A., Ujzszasz K., Denes G. // Drugs Exptl. Clin. Res. 1987. V. XIII. P. 615–621.
28. Wadsworth W.S., Emmons W.D. // J. Amer. Chem. Soc. 1962. V. 84. P. 610.
29. Крюков Л.Н., Крюкова Л.Ю., Исаев В.А., Стерлин Р.Н., Кнунянц И.Л. // ЖВХО. 1977. Т. 22. С. 228–230.
30. Брикунов И.А., Миронов А.С., Суходолец В.В., Хурлес Е.М. // Генетика. 1989. Т. 25. С. 1717–1724.
31. Mikhailov A.M., Smirnova E.A., Tsuprun V.L., Taganova L.V., Vainshtein B.K., Linkova E.V., Komissarov A.A., Saprashvili Z.Z., Mironov A.S. // Biochem. Int. 1992. V. 26. P. 607–615.
32. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
33. Drabikowska A.K., Wozniak G. // Biochem. J. 1990. V. 279. P. 319–323.
34. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 2. P. 248–254.
35. Schwartz M. // Methods in Enzymology. 1978. V. 1. P. 442–445.
36. Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Андрюхина Р.В., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 1994. № 4. С. 2–4.
37. Razzel W.E., Khorana H.G. // Biochem. Biophys. Acta. 1958. V. 28. P. 562–565.

A New Inhibitor of Pyrimidine Phosphorylases

N. A. Dmitrieva^{##}, O. K. Molchan^{*}, A. A. Komissarov^{*}, V. B. Sokolov^{**},
A. Yu. Aksinenko^{**}, A. N. Pushin^{**}, A. N. Chekhlov^{**}, and V. G. Debabov^{*}

^{*}State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,
Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia

^{**}Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, Russia

5,5-Bis(hydroxymethyl)-2-oxo-1-(2-trifluoromethyl)-3,3,3-trifluoropropionamido-1-trifluoromethyl-2,2,2-trifluoroethyl-1,3,2-dioxaphosphan (CA-423) is an *in vitro* inhibitor of the *Escherichia coli* uridine and thymidine phosphorylases. Unlike widely studied nucleoside analogues, this compound binds to the enzymes irreversibly. Its LD₅₀ in mice was 40 mg/kg. Due to the involvement of pyrimidine phosphorylases in carcinogenesis and the relatively low toxicity of CA-423, it is promising for anticancer therapy.

Key words: uridine phosphorylase, thymidine phosphorylase, inhibitor

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 315-0456; e-mail: komissar@vniigen.msk.su.