



УДК 547.853.07

СИНТЕЗ АЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПИРИМИДИНОВЫХ
С-НУКЛЕОЗИДОВ И ИХ СВОЙСТВА

Мельник С. Я., Миникер Т. Д., Ярцева И. В.,
Недорезова Т. П., Потапова Г. И., Преображенская М. Н.

Всесоюзный онкологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва

Ациклические аналоги псевдоуридина — 5-(2-оксипропoxиметил)урацил и 5-(3-оксипропoxиметил)урацил — получены конденсацией 5-оксиметилурацила с этиленгликолем и 1,3-пропандиолом в DMF в присутствии концентрированной соляной кислоты. Действием на их триметилсилильные производные иодистого метила в ацетонитриле синтезированы аналоги 1-N-метилпсевдоуридина. Взаимодействие 1,3-N-диметилпроизводных 5-замещенных урацилов привело к 5-(2-оксипропoxиметил)изоцитозину и 5-(3-оксипропoxиметил)изоцитозину. Синтезированные соединения не проявляют цитотоксических свойств *in vitro* и *in vivo*. При изучении противовирусной активности *in vitro* показано, что аналоги 1-N-метилпсевдоуридина в концентрации 250 мкг/мл ингибируют репликацию вируса простого герпеса типа 1. Показано, что 5-(3-оксипропoxиметил)урацил и 1-N-метил-5-(3-оксипропoxиметил)урацил тормозят активность тимидинфосфорилазы, выделенной из гепатомы 22А мышей СЗНА, на 43 и 46% соответственно.

Аналоги нуклеозидов, содержащие вместо остатка углевода ациклический фрагмент, изучаются как потенциальные антиметаболиты [1–11]. К этой группе соединений относятся 9-(2-оксипропoxиметил)гуанин (ациклогуанозин, АСГ) и (S)-9-(2,3-диоксипропил)аденин ((S)-ДНРА) (схема), обладающие высокой ингибирующей активностью в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов [1–3]. Эти соединения можно рассматривать как аналоги гуанозина и аденозина, в которых сохранен фрагмент: нуклеиновое основание — C1'—O—C4'—C5' (АСГ) или нуклеиновое основание — C1'—C2'—C3' (ДНРА). Высокая избирательность антигерпетического действия АСГ связана с тем, что аналог фосфорилируется только под действием тимидинкиназы, индуцированной вирусом, и после превращения в трифосфат ингибирует вирусную ДНК-полимеразу в большей степени, чем клеточную [1, 2]. Для (S)-ДНРА предполагается ингибирование S-аденозил-L-гомоцистеингидролазы и связанных с этим процессов трансметилирования, что в конечном итоге приводит к подавлению репликации вируса [12]. В пиримидиновом ряду биологическая активность найдена у ациклических аналогов цитотоксических нуклеозидов [4, 7]. У всех синтезированных и изученных до настоящего времени ациклонуклеозидов алифатическая цепь присоединена к атому азота нуклеинового основания. С точки зрения возможного проявления антиметаболитных свойств представляют интерес также соединения, родственные природному С-нуклеозиду — псевдоуридину. Являясь субстратами многих ферментов пиримидинового обмена, С-нуклеозиды обычно устойчивы к действию катаболизирующих ферментов и в ряде случаев обладают ценными биологическими свойствами. Так, например, псевдоизоцитидин (ψ -iCyd) (схема) проявляет высокую цитостатическую и противолейкозную активность [13]. В настоящем сообщении описан синтез и некоторые биологические свойства ациклических аналогов пиримидиновых С-нуклеозидов.

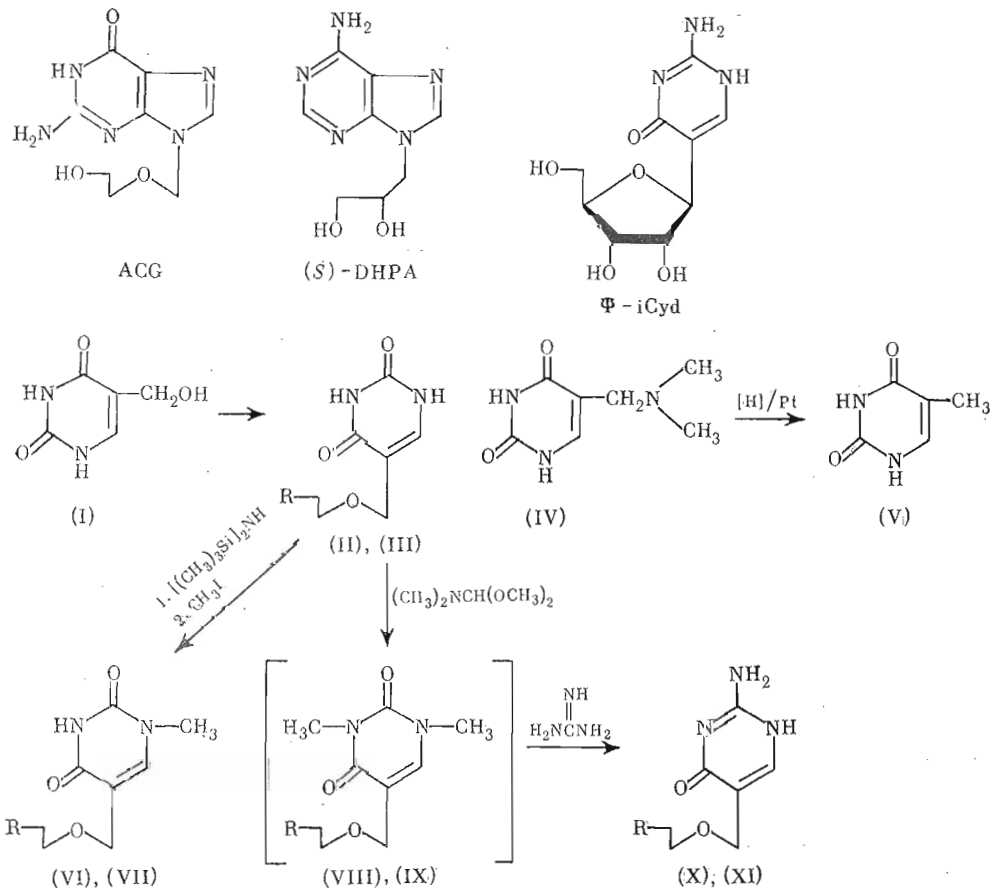
Взаимодействием 5-оксиметилурацила (I) [14] с этиленгликолем или 1,3-пропандиолом в DMF в присутствии концентрированной соляной кислоты получали 5-(2-оксипропoxиметил)урацил (II) или 5-(3-оксипропoxиметил)урацил (III) с выходом 60–70%. При этом отмечено образование побочного 5-(N,N-диметиламинометил)урацила (IV), выделенного в виде

Соединение	Выход, %	Т. пл., С°	Найдено, %			Брутто-формула
			C	H	N	
(II)	64,6	218–222	45,01	5,32	15,44	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₄
(III)	72,8	211–216	47,72	5,96	13,90	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₄
(IV) *	28	245–249 (разл.)	40,50	5,88	19,84	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂ ·HCl
(VI)	50,5	160,5–162	47,93	6,24	14,18	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₄
(VII)	51,0	166–168	50,28	6,51	13,16	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₄
(X)	20,1	155–156 (разл.)	44,35	6,11	22,30	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂ · ¹ / ₄ H ₂ O
(XI)	29,0	147–149 (разл.)	45,24	7,00	20,02	C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₂ · ³ / ₄ H ₂ O

* Найдено, %: Cl 16,91. Вычислено, %: Cl 16,93.

хлоргидрата. В отдельном опыте соединение (IV) получали нагреванием основания (I) в DMF в присутствии концентрированной соляной кислоты с выходом ~30%. Для подтверждения структуры 5-(N,N-диметиламино-метил)урацил (IV) гидронолизом в условиях, описанных для 5-(N,N-диэтиламинометил)уридина [15], превращен в тимин (V).

Чтобы получить ациклические аналоги псевдоизоцитидина, соединения (II) и (III) обрабатывали диметилацеталем диметилформамида [16] в условиях, описанных в работе [17]. При этом образовывались соответствующие



(II), (VI), (VIII), (X) R=OH; (III), (VII), (IX), (XI) R=CH₂OH

синтезированных соединений

Вычислено, %			$\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ) при pH		
C	H	N	1	7	12
45,16	5,41	15,05	261 (8300)	261 (7900)	286 (8200)
47,96	5,99	13,99	261 (8200)	261 (7700)	285 (8000)
40,11	5,77	20,04	261 (8000)	261 (7600)	288 (7600)
47,96	5,59	13,99	268 (10 600)	268 (10 600)	266 (7600)
50,46	6,59	13,08	269 (9800)	269 (9600)	266 (6800)
44,32	6,11	22,16	259 (7400)	287 (5700)	276 (7000)
45,17	6,87	19,76	259 (6000)	287 (5000)	276 (5500)

щие 1,3-N-диметилпроизводные (VIII) и (IX), которые без окончательной очистки вводили во взаимодействие с избытком гуанидина, и получали 5-(2-оксизотсиметил)изоцитозин (X) и 5-(3-оксипропоксиметил)изоцитозин (XI), что согласуется с механизмом реакции, предложенным в работах [18, 19]. Действием иодистого метила на триметилсилильные производные, полученные из соединений (II) и (III), синтезировали ациклические аналоги 1-N-метилпсевдоуридина (VI) и (VII).

Характеристики полученных соединений приведены в табл. 1, 2. Положение метильной группы у атома азота N1 в соединениях (VI) и (VII) доказано сохранением положения максимума поглощения в УФ-спектрах при переходе pH от 7 к 11. Характерное для производных цитозина батохромное смещение максимума по сравнению с соответствующими производными урацила (II) и (III) наблюдается в УФ-спектрах аналогов (X) и (XI) (pH 7).

В спектре ПМР соединения (IV) (см. «Экспериментальную часть») имеются сигналы протона 6-H при 7,88 м.д., протонов 5-CH₂-группы при 4,09 м.д. и протонов метильных групп при 2,91 м.д. с соотношением интегральных интенсивностей 1:2:6. При переходе от соединений (II) и (III) к соединениям (VIII) и (IX) соответственно сигналы двух метильных групп появляются при 3,34 и 3,40 м.д. Отнесение сигналов протонов заместителя при C5 в спектрах ПМР ациклоуклеозидов (табл. 2) проведено с использованием метода двойного резонанса.

Изучены цитотоксические свойства соединений (II), (III), (VI), (VII), (X) и (XI) *in vitro*. Показано, что в концентрации до 100 мкг/мл производные (II), (III), (X) и (XI) не влияют на включение [³H]тимидина в ДНК клеток рака яичника CaOv (CE₅₀ > 1000 мкг/мл), а производные (VI) и (VII) увеличивают включение на 30–70%. При изучении влияния полученных соединений на включение [¹⁴C]тимидина и [³H]дезоксцитидина в ДНК гепатомы 22А мышей СЗНА *in vivo* показано, что в дозе 200 мг/кг аналоги (III), (VI) и (X) не влияют на включение, а аналоги (II), (VII) и (XI) стимулируют включение меченых предшественников в ДНК на 50–130%. При исследовании на культуре клеток куриных фибробластов, инфицированных вирусом простого герпеса типа 1, производные (VI) и (VII) в концентрации 250 мкг/мл снижают титр вируса на 2,5–3,5 lg ЦПД₅₀*. Учитывая данные об усилении включения тимидина в ДНК под влиянием соединений (II), (VII), (XI), можно было предположить, что это связано с ингибированием активности катаболизирующего фермента — тимидинфосфорилазы (КФ 2.4.2.4). Изучение и практическое применение таких ингибиторов представляет несомненный интерес для подавления катаболизма дезоксинуклеозидов-антиметаболитов и модуляции

* Логарифм титра цитопатического действия.

Химические сдвиги (δ , м.д.) протонов в спектрах ПМР синтезированных соединений

Соединение	Растворитель	1'-H ₂	2'-H ₂	3'-H ₂	4'-H ₂	6-H	NCH ₃	NH
(II)	D ₂ O	4,25	3,69	3,62	—	7,58	—	—
(III)	D ₂ O+DMF-d ₇	4,27	3,65	1,82	3,68	7,70	—	—
(VI)	D ₂ O	4,33	3,75	3,67	—	7,78	3,41	—
	C ₅ D ₅ N+DMSO-d ₆	4,42	3,76	3,32	—	7,64	3,32	12,57
(VII)	D ₂ O	4,31	3,67	1,78	3,70	7,78	3,43	—
	C ₅ D ₅ N	4,41	3,96	2,03	3,80	7,45	3,25	13,22
(VIII)	CDCl ₃	4,13	3,76	3,66	—	7,28	3,34; 3,40	—
(X)	D ₂ O	4,31	3,73	3,64	—	7,70	—	—
(XI)	D ₂ O	4,27	3,66	1,82	3,66	7,70	—	—

Таблица 3

Влияние соединений (II), (III), (VI), (VII), (X) и (XI) на активность тимидинфосфорилазы

Соединение	Дезокси-рибоза, мкмоль	Ингибирование, %	Соединение	Дезокси-рибоза, мкмоль	Ингибирование, %
Контроль	0,500	—	(VII)	0,268	46
(II)	0,343	30	(X)	0,500	0
(III)	0,283	43	(XI)	0,468	6
(VI)	0,414	17			

их биологического эффекта. В связи с этим мы исследовали влияние синтезированных ациклонуклеозидов на активность тимидинфосфорилазы, выделенной из гепатомы 22А мышей СЗНА.

Как следует из данных, представленных в табл. 3, наиболее эффективными ингибиторами фермента являются 5-(3-оксипропоксиметил)урацил (III) и 1-N-метил-5-(3-оксипропоксиметил)урацил (VII).

Авторы выражают признательность Т. П. Исаковой, Я. В. Добрышину (Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР) и Э. В. Чекуновой, С. С. Маренниковой (Московский научно-исследовательский институт вирусных препаратов МЗ СССР) за исследование *in vitro* цитотоксических и противовирусных свойств синтезированных соединений.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР записаны на приборе Bruker-WH-360 (ФРГ). УФ-спектры получены на регистрирующем спектрофотометре Unicam SP-800 (Англия), длина оптического пути 1 см. Индивидуальность соединений контролировали ТСХ на силуфоле UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР) в системе хлороформ — метанол (4:1), для производных (X) и (XI) — в системе этилацетат — этанол (2:1). Цитотоксическую активность *in vitro* и *in vivo* изучали по методикам, описанным в работе [20], противовирусную активность — по методике [21]. В работе применяли 2'-дезоксидиридин фирмы Sigma (США). Для выделения тимидинфосфорилазы использовали мышей линии СЗНА. На 7-й день после перевивки гепатомы 22А мышей забивали, клетки извлекали из брюшной полости и помещали в равный объем холодного физиологического раствора. Центрифугированием при 150g в течение 3 мин отделяли от эритроцитов. Все выделение проводили при 4°С. Клетки гепатомы в соотношении 300 мг/мл суспендировали в 0,05 М КН₂Р₄ (рН 7,4), содержащем 5 мМ меркаптоэтанол и 1 мМ EDTA, и разрушали ультразвуком (20 кГц, 2×30 с). Гомогенат центрифугировали при 1500g в течение 30 мин. Супернатант использовали для определения активности тимидинфосфорилазы.

5-(2-Оксипропоксиметил)урацил (II). Реакционную смесь, состоящую из 21,47 г (151 ммоль) 5-оксиметилурацила (I) [14], 30 мл этиленгликоля и 10 мл конц. соляной кислоты в 500 мл DMF, перемешивали 6 ч при 80—

90° С. После охлаждения выпавший осадок отделяли, промывали спиртом и эфиром, сушили над P_2O_5 . Фильтрат упаривали в вакууме при 50° С, к остатку прибавляли этанол (300 мл), выдерживали 12 ч при 5° С и отфильтровывали еще 17,16 г продукта. Выход соединения (II) 18,16 г (64,6%). Для анализа образец кристаллизовали из воды.

5-(3-Оксипропоксиметил)урацил (III) получали аналогично производному (II) из 10 г (70,4 ммоль) 5-оксиметилурацила (I), 15 мл 1,3-пропандиола и 5 мл соляной кислоты в 300 мл DMF. Выход 10,25 г (72,8%).

1-N-Метил-5-(2-оксиэтоксиметил)урацил (VI). Смесь, состоящую из 4,0 г (21,5 ммоль) 5-(2-оксиэтоксиметил)урацила (II), 40 мл гексаметилдисулазана и 0,02 г сульфата аммония, кипятили 4 ч. Избыток гексаметилдисулазана отгоняли в вакууме, к полученному триметилсилильному производному приливали 100 мл ацетонитрила и 20 мл иодистого метила. Реакционную смесь оставляли в темноте при 20° С на 24 ч, затем упаривали в вакууме при 35° С, к остатку прибавляли 50 мл метанола, насыщенного аммиаком. Через 30 мин смесь фильтровали через целит, промывали целит метанолом, объединенные фильтраты упаривали в вакууме до $\sim 1/5$ первоначального объема, охлаждали. Выпавший осадок отделяли, получали 2,18 г (50,5%) производного (VI). Для анализа образец кристаллизовали из метанола.

1-N-Метил-5-(3-оксипропоксиметил)урацил (VII) получали аналогично соединению (VI) из 5,0 г (25 ммоль) 5-(3-оксипропоксиметил)урацила (III) и 25 мл иодистого метила. Выход 2,75 г (51%). Для анализа образец кристаллизовали из метанола.

5-(2-Оксиэтоксиметил)изоцитозин (X). Смесь, состоящую из 2,0 г (10,7 ммоль) 5-(2-оксиэтоксиметил)урацила (II) и 20 мл диметилацетата диметилформамида [16], кипятили 4 ч, избыток диметилацетата отгоняли в вакууме, получали 2,04 г (83,3%) хроматографически однородного 1,3-N-диметилпроизводного (VIII) в виде густого непрозрачного масла. К соединению (VIII) прибавляли гуанидин (получен из 7,5 г карбоната гуанидиния и 118 мл 0,7 М этилата натрия в этаноле), реакционную смесь нагревали 6 ч при 80–90° С. После охлаждения выливали в воду (100 мл) и нейтрализовали дауэком 50 (H^+) по универсальному индикатору. Смолу отделяли, промывали водой, растворитель отгоняли в вакууме, остаток кристаллизовали из спирта. Выход 5-(2-оксиэтоксиметил)изоцитозина (X) 0,4 г (20%, считая на производное (II)).

5-(3-Оксипропоксиметил)изоцитозин (XI) получали аналогично соединению (X) из 6,0 г (30 ммоль) производного (III), 40 мл диметилацетата диметилформамида, 13,8 г карбоната гуанидиния и 220 мл 0,7 М раствора этилата натрия в этаноле. Выход 1,73 г (29%).

5-(N,N-Диметиламинометил)урацил (IV). К раствору 0,5 г (3,75 ммоль) 5-оксиметилурацила в 20 мл DMF прибавляли 0,5 мл конц. соляной кислоты, смесь нагревали 4 ч при 80–90° С, охлаждали, выпавший осадок отделяли, промывали спиртом и эфиром, сушили над P_2O_5 . Выход 0,2 г (28%). ПМР (D_2O), δ , м.д.: 2,91 с (6H, $2CH_3$), 4,09 с (2H, CH_2), 7,88 с (1H, 6-H). Масс-спектр, m/z : 169 (M^+), 154 ($M-CH_3$)⁺, 111 [$M-CH_2N(CH_3)_2$]⁺.

Тимин (V). Смесь, состоящую из 0,63 г (3,0 ммоль) 5-(N,N-диметиламинометил)урацила (IV), 0,3 г PtO_2 , 14 мл воды и 56 мл спирта, перемешивали на магнитной мешалке и при 70° С в течение 4 мин пропускали водород. Затем перекрывали кран на обратном холодильнике и гидрировали 8 ч при 70° С, контролируя по ТСХ исчезновение исходного основания (IV). Реакционную смесь охлаждали, отделяли катализатор, фильтрат упаривали в вакууме, остаток кристаллизовали из воды. Получали 0,2 г (53%) тимина (V). ПМР ($DMSO-d_6$), δ , м.д.: 1,73 с (3H, CH_3), 7,26 с (1H, 6-H), 10,59 с (1H, NH) и 11,01 с (1H, NH). Найдено, %: С 47,21; Н 4,69; N 21,93. $C_5H_6N_2O_2$. Вычислено, %: С 47,62; Н 4,80; N 22,21.

Действие соединений (II), (III), (VI), (VII), (X) и (XI) на тимидинфосфорилазу. Реакцию проводили при 37° С в течение 1 ч. Инкубационная смесь объемом 0,5 мл содержала 0,08 М трнс-НСI-буфер, 0,05 М арсенатный буфер (рН 7,4), 1 мМ 2'-дезоксигуанидин, 1 мМ ациклонуклеозид (в контроле вода), 0,1 мл супернатанта (фермент). Реакцию останавлива-

ли добавлением 0,75 мл 0,4 н. HClO_4 при охлаждении. Активность фермента определяли по количеству выделившейся дезоксирибозы (реакция с дифениламино) [22]. Для 1 мкмоль дезоксирибозы поглощение при 610 нм составляет 1,03. Полученные данные приведены в табл. 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schaeffer H. J., Beauchamp L., de Miranda P., Elion G. B., Bauer J., Collins P. *Nature*, 1978, v. 272, p. 583.
2. Elion G. B., Furman P. A., Fyfe T. A., de Miranda P., Beauchamp L., Schaeffer H. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 5716-5720.
3. De Clercq E., Descamps J., De Somer P., Holy A. *Science*, 1978, v. 200, p. 563-565.
4. Kelley J. L., Krochmal M. P., Schaeffer H. J. *J. Med. Chem.*, 1981, v. 24, № 4, p. 472-474.
5. Kelley J. L., Kelsey J. E., Hall N. R., Krochmal M. P., Schaeffer H. J. *J. Med. Chem.*, 1981, v. 24, № 6, p. 753-756.
6. Schroeder A. C., Hughes R. G., Bloch A. J. *J. Med. Chem.*, 1981, v. 24, № 9, p. 1078-1083.
7. Rosowsky A., Kim S.-H., Wick M. J. *J. Med. Chem.*, 1981, v. 24, № 10, p. 1177-1181.
8. Abrams H. M., Ho L., Chu S. H. *J. Heterocycl. Chem.*, 1981, v. 18, № 5, p. 947-951.
9. Robins M. J., Hatfield P. W. *Can. J. Chem.*, 1982, v. 60, № 1, p. 547-553.
10. Parkin A., Harnden R. J. *Heterocycl. Chem.*, 1982, v. 19, № 1, p. 33-40.
11. Kelley J. L., Krochmal M. P., Schaeffer H. J. *J. Med. Chem.*, 1981, v. 24, № 12, p. 1528-1531.
12. Votruba J., Holy A. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1980, v. 45, № 12, p. 3039-3044.
13. Burchenal J. H., Ciovacco K., Kalaher K., O'Toole P., Kiefner R., Dowling M. D., Chu C. K., Watanabe K. A., Wempen I., Fox J. J. *Cancer Res.*, 1976, v. 36, № 4, p. 1520-1524.
14. Cline R. E., Fink R. M. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1959, v. 81, № 10, p. 2521-2527.
15. Кочерков Н. К., Будовский Э. И., Шибяев В. П., Елусеева Г. И. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1966, № 10, с. 1779-1785.
16. Arnold Z., Kornilov Z. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1964, v. 29, № 3, p. 645-651.
17. Matsuda A., Chu C. K., Reichman U., Pankiewicz K., Watanabe K. A., Fox J. J. *J. Org. Chem.*, 1981, v. 46, № 18, p. 3603-3609.
18. Hirota K., Watanabe K. A., Fox J. J. *J. Heterocycl. Chem.*, 1977, v. 14, № 3, p. 537-538.
19. Hirota K., Watanabe K. A., Fox J. J. *J. Org. Chem.*, 1978, v. 43, № 6, p. 1193-1197.
20. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Педорезова Т. П., Ворпоницкая Г. И., Преображенская М. Н., Авегисян Э. А., Герман Л. С., Полищук В. Р., Чекунова Э. В., Бектемиров Т. А., Анджапаридзе О. Г. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 7, с. 1047-1053.
21. Бектемиров Т. А., Чекунова Э. В., Анджапаридзе О. Г., Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Преображенская М. Н. *Вопр. вирусологии*, 1979, № 6, с. 603-606.
22. Langen P., Etzold G. *Biochem. Z.*, 1963, B. 339, S. 190-197.

Поступила в редакцию
2.III.1983

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF PYRIMIDINE C-NUCLEOSIDE ACYCLIC ANALOGUES

MELNIK S. YA., MINIKER T. D., YARTSEVA I. V.,
NEDORESOVA T. P., POTAPOVA G. I., PREOBRAZHENSKAYA M. N.

*All-Union Cancer Research Center, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

The acyclic analogues of pseudouridine — 5-(2-hydroxyethoxymethyl)uracil and 5-(3-hydroxypropoxymethyl)uracil — were prepared by condensation of 5-hydroxyuracil with 1,2-ethanediol or 1,3-propanediol in DMF in the presence of concentrated hydrochloric acid. Treatment of their trimethylsilyl derivatives with methyl iodide in acetonitrile led to analogues of 1-N-methylpseudouridine. 5-(2-Hydroxyethoxymethyl)isocytosine and 5-(3-hydroxypropoxymethyl)isocytosine were obtained by interaction of 1-N,3-N-dimethyl derivatives of 5-substituted uracils with guanidine. To obtained compounds exhibited neither in vitro nor in vivo cell toxicity. When assayed for antiviral activity in vitro the analogues of 1-N-methylpseudouridine showed the inhibitory effect on HSV-1 replication at a concentration of 250 $\mu\text{g/ml}$. It was shown that 5-(3-hydroxypropoxymethyl)uracil and 1-N-methyl-5-(3-hydroxypropoxymethyl)uracil inhibit the activity of thymidine phosphorylase isolated from mice C3HA hepatoma 22A by 43 and 46%, respectively.