



УДК 615.281.8:547.785.5.057

© 1990 г.

А. Э. Яворский, А. В. Туров, Л. Н. Решотько*,
В. Л. Флорентьев**

СИНТЕЗ, КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ РИБОФУРАНОЗИДОВ БЕНЗИМИДАЗОЛА

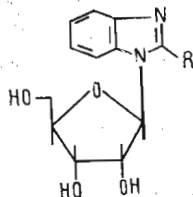
Киевский государственный университет им. Т. Г. Шевченко, Киев;

*Украинский научно-исследовательский ветеринарный институт, Киев;

**Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва

С целью изучения взаимосвязи структура — биологическое действие в ряду аналогов нуклеозидов на основе дезазапуринов получена силильным методом серия 1-β-*D*-рибофуранозидов 2-*R*-бензимидазола ($R = H, CF_3, SCF_3, CH_2SCF_3, CH_2Ph, CH_2CN$). На основании данных спектров КД и ПМР показано, что эти соединения, за исключением 1-β-*D*-рибофуранозид бензимидазола ($R = H$), существуют в растворе преимущественно в *син*-конформации. Расчет параметров псевдowращения рибофуранозидного цикла аналогов нуклеозидов в рамках *N-S*-модели свидетельствует о значительном преобладании *S*-популяции. Найдено, что в отличие от ациклических аналогов нуклеозидов с теми же гетероциклическими основаниями рибофуранозиды неактивны против энтеровирусов и более цитотоксичны.

В настоящее время поиску новых противовирусных химиопрепаратов в ряду аналогов нуклеозидов на основе дезазапуринов уделяется большое внимание [1, 2]. Ранее нами было показано [3—7], что ациклонуклеозиды бензимидазола (1,3-дидезазапурина) обладают высокой активностью против некоторых РНК-геномных вирусов. Настоящая работа продолжает начатые нами ранее исследования взаимосвязи структура — биологическое действие в ряду аналогов пуриновых нуклеозидов и посвящена синтезу рибофуранозидов 2-*R*-бензимидазола (I)—(VI) и выяснению различий в биологической активности полученных соединений и соответствующих ациклонуклеозидов.



$R = H$ (I); CF_3 (II); SCF_3 (III); CH_2SCF_3 (IV); CH_2Ph (V); CH_2CN (VI).

Из перечисленных выше соединений ранее были синтезированы лишь 1-β-*D*-рибофуранозиды бензимидазола (I) [8, 9] и 2-трифторметилбензимидазола (II) [10].

Нами для получения соединений (I)—(VI) был использован усовершенствованный силильный метод, заключающийся в конденсации соответствующих свободных азотистых оснований с 1-*O*-ацетил-2,3,5-три-*O*-бензоилрибофуранозидом в сухом ацетонитриде в присутствии триметилхлорсилана, трифторметансульфокислоты и избытка гексаметилдисула-

Синтез рибофуранозидов 2-R-бензимидазолов

Соединение	Условия гликозилирования		Выход, % *	Т. пл., °С (из воды)	R _f ^{2*}
	температура, °С	время, ч			
(I) ^{3*}	82	2	20	110–112	0,20
(II) ^{3*}	82	2	61	176–177	0,41
(III)	82	1	63	114–115	0,41
(IV)	82	2	54	139–141	0,43
(V)	82	1,5	48	109–111	0,44
(VI)	20	3	25	92–93	0,27

* Выход после двух стадий (гликозилирование и деблокирование).

** В системе хлороформ – метанол (87 : 13).

** Константы адиклонуклеозидов (I) и (II) в пределах экспериментальной ошибки соответствуют литературным данным [8, 10].

Таблица 2

Спектры ПМР рибофуранозидов 2-R-бензимидазолов в гексадейтеродиметилсульфоксиде

Соединение	Химический сдвиг, м. д. *									
	1'-СН (с)	2'-СН	3'-СН (дд)	4'-СН (кв)	5'-СН ₂ (м)	4-СН (м)	7-СН (м)	6- и 5-СН (м)	Δδ **	τ (с)
(I)	5,89	4,38т	4,14	3,99	3,69	7,80		7,25	0	8,48
(II)	5,87	4,50дд	4,19	4,00	3,73	7,86	8,14	6,42	0,28	—
(III)	6,11	4,47т	4,19	4,02	3,75	7,78	8,06	7,35	0,28	4,67
(IV)	5,88	4,31т	4,13	4,00	3,72	7,60	7,84	7,23	0,24	4,35
(V)	5,86	4,38т	4,12	3,90	3,70	7,55	7,85	7,15	0,30	7,30
(VI)	5,82	4,31т	4,14	4,03	3,75	7,58	7,85	7,28	0,17	7,54

* Константы спин-спинового взаимодействия приведены в табл. 4.

** Разность химических сдвигов H7 и H4.

Таблица 3

УФ- и КД-Спектры рибофуранозидов 2-R-бензимидазолов

Соединение	УФ-Спектр в метаноле: λ _{max} , нм (ε · 10 ⁻⁴)	КД-Спектр в воде: λ _{extr} , нм (Δε)		Мольная доля син-формы, % *
		B _{1u}	B _{2u}	
(I)	245 (6,53), 262 (5,78), 276 (3,54), 282 (3,36)	243 (-1,7)	247 (0,35)	16
(II)	264 (6,17), 280 (3,55), 286 (2,30)	250 (-2,68)	276 (1,21)	54
(III)	230 (7,73), 280 (8,33)	261 (-2,98)	290 (1,65)	—
(IV)	251 (6,55), 276 (4,56)	251 (-3,71)	282 (1,98)	89
(V)	260 (6,61), 278 (4,81), 284 (5,41)	246 (-4,35)	275 (1,75), 282 (2,22)	100
(VI)	260 (6,45), 277 (4,49), 283 (4,49)	247 (-1,86)	278 (0,74), 284 (0,66)	30

* Рассчитано по интенсивности B_{2u}-эффекта (см. текст).

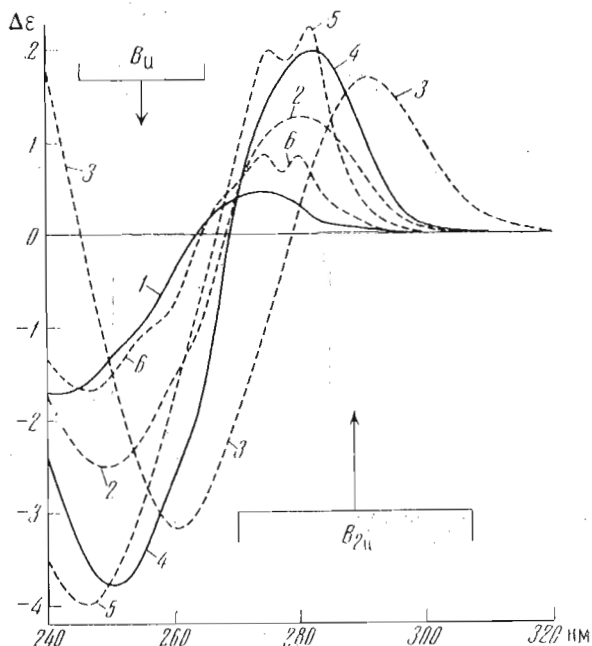
зана с последующим удалением бензоильных групп метанольным раствором аммиака [4].

В результате систематического изучения условий гликозилирования нами было установлено, что рибофуранозиды бензимидазола образуются с максимальным выходом (~70%) при использовании 3 экв. триметилхлорсилана и трифторметансульфонокислоты на 1 экв. основания.

Условия проведения реакции, выходы и некоторые характеристики незащищенных аналогов нуклеозидов (I)–(VI) приведены в табл. 1.

Строение полученных рибофуранозидов (I)–(VI) подтверждено ПМР-, УФ- и КД-спектрами (табл. 2 и 3).

Так, в спектрах ПМР рибофуранозидов (I)–(VI) в гексадейтеродиметилсульфоксиде присутствуют два дублета и один триплет двух вто-



Спектры кругового дихроизма рибофуранозидов 2-R-бензимидазола: 1 — (I), 2 — (II), 3 — (III), 4 — (IV), 5 — (V), 6 — (VI)

ричных 2'-, 3'- и одной первичной 5'-гидроксигруппы соответственно, сигналы которых исчезают при добавлении к образцу D_2O . Дублет H1' находится при 5,9 м.д., а мультиплеты остальных протонов рибозного цикла — в области 3,7—4,5 м.д. Различие в химических сдвигах протонов H4 и H7 бензимидазола составляет $\sim 0,3$ м.д., что свидетельствует в пользу того, что рибофуранозиды (II)—(VI) существуют в растворе преимущественно в *син*-конформации из-за стерических препятствий, создаваемых заместителями во 2-м положении бензимидазола. В противоположность этому в спектре ПМР рибофуранозида бензимидазола (I) протоны H4 и H7 проявляются в виде одного мультиплета, а сигнал протона H2 имидазольной части гетероцикла находится в более слабом поле (8,48 м.д.) по сравнению с сигналом H2 незамещенного бензимидазола (8,16 м.д.). Эти данные позволяют утверждать, что в растворе рибофуранозида бензимидазола (I) в отличие от рибофуранозидов 2-R-бензимидазола преобладает *анти*-форма.

Изучение спектров кругового дихроизма (КД) рибофуранозидов (I)—(VI) подтверждает выводы об их конформации, сделанные на основании данных спектроскопии ПМР. Спектры КД соединений (I)—(IV) (рисунок) близки по форме и характеризуются положительным эффектом Коттона в полосе B_{2u} -перехода и отрицательным — в полосе B_{1u} , что свидетельствует о β -конфигурации гликозидного центра в исследуемых нуклеозидах. Преобладание *син*-конформации в растворе соединений (II)—(IV) проявляется в спектрах КД в относительном увеличении амплитуды B_{2u} -перехода. Поэтому, предположив, что рибофуранозид 2-бензилбензимидазола (V) с максимальной амплитудой эффекта Коттона в полосе B_{2u} -перехода существует на 100% в *син*-форме, мы приблизительно оценили относительные веса *син*- и *анти*-конформеров рибофуранозидов (I)—(VI). Результаты расчета (табл. 3) свидетельствуют, что с увеличением объема заместителя во 2-м положении бензимидазола доля *син*-формы возрастает.

На основании величин КССВ $J_{1'2'}$, $J_{2'3'}$ и $J_{3'4'}$ между протонами рибофуранозного цикла (симулированы по программе PANIC) нами проведен расчет параметров псевдовращения ${}^N P$, ${}^S P$, ${}^N X$, ${}^S X$, ψ_m рибозного цикла рибофуранозидов (I)—(VI) в рамках *N-S*-модели Альтоны и Сундаралингана [11]. Использовали параметры из работы де Лью и Альтоны [12]. Результаты расчета приведены в табл. 4.

Рассчитанные параметры псевдоповращения рибофуранозного цикла
рибофуранозидов 2-R-бензимидазола *

Соединение	Экспериментально измеренные KCCB, Гц				Рассчитанные параметры псевдо- повращения [11, 12]				
	$J_{1'2'}$	$J_{2'3'}$	$J_{3'4'}$	$J_{1'2'} +$ $+ J_{3'4'}$	Ψ_m , град	N_P , град	S_P , град	X_N , %	X_S^{**} , %
(I)	5,80	5,46	3,62	9,42	39,4	14	163	41,3	42,0
(II)	6,96	6,09	3,18	10,14	34,3	18	167	28,6	30,4
(III)	7,23	6,06	2,96	10,19	35,0	37	173	27,5	27,7
(IV)	7,54	6,40	3,22	10,79	36,5	46	171	29,2	24,3
(V)	7,03	6,52	3,35	10,38	33,4	45	174	26,9	29,7
(VI)	7,09	6,34	2,94	10,03	33,3	36	174	27,5	29,1
Ado	5,74	5,09	3,19	8,93	40,8	11	169	43,7	42,6
Guo	5,74	5,45	3,85	9,59	40,2	12	166	41,7	42,6

*Спектры ПМР записаны в $(CD_3)_2SO$ при 333 К; KCCB симулированы по программе PANIC.

** Рассчитаны по формуле $X_N = 10(10 - J_{1'2'})$ [8].

Таблица 5

Влияние 1-R¹-2-R²-бензимидазолов на репродукцию энтеровирусов
свиней в культуре СПЭВ

Соединение		Максимально переносимая концентрация, мг/мл	Противовирусная активность	
R ²	R ¹		Концентра- ция, мг/мл	Снижение ин- фекционного титра энтеро- вируса в lg ТДН ₅₀ /мл
H	H	250	125	0,52
H	Rib (I)	125	125	0,52
H	CH(CH ₂ Cl)OCH ₂ CH ₂ OH *	250	31,2	1,83
CF ₃	H	62,5	62,5	0,85
CF ₃	Rib (II)	250	125	0,50
CF ₃	CH(CH ₂ OH)OCH ₂ CH ₂ OH *	500	125	1,00
SCF ₃	H	8	16	1,02
SCF ₃	Rib (III)	8	31,2	0,00
CH ₂ SCF ₃	H	125	125	2,52
CH ₂ SCF ₃	Rib (IV)	250	62,5	0,52
CH ₂ SCF ₃	CH(CH ₃)OCH ₂ CH ₂ OH *	250	100	1,17
CH ₂ C ₆ H ₅	H	125	125	3,0
CH ₂ C ₆ H ₅	Rib (V)	250	125	0,02
CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)OCH ₂ CH ₂ OH *	250	62,5	3,5
CH ₂ CN	H	250	62,5	1,86
CH ₂ CN	Rib (VI)	125	125	0,83
CH ₂ CN	CH(CH ₃)OCH ₂ CH ₂ OH *	250	100	0,33

* Данные по противовирусной активности ациклоглюкозидов взяты из работ [5—8].

Из полученных данных видно, что в растворе аналогов (I)—(VI) преобладает (~70%) S-конформация рибофуранозного цикла ($P = 167 - 174^\circ$, ${}^2E - {}^2T$). N-Зона представлена пакетом конформаций ${}^3E - {}^3T - {}^4E$ ($P = 18 - 46^\circ$). Согласно классификации факторов взаимодействия нуклеинового основания с углеводным циклом, приведенной в работе [13], возрастание доли S-популяции обусловлено усилением взаимодействия основания и 5'-CH₂OH-группы (1-3-взаимодействие). В нашем случае усиление 1-3-взаимодействия обусловлено преобладанием син-конформации в растворе рибофуранозидов (II)—(VI). Обращает на себя внимание отсутствие какой-либо корреляции между содержанием син(анти)-конформации и конформационным поведением рибозного цикла. Так, для соединения (II) (R = CF₃) доля син-формы составляет 54% и S-конформации — 71,4%, а в случае соединения (IV) (R = CH₂SCF₃) — 89 и 70,8% соответственно.

Синтезированные рибофуранозиды (I)—(VI) и соответствующие гетероциклические основания были испытаны в отношении РНК-геномных энтеровирусов свиней. Результаты биологических испытаний представлены в табл. 5. Из приведенных данных видно, что присоединение к гетероциклическому основанию рибофуранозного цикла в большинстве случаев вызывает уменьшение противовирусной активности, а присоединение оксисалкильного заместителя, имитирующего С2—С1—О—С4—С5-фрагмент рибофуранозного цикла — увеличение вирусингибирующего действия по сравнению с активностью исходных оснований. Максимальный эффект проявляют ациклические аналоги нуклеозидов, содержащие в положении 2 такие липофильные заместители, как $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ и CH_2SCF_3 .

Экспериментальная часть

Спектры ПМР записывали на спектрометре Bruker WP-100 SY в гексадегидродиметилсульфоксиде. УФ-спектры снимали на приборе US-VIS Specord (ГДР). Спектры КД записывали на дихрографе Roussel-Jouan III (Франция). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel F₂₅₄ (ФРГ) в системе хлороформ — метанол (87 : 13). Выделение и очистку целевых продуктов осуществляли на колонке (2 × 25 см) с сорбентом Toyopearl Butyl 650 S (Япония). Элюировали водой. Данные элементного анализа всех синтезированных соединений отличались от вычисленных значений более чем на 0,2%.

Рибофуранозиды (I)—(VI). К раствору 4 ммоль соответствующего 2-*R*-бензимидазола в 50 мл сухого ацетонитрила прибавляли при перемешивании 1,08 г (2 ммоль) 1-*O*-ацетил-2,3,5-*O*-трибензоилрибофуранозы, 1,3 мл (6 ммоль) гексаметилдисилазана, 0,76 мл (6 ммоль) триметилхлорсилана и 0,7 мл (8 ммоль) трифторметансульфокислоты. Условия гликозилирования приведены в табл. 1. После охлаждения реакционную смесь выливали в 150 мл насыщенного раствора NaHCO_3 и экстрагировали хлороформом (3 × 70 мл). Экстракты сушили Na_2SO_4 и хлороформ упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 30 мл полунасыщенного при 0° С метанольного раствора аммиака, выдерживали 24 ч при ~20° С и упаривали в вакууме. Полученное масло хроматографировали на колонке (2 × 25 см) с сорбентом Toyopearl Butyl 650 S, используя в качестве элюента воду. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали в вакууме, а остаток обрабатывали сухим эфиром. Выходы и физические константы рибофуранозидов (I)—(VI) приведены в табл. 1.

Противовирусную активность определяли относительно энтеровируса свиней В386/79 с инфекционным титром 7,0—7,33 lg ТЦД₅₀^{*}/мл. Вирусы титровали в пробирочной культуре почки эмбриона свиньи (СПЭВ) по цитопатическому действию. Предварительно определяли токсичность соединений для культуры клеток. Препараты изучали в концентрациях, указанных в табл. 5. После 1 ч контакта 10-кратных разведений вируса и культуры первый сливали и в пробирку добавляли 1 мл поддерживающей питательной среды (50% среды N199 + 50% лактальбумина) с растворенным в ней препаратом. Результаты опытов учитывали через 120 ч после заражения. Оценивали противовирусное действие по торможению цитопатического эффекта вирусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Revankar G. R., Srivastava P. C., Robins R. K. // Topics in chemistry of heterocyclic compounds. Bratislava, 1981. P. 81—84.
2. Revankar G. R., Gupta P. K., Adams A. D., Dalley N. K., McKernan P. A., Dan Cook P., Canonico P. G., Robins R. K. // J. Med. Chem. 1984. V. 27. P. 1389—1396.
3. Яворский А. Э., Туров А. В., Немазаный А. Г., Воловенко Ю. М., Бабичев Ф. С., Флорентьев В. Л. // Докл. АН УССР. Сер. Б. 1988. С. 57—60.
4. Яворский А. Э., Стеценко А. В., Загородний С. Г., Флорентьев В. Л. // Химия гетероцикл. соединений. 1988. № 2. С. 198—202.
5. Яворский А. Э., Решотько Л. Н., Кучерявенко А. А., Флорентьев В. Л. // Хим.-фармацевт. журн. 1988. № 6. С. 714—719.

* ТЦД — титр цитопатической дозы.

6. Яворский А. Э., Решотко Л. П., Кучерявенко А. А., Флорентьев В. Л. // Хим.-фармацевт. журн. 1988. № 7. С. 833—836.
7. Яворский А. Э., Стеценко А. В., Гогоман И. В., Бойко В. П., Загородний С. Г., Собко А. И., Тацкая В. Н., Квачев В. Г., Флорентьев В. Л. // Химия гетероцикл. соединений. 1988. № 5. С. 632—636.
8. Braunger H., Koine A. // Arch. Pharm. 1963. V. 296. № 10. P. 668—680.
9. Southon I., Pfeleiderer W. // Chem. Ber. 1978. B. 111. № 3. S. 996—1005.
10. Kazmierczyk Z., Stolarski R., Dudycz L. // Nucleosides and Nucleotides. 1982. V. 1. № 2. P. 275—287.
11. Altona C., Sundaralingam M. // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 8205—8212.
12. De Leeuw F. A. A. M., Altona C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans, 2. 1982. P. 375—384.
13. Флорентьев В. Л. // Молекулярная биология. Сер. «Итоги науки и техники». ВИНТИ, 1976. С. 1163—1181.

Поступила в редакцию
5.V.1989

После доработки
14.XII.1989

A. E. YAVORSKY, A. V. TUROV, L. N. RESHOTKO*, V. L. FLORENTIEV**
SYNTHESIS, CONFORMATIONAL ANALYSIS AND ANTIVIRAL ACTIVITY
OF BENZIMIDAZOLE RIBOFURANOSIDES

T. G. Shevchenko Kiev State University, Kiev;

**Ukrainian Research Veterinary Institute, Kiev;*

***V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

To study the structure-biological effect correlation in the series of nucleoside analogues containing deazapurines, a number of 2-R-benzimidazole 1-β-D-ribofuranosides (R = H, CF₃, SCF₃, CH₂SCF₃, CH₂Ph, CH₂CN) have been prepared by the modified silyl method. On the basis of CD and PMR data it was shown that the compounds exist in solution mainly as *syn*-conformers. Calculation of the furanose ring pseudorotation parameters in terms of *N-S* model indicates the predominance of *S*-population. In contrast to acyclonucleosides, the ribofuranosides obtained are nonactive against enteroviruses and more cytotoxic.