



УДК 547.853.07

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ 5-ПОЛИФТОРАЛКИЛ-
И 5-ПОЛИФТОРАЛКОКСИМЕТИЛ-2'-ДЕЗОКСИПИРИМИДИНОВЫХ
НУКЛЕОЗИДОВ

*Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Ворновицкая Г. И.,
Добрынин Я. В., Николаева Т. Г., Иванова Т. П.,
Ярцева И. В., Преображенская М. Н.*

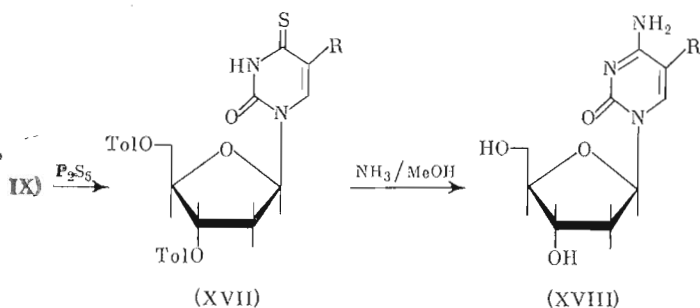
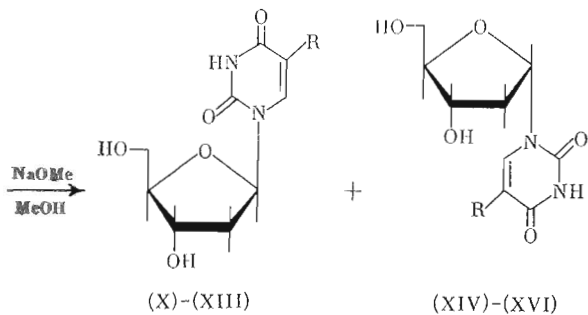
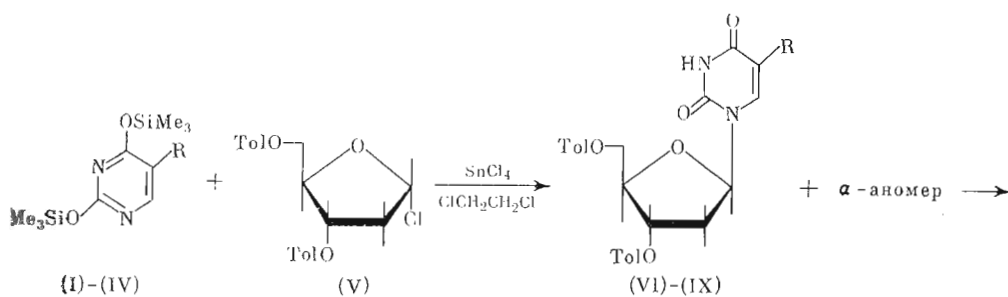
Онкологический научный центр Академии медицинских наук СССР, Москва

Взаимодействием 2-дезоксис-3,5-ди-*O*-*n*-толуил- α -*D*-рибофуранозилхлорида и триметилсилильных производных 5-замещенных урацилов и последующим дезацилированием получены 2'-дезоксипуридины, содержащие в положении 5 полифторалкильные и полифторалкоксиметильные заместители. Тионированием и последующим аминированием 1-(2'-дезоксис-3',5'-ди-*O*-*n*-толуил- β -*D*-рибофуранозил)-5-(2,2,3,3-тетрафторпропоксиметил)урацила синтезировано производное цитозина. Показано, что полученные соединения не влияют на активность тимидинкиназы из селезенки крысы, а также на синтез ДНК в культуре клеток рака яичника.

Изучение 5-замещенных дезоксиуридинов — аналогов тимидина представляет интерес, так как они являются потенциальными ингибиторами тимидинкиназы и тимидилатсинтетазы — ферментов-мишеней при поиске веществ с цитотоксической активностью. С этой целью мы синтезировали 2'-дезоксипуридины, содержащие в положении 5 полифторалкильные и полифторалкоксиметильные заместители, и изучили их способность влиять на фосфорилирование тимидина, катализируемое тимидинкиназой, а также на включение [³H]тимидина в ДНК клеток карциномы яичника *CaOv*.

Взаимодействием силилированных урацилов (I) — (IV) [1, 2] с 2-дезоксис-3,5-ди-*O*-*n*-толуил- α -*D*-рибофуранозилхлоридом (V) [3] в дихлорэтане в присутствии SnCl₄ получали защищенные 2-дезоксирибозиды (VI) — (IX), выделенные препаративной ТСХ с выходом 40—60% (см. схему). В случае 5-(2,2,3,3-тетрафторпропоксиметил)урацила (IV) выделено индивидуальное соединение (IX). Защищенные нуклеозиды (VI) — (VIII) по данным ПМР являются смесью α - и β -аномеров. Снятие толуильных защитных групп проводили действием метилата натрия в метаноле. Образующиеся аномерные нуклеозиды (X) — (XVI) разделяли препаративной ТСХ. Соединение (IX) по известной методике [4] переводили в тионпроизводное (XVII), которое действием аммиака в метаноле превращали в 5-замещенный 2'-дезоксипитидин (XVIII). Выход и характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 1.

Положение остатка дезоксирибозы в полученных нуклеозидах при атоме азота N1 пириимидинового кольца подтверждено сохранением мак-



R = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ (I, VI, X, XIV)

$\text{CH}_2\text{CHF}_2\text{CF}_3$ (II, VII, XI, XV)

$\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CF}_3$ (III, VIII, XII, XVI)

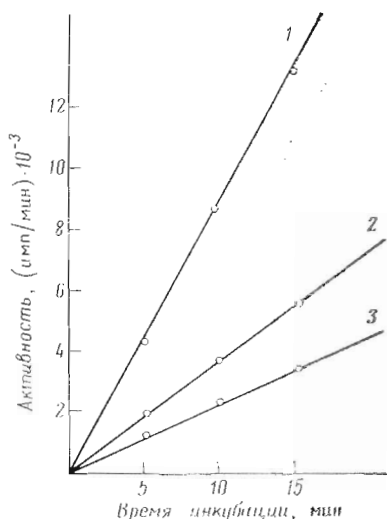
$\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{H}$ (IV, IX, XIII, XVII, XVIII)

Tol = $\text{OCC}_6\text{H}_4\text{CH}_3-n$

сумма поглощения в УФ-спектрах при переходе от pH 7 к pH 11 [5]. Конфигурация аномеров отнесена на основании данных спектров КД (табл. 1) и ПМР (табл. 2). В спектрах КД синтезированных β-аномеров, как и в случае природных пириимидиновых нуклеозидов, имеется положительный, а у α-аномеров — отрицательный максимум поглощения в области 270 нм. В спектрах ПМР β-аномеров сигналы протонов 1'-H вследствие совпадения вицинальных констант спин-спиновой взаимодействия $J_{1',2'}$ и $J_{1',2''}$ имеют вид триплетов с шириной ~ 13 Гц, в то время как для α-аномеров это кватреты с шириной ~ 40 Гц, что согласуется с литературными данными [6]. В случае соединений (XII) и (XVI) имеется также различие в характере расщепления сигналов протонов 2'-H и 2''-H — две группы сигналов при ~2 и ~2,6 м. д. для α-аномера, мультиплет при ~2,3 м. д. для β-аномера. Для соединений (XIII) и (XVIII) характер расщепления сигналов протонов 2'-H и 2''-H такой же, как для β-аномера (XII). Отмеченная особенность наблюдается и для пар аномеров (X), (XIV) и (XI), (XV), несмотря на частичное перекрытие

сигналов протонов при 2'-С-атоме с сигналом протонов фторалкильной группы.

Биологическая активность синтезированных нуклеозидов была изучена в ферментной системе тимидинкиназы из селезенки крысы с гепатомой. Для известных конкурентных ингибиторов тимидинкиназы — 5-иод-, 5-бром- и 5-фтор-2'-дезоксисуридина в этой системе были определены следующие значения констант ингибирования: $1,2 \cdot 10^{-4}$, $1,4 \cdot 10^{-4}$ и $2,0 \cdot 10^{-3}$ М соответственно. Определение конкурентной кинетики при добавлении в реакционную среду 5-бром-2'-дезоксисуридина показано на рисунке. Соединения (X) — (XVI) и (XVIII) не влияли на активность тимидинкиназы. Цитотоксическое действие полученных соединений в сравнении с 5-галлоид-2'-дезоксисуридинами изучено на мопослойных культурах клеток *CaOv* карциномы яичника человека. Показано, что для 5-иод-, 5-бром- и 5-фтор-2'-дезоксисуридина CE_{50} составляет 0,3, < 1 и 60 мкг/мл соответственно. Для соединений (X) — (XI) и (XVIII) $CE_{50} > 50 - 70$ мкг/мл.



Влияние 5-бром-2'-дезоксисуридина на активность тимидинкиназы: 1 — контроль, 2 — 0,08 мкмоль, 3 — 0,16 мкмоль

Таблица 1

Характеристики синтезированных соединений

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	Найдено, %			Формула	Вычислено, %		
			С	Н	F		С	Н	F
(IX)	54,7	163--164	57,81	5,16	14,29	$C_{20}H_{28}F_4N_2O_8$	57,24	4,64	12,49
(X)	36,5	164--165	44,50	4,75	17,34	$C_{12}H_{15}F_3N_2O_5$	44,45	4,66	17,58
(XI)	20,7	149--150	42,00	4,45	21,95	$C_{12}H_{14}F_4N_2O_5$	42,18	4,12	22,21
(XII)	20,5	155--156	42,53	5,23	—	$C_{12}H_{15}F_3N_2O_6$	42,36	4,44	16,75
(XIII)	41,8	121--122	41,90	4,34	19,97	$C_{13}H_{16}F_4N_2O_6$	41,94	4,33	20,41
(XIV)	23,0	111--112	44,03	4,84	17,43	$C_{12}H_{15}F_3N_2O_5$	44,45	4,66	17,58
(XV)	7,6	50--51	41,22	4,38	21,84	$C_{12}H_{14}F_4N_2O_5 \cdot 1/3 H_2O$	41,39	4,26	21,83
(XVI)	29,5	44--45	42,54	5,13	—	$C_{12}H_{15}F_3N_2O_6$	42,36	4,44	16,75
(XVIII)	30,8	—	39,99	4,83	20,28	$C_{13}H_{17}F_4N_3O_5 \cdot 1/2 H_2O$	40,11	4,91	19,52

Соединение	УФ-спектр		КД-спектр		ИК-спектр
	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ϵ	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$[\theta] \cdot 10^{-3}$	
(IX)	240	9200	—	—	3200, 1725, 1690
(X)	264	9200	275	+8,58	3450, 3200, 1710 (ш)
(XI)	265	9100	274	+9,57	3470, 3230, 1750, 1690
(XII)	264	10700	270	+9,26	3380, 3200, 1725, 1660
(XIII)	264	8800	273	+6,08	3450, 3200, 1730, 1670
(XIV)	266	9200	274	-6,93	3500, 3200, 1715 (ш)
(XV)	266	8400	274	-6,93	3450, 3200, 1710 (ш)
(XVI)	265	9800	270	-8,26	3430, 3200, 1695, 1675
(XVIII)	274	6400	—	—	3400, 3220, 1665, 1610

Спектры ПМР синтезированных соединений (CD_3OD , 30°)

Соединение	Химический сдвиг, δ , м. д. (J , Гц)			
	1'-H ($J_{1', 2'}$)	Другие протоны углеводной части	6-H	Протоны фторалкильной или фторалкоксиметильной группы
(IX) *	6,35 **	3'-H 5,55; 4'-H, 5'-HH 4,43-4,75; 2'-HH, 2CH ₃ 2,35	7,56	CF ₂ H 5,85** ($J_{HF_{гем}}$ 53,0, $J_{HF_{виц}}$ 5,0); 5-CH ₂ 4,04, ОСН ₂ 3,68 ($J_{HF_{виц}}$ 12,6, $^4J_{HF}$ 1,6)
(X)	6,26 (6,5)	2'-HH 2,1-2,7 **, 3'-H 4,45; 4'-H 3,94; 5'-HH 3,80	7,95	**
(XI)	6,26 (6,5)	2'-HH 2,0-2,4; 3'-H 4,46; 4'-H 3,95; 5'-HH 3,80	8,05	2,5-3,4
(XII)	6,22 (6,6)	2'-HH 2,1-2,4; 4'-H 4,34; 5'-HH 3,60-4,1 **	8,09	5-CH ₂ 4,34; CH ₂ CF ₃ **
(XIII)	6,22 (6,5)	2'-HH 2,2-2,4; 3'-H, 4'-H, 5'-HH 3,6-5,1 **	8,06	CF ₂ H 6,12 ($J_{HF_{гем}}$ 53, $J_{HF_{виц}}$ 6,0); CH ₂ OCH ₂ **
(XIV)	6,20 (7,0; 3,0)	2'-H 2,08; 2''-H 2,4-2,8 **, 4'-H 4,36; 5'-HH 3,62	7,84	**
(XV)	6,20 (6,5; 2,0)	2'-H 2,08; 2''-H 2,4-3,4 **, 3'-H, 4'-H 4,34; 5'-HH 3,60	7,92	**
(XVI)	6,18 (7,2; 2,5)	2'-H 2,66; 2''-H 2,08 ($J_{2'3'}$ 6,0; $J_{2''3''}$ ~0; J_{HH} 15,0); 4'-H 4,2-4,54 **, 5'-HH 3,56	7,98	5-CH ₂ **; CH ₂ CF ₃ 3,92 (J_{HF} 12,0)
(XVIII)	6,21	2'-H 1,96-2,60; 4'-H, 5'-HH 3,5-4,12 **	8,16	CF ₃ H 6,13 ($J_{HF_{гем}}$ 53,0, $J_{HF_{виц}}$ 5,0) 5-CH ₂ 4,43; CH ₂ F**

* Спектр записан в CDCl₃.

** Сигналы перекрываются.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР записаны на приборе JNM-MH-100 (Япония), внутренний стандарт — тетраметилсилан. УФ-спектры получены на регистрирующем спектрофотометре Unicam SP-800 (Англия), толщина кюветы 1 см, растворитель — 96% спирт; ИК-спектры записаны на приборе UR-10 (ГДР) в таблетках с КВг. Измерения кругового дихроизма проведены на дихрографе Rousell-Jouan II (Франция) в 96% спирте, толщина кюветы 1 см. Для тонкослойной хроматографии использовали силуфол UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР), препаративную хроматографию проводили на стеклянных пластинках (20 × 20 см), применяя силикагель LSL₂₅₄ 5-40 мкм (Chemapol, ЧССР) при толщине слоя 1 мм и смеси растворителей: хлороформ-метанол, 10 : 1 (А); этилацетат — метанол, 9 : 1 (Б); хлороформ — метанол, 4 : 1 (В). Для выделения тимидинкиназы использовали крыс-самцов породы Вистар. На 5-й день после перевивки асцитной гепатомы Зайдела крыс забивали декапитацией. Селезенку извлекали, промывали холодным физиологическим раствором и измельчали, продавливая через металлическое сито. Тканевую массу в соотношении 100 мг/мл суспендировали в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащем 0,25 М сахарозу и 0,15 М КCl, и гомогенизировали в стеклянном гомо-

генизаторе Поттера. Гомогенат при охлаждении последовательно центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин для осаждения ядер, 15 мин при 15 000 об/мин для осаждения митохондрий и 2 ч при 105 000 г для отделения микросомальной фракции. Полученный цитозоль фракционировали насыщенным раствором сульфата аммония до 30% насыщения. Осадок белка центрифугировали 15 мин при 15 000 об/мин и суспендировали в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8,0, с 10^{-3} М меркаптоэтанолом. Полученную фракцию белка использовали для определения активности тимидинкиназы. Активность фермента определяли по превращению [^{14}C]тимидина в [^{14}C]ТМР с последующим разделением продуктов реакции на ДЕАЕ-целлюлозной бумаге. Реакционная среда содержала в объеме 0,5 мл: трис-НСl (рН 8,0) — 50, АТР — 5, MgCl_2 — 1,5, NaF — 15 мкмоль, [^{14}C]тимидин — 0,1 мкмоль (50 мКи/ммоль) и 200—300 мкг белка. Пробы инкубировали в ультратермостате при 37°. Реакцию останавливали, помещая пробы в водяную баню при 100° на 3 мин. После осаждения белка центрифугированием 0,01 мл инкубационной смеси наносили на диски (2×2 см) ионообменной бумаги DE-81. Дальнейшую обработку дисков и подсчет радиоактивности [^{14}C]ТМР проводили как описано для УМР [7]. Измерения включения [^3H]тимидина в ДНК клеток линии *CaOv* проводили с помощью сцинтилляционного счетчика фирмы Intertechnique (Франция).

1-(2'-дезоксигуанозил)-5-полифторалкил- и -5-полифторалкоксиметилурацилы (VI) — (IX). Смесь, состоящую из 6,2 ммоль 5-замещенного урацила (I) — (IV), 1,5 мг сульфата аммония и 4,5 мл гексаметилдисульфата, кипятили 14 ч. Избыток гексаметилдисульфата отгоняли в вакууме, остаток растворяли в 6 мл сухого дихлорэтана и прибавляли к суспензии 5,8 ммоль 2-дезоксигуанозил- α -D-рибофуранозилхлорида (V) и 1,72 ммоль SnCl_4 в 6 мл сухого дихлорэтана. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при 20°, затем промывали последовательно насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×5 мл) и водой. Растворитель отгоняли в вакууме, ацилированные дезоксирибозиды (VI) — (IX) выделяли препаративной ТСХ в системе А.

Аномерные 1-(2'-дезоксигуанозил)-5-полифторалкил- и -5-полифторалкоксиметилурацилы (X) — (XVI). Ацилированный дезоксирибозид (VI) — (IX) (1 ммоль) растворяли в 10 мл 1 н. метилата натрия в метаноле и перемешивали 1 ч при 20°. Реакционную смесь нейтрализовали дауэксом-50 (H^+) до рН 7 по универсальному индикатору, смолу отделяли, растворитель отгоняли в вакууме, к остатку прибавляли 20 мл воды, экстрагировали эфиром (2×10 мл). Водный раствор упаривали, остаток сушили в вакууме над P_2O_5 . Аномеры разделяли препаративной ТСХ в системе Б при двукратном пропускании растворителей через пластину.

1-(2'-дезоксигуанозил)- β -D-рибофуранозил)-4-тио-5-(2,2,3,3-тетрафторпропоксиметил)урацил (XVII). К раствору 0,5 г (0,82 ммоль) соединения (IX) в 20 мл сухого диоксиана прибавляли 0,3 г P_2S_5 и нагревали при кипении 45 мин, затем добавляли 0,2 г P_2S_5 и кипятили еще 45 мин. Реакционную смесь охлаждали, фильтровали и упаривали досуха. Остаток обрабатывали 10 мл воды (60°), экстрагировали хлороформом (3 \times 10 мл). Объединенные экстракты промывали последовательно 5% раствором NaHCO_3 и водой, упаривали досуха, остаток очищали препаративной ТСХ в системе А. Выход соединения (XVII) 0,2 г (39,2%), λ_{max} 330 нм.

1-(2'-дезоксигуанозил)-5-(2,2,3,3-тетрафторпропоксиметил)цитозин (XVIII). Раствор 0,43 г (0,69 ммоль) соединения (XVII) в 22 мл сухого метанола, насыщенного при 0° газообразным аммиаком, нагревали в стальной ампуле 17 ч при 100°. Реакционную смесь охлаждали, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме, остаток (0,26 г) хроматографировали на пластине с силикагелем в системе В. Выход соединения (XVIII) 0,08 г (30,8%).

Действие соединений (X)—(XVI), (XVIII) и 5-галлоид-2'-дезоксипуридинов на активность тимидинкиназы. [¹⁴C]тимидин добавляли в реакционную среду в концентрации полунасыщения фермента субстратом 0,1 мкМ, 5-галлоид-2'-дезоксипуридины — в концентрации 0,08—0,5 мкМ, т. е. примерно в равной или 5-кратной по отношению к субстрату. Концентрация соединений (X)—(XVI) и (XVIII) 5—10-кратная по отношению к субстрату. Методом отбора проб исследовали кинетику реакции по начальной скорости в течение 5, 10 и 15 мин инкубации. Константы ингибирования рассчитывали по концентрации, вызывающей 50% торможение реакции.

Изучение цитотоксического действия соединений (X)—(XVI), (XVIII) и 5-галлоид-2'-дезоксипуридинов в клеточной тест-системе. Критерием цитотоксического действия служило изменение уровня включения [³H]тимидина в ДНК клеток через 24 ч после внесения в культуры исследуемых соединений. Полученные результаты выражали в процентах от контроля. Путем пробит-анализа кривых зависимости эффекта от концентрации с учетом 95% доверительного интервала графически определяли величину СЕ₅₀.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герман Л. С., Полищук В. Р., Преображенская М. Н., Мельник С. Я., Кирще-ния Л. М. (1974) Химия гетероцикл. соед., 859—860.
2. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Преображенская М. Н., Платонова Г. Н., Лес-ная Н. А., Софьяна З. П. (1976) Ж. орган. химии, 12, 652—655.
3. Hoffer M. (1960) Chem. Ber., 93, 2477—2481.
4. Watanabe K. A., Chiu T. M., Hollenberg D. H., Fox J. J. (1974) J. Org. Chem., 39, 2482—2486.
5. Winkley M. W., Robins R. K. (1968) J. Org. Chem., 33, 2822—2827.
6. Townsend L. B. (1973) in: Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry (Zor- bach W. W., Tipson R. S., eds.), vol. 2, pp. 336—337, John Wiley and Sons, Inc., N. Y.
7. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Софьян А. В., Ворновпцкая Г. И., Дубив-на И. Г., Преображенская М. Н. (1976) Биоорган. химия, 2, 1520—1525.

Поступила в редакцию
3.VII.1978

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF 5-POLYFLUOROALKYL AND 5-POLYFLUOROALKOXYMETHYL-2'-DEOXYPYRIMIDINE NUCLEOSIDES

MELNIK S. Ya., BAKHMEDOVA A. A., VORNOVITSKAYA G. I., DOBRYNIN Ya. V.,
NIKOLAIEVA T. G., IVANOVA T. P., YARTSEVA I. V., PREOBRAZHENSAYA M. N.

Cancer Research Center, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Interaction of 2-deoxy-3,5-bis-(*p*-tolyl)- α -D-ribofuranosylchloride with trimethylsilyl derivatives of 5-substituted uracils and subsequent deacylation gave 2'-deoxyuridines containing 5-polyfluoroalkyl and 5-polyfluoroalkoxymethyl substituents. α - and β -anomers were separated by preparative TLC. Thionation and subsequent amination of 1-(2'-deoxy-3',5'-bis-O-*p*-tolyl- β -D-ribofuranosyl)-5-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxymethyl)uracil led to the corresponding cytosine₂ derivative. It was shown that compounds obtained did not affect the activity of thymidylate kinase from rat spleen as well as the DNA synthesis in *Cancer ovarian* cell culture.