

N_4 -аминокислотные производные 6-азацитидина: синтез и биологическая активность

И. В. Алексеева, Л. И. Пальчиковская, А. С. Шаламай, С. С. Тарнавский, Л. Н. Носач¹, В. Л. Жовноватая¹, Н. С. Дяченко¹

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 154

Исследованы варианты синтеза N_4 -аминозамещенных 6-азацитидинов в условиях упрощенного метода «сильной конденсации». Изучено противовирусное действие полученных соединений в отношении аденовируса человека серотипа 2 в культуре клеток Пер-2 и установлена их первичная специфическая активность. Обсуждена взаимосвязь между химической структурой новых производных 6-азацитидина и их биологическими свойствами.

Введение. 6-Азацитидин — представитель азапиримидиновых нуклеозидов, активный антиметаболит, обладающий широким спектром биологического действия [1—3, 5]. Однако молекулярный механизм его действия еще недостаточно детально изучен. Множественный характер возможных модификаций структуры 6-азацитидина позволяет получить ряд его производных, которые могут быть использованы как инструменты для выяснения некоторых аспектов его ингибирующего действия.

Наблюдаемые уникальные биологические эффекты 6-азацитидина, по-видимому, обусловлены особенностями электронного строения его агликона, а также конформацией молекулы нуклеозида в целом. Модификация триазинового агликона введением заместителей различного химического строения в N_3 -, C_5 -положения гетероцикла и/или N_4 -экзоаминогруппу, скорее всего, должна по-разному отразиться и на биологических свойствах новых соединений, что в какой-то мере позволит установить взаимозависимость структура — активность в ряду производных 6-азацитидина.

Ранее синтезирован ряд биологически активных N_4 -замещенных 6-азацитидинов, содержащих алкильные и арильные радикалы, фрагменты карбоновых кислот, их эфиров и амидов [4, 5]. Весьма

интересной является модификация N_4 -экзоаминогруппы остатками аминокислот (пептидов). Соединения этого типа, учитывая их строение, можно рассматривать и как нуклеозидсодержащие N -производные аминокислот. Следовательно, механизмы их биотрансформации в клетке, по-видимому, должны быть связаны с метаболизмом как нуклеозидов, так и аминокислот. В то же время можно ожидать, что и положение, и природа заместителя могут положительно сказаться на качественных и количественных показателях биологической активности нуклеозидного производного. На основании данных о биологических свойствах азапиримидин-нуклеозидов мы полагаем, что N_4 -замещенные 6-азацитидины, содержащие карбаматную функцию, могут быть интересны и как потенциальные фармакологические препараты.

В представляемой работе приведены варианты синтеза новых N_4 -производных 6-азацитидина, в основе которого лежит разработанный нами упрощенный метод нуклеозидной конденсации [6], а также результаты изучения антиаденовирусной активности синтезированных веществ.

Материалы и методы. В работе использовали 6-азаурацил («Биолар», Латвия), имидазол, метилимидазол («Sergva», Германия), пентасернистый фосфор («Fluka», Швейцария), набор аминокислот («Reanal», Венгрия), пара-аминобензойную кислоту («Рсахим», Украина). 4-Тео-6-азаурацил и 4-

метилтио-6-азаурацил синтезированы по методикам, описанным в работе [7]. 1-Ацетилтрибензоилрибозу, абсолютно сухие растворители готовили по стандартным методикам [8]. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках с силикагелем Kieselgel 60 F₂₅₄ («Merck», Германия) в системе н. бутанол — уксусная кислота — вода, 5:2:3 (А); хлороформ — метанол 9:1 (В); препаративную колоночную хроматографию (ПКХ) — на силикагеле L 40/100 той же фирмы в системе хлороформ — метанол с повышением концентрации метанола от 0 до 4 %. УФ спектры соединений записывали на приборе Specord UV-Vis (Германия), ¹H-ЯМР — на спектрометре «Hitachi UP 200» в DMSO-d₆, используя внутренний стандарт ТМС.

Синтезы N₄-замещенных 6-азацитозинон (IV а—е). В а р и а н т А. К суспензии 5 ммоль 4-метилтио-6-азаурацила в 10 мл Н₂O при энергичном размешивании добавляли 7,5 ммоль натриевой соли аминокислоты, приготовленной растворением эквивалентного количества соответствующей аминокислоты в 5 мл 1 н. раствора NaOH. Реакционную смесь выдерживали при температуре 40—50 °С в течение нескольких часов (контроль — ТСХ в системе А). Продукты реакции выделяли и очищали с помощью флеш-хроматографии и кристаллизации из подходящего растворителя. Физико-химические характеристики даны в табл. 1. Этерификацию соединений V а—е выполняли, как описано в [9].

В а р и а н т Б. Реакционную смесь, содержащую 10 ммоль 4-тио-6-азаурацила, 10 ммоль хлоргидрата эфира аминокислоты, 11 ммоль ТЭА, 12 ммоль метилимидазола в 50 мл ацетонитрила, кипятили с обратным холодильником в течение 1—2 ч. По окончании реакции растворитель удаляли в вакууме, остаток обрабатывали этанолом и выделенные продукты IV а—е кристаллизовали из спирта.

Синтезы N₄-замещенных 6-азацитидинон (VII а—f). К суспензии 4 ммоль оснований (IV а—е), суспендированных в 20 мл ацетонитрила, последовательно прибавляли по 3,6 ммоль гексаметилдисулазана и триметилхлорсилана, 4,8 ммоль тетраоксида олова. Образовавшийся гомогенный раствор объединяли с раствором 1-ацетил-2,3,5-трибензоилрибофуранозы (4 ммоль в 10 мл хлористого метилена) и нагревали с обратным холодильником на масляной бане в течение 6—8 ч (контроль — ТСХ, система В). Затем к реакционной смеси добавляли 2—3 мл этанола, выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре, растворители удаляли в вакууме. Дальнейшую обработку и выделение продуктов реакции выполняли с помощью ПКХ аналогично описанному методу [6]. Деацилирование полученных ацилнуклеозидов осуществляли, обрабатывая их метанольные рас-

творы аммиаком или метилатом натрия. Нуклеозидные производные VII а—е очищали кристаллизацией из водного этанола. Спектральные и другие физико-химические характеристики соединений VII а—е приведены в табл. 1 и 2.

Определение антиаденовирусной активности N₄-производных 6-азацитидинон. В работе использовали эталонный штамм аденовируса человека серотипа 2 и культуру клеток Нер-2. Антиаденовирусную активность определяли разработанным нами ранее цитоморфологическим методом, основанным на подсчете числа инфицированных клеток, содержащих вирусспецифические внутриядерные ДНК-содержащие включения. Вещества в разных концентрациях вносили в поддерживающую среду, в которой инкубировали инфицированные клетки после заражения аденовирусом. Условия проведения эксперимента такие же, как и при определении антиаденовирусной активности 6-азацитидина [2]. Минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) препарата считали ту, при которой он снижал число инфицированных клеток на 50 % по отношению к контролю. Максимально переносимую концентрацию (МПК) определяли цитоморфологическим методом. Химиотерапевтический индекс (ХТИ) препарата — это отношение МПК к МИК.

Результаты и обсуждение. N₄-замещенные 6-азацитидинон могут быть получены двумя путями, которые включают стадию гликозилирования азапиримидинового основания, содержащего аминокислотный остаток, либо гетероцикла, активированного по положению 4 тиогруппой, с последующим аминированием готового тионуклеозидом. От очередности проведения этих реакций зависит выход целевого продукта и трудоемкость синтеза в целом. Реакции гликозилирования N₄-замещенных 6-азацитозинон весьма мало изучены. В этой связи удачный подбор условий проведения «сильной конденсации» способствовал бы разработке нового препаративного метода синтеза ряда N₄-замещенных 6-азацитидинон. Известный путь химической трансформации ацилированных 6-азауридинон [5, 10] с применением промежуточного 4-хлорпроизводного имеет ряд сложностей и методических трудностей, особенно при работе с эфирами аминокислот и пептидов. Поэтому было решено в качестве основного пути избрать гликозилирование преимущественно полученных N₄-замещенных 6-азацитозинон. Синтезы этих соединений заключались в аминировании 4-тио-6-азаурацила (I) с применением N-метилимидазола как катализатора этого процесса либо с использованием более реакционноспособного 4-метилмеркаптопроизводного II (см. схему).

Аминирование соединения II натриевыми солями аминокислот протекает при повышенной темпе-

Таблица 1
Некоторые характеристики синтезированных соединений

Соединение	Температура плавления, °С	УФС в воде	
		λ _{max} , нм (ε), pH 7	λ _{max} , нм (ε), pH 10
IVa	238—240	276	292
Va	202—204	—	—
VIIa	108—110	271 (9200)	271 (9160)
VIIa'	117—120	269 (9000)	270 (8900)
IVb	> 250	274	290
Vb	230—232	—	—
VIIb	191—193	272 (7160)	270 (7200)
IVc	> 250	275	291
Vc	225—227	—	—
VIIc	115—117	272 (10500)	272 (10400)
IVd	> 300	277	284
Vd	198—199	—	—
VIIд	124—126	275 (9100)	274 (9050)
IVe	> 300	255, 326	329
Ve	283—285	—	—
VIIe	275—276	248, 320 (17000)	250, 320 (14500)
VIII	225—227	264 (8000)	265 (8080)

Таблица 2
¹H-ЯМР данные N₄-замещенных 6-азацитидина

Соединение	Протоны гетероцикла, δ, м. д.			Протоны углеводного кольца, δ, м. д. (J, Гц)			
	N ₄ -H	NH ₂ (амид)	C5-H	C1'-H	C2'-H	C3'-H	C5'-H
VIIa	8,65	7,52; 7,14	7,66	5,97 (3,9)	5,16	4,92	4,63
VIIb	8,74; 8,33	7,24; 7,04	7,68	5,97 (3,9)	5,16	4,92	4,63
VIIc	8,56	7,39; 6,86	7,51	5,97 (3,9)	5,17	4,95	4,65
VIIд	8,61	7,41; 6,93	7,34	5,98 (3,9)	5,2	4,99	4,68
VIIe	10,80	—	7,77	6,23 (3,9)	5,25	5,05	4,25
VIII	8,01; 7,89	—	7,52	6,01 (3,9)	5,15	4,89	4,60

ратуре (40—50 °С) и pH 8—9. Для дальнейшего использования аминокислотных производных IV а—е в реакции гликозилирования их превращали в соответствующие этиловые (V а, b) и метиловые V (с, d, e) эфиры.

Использовали еще один вариант аминоалкилирования 4-тио-азапиримидина эфирами аминокислот, состоящий в том, что процесс протекает в присутствии N-метилимидазола при 80 °С в безвод-

ном ацетонитриле и заканчивается образованием N₄-аминопроизводных V а—е. Каталитическая функция N₄-метилимидазола, вероятно, заключается в активации 4-тио-6-азаурацила с превращением его в соответствующее высокоактивное имидазольное производное (III), которое легко подвергается нуклеофильной атаке соответствующей аминокислотной компонентой. Наряду с этим N-метилимидазол как основание выполняет функцию агента,

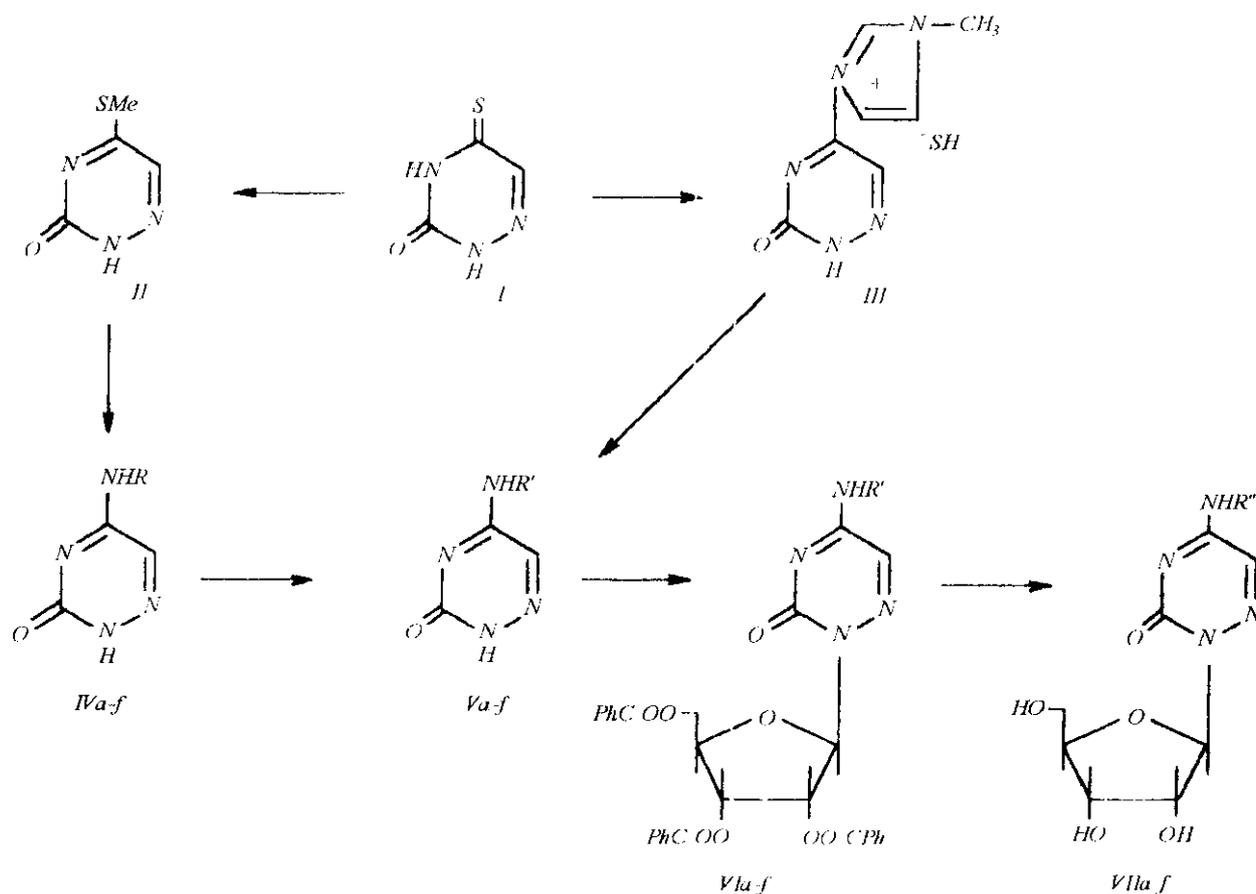
связывающего выделяющийся сероводород и тем самым обеспечивающего основной катализ процесса аминирования.

Гликозилирование N_4 -аминопроизводных 6-азацитозинов (V a—e) и 6-азацитозина осуществляли по модифицированной нами методике «силильной конденсации» [6]; продуктами реакции были исключительно N_4 -изомерные трибензоаты VI a—f. Триацил-азануклеозиды деацилировали насыщенным раствором аммиака или 0,1 н. метилатом натрия в метаноле. В первом случае были получе-

ны амидные производные VII a—d, во втором — N_4 -аминокислотные производные 6-азануклеозида со свободной карбоксильной группой (VII e, f).

Выделенные нуклеозиды по своим физико-химическим характеристикам были идентичны соединениям, полученным аминированием 4-хлорпроизводного трибензоилазапиримидиннуклеозида [10].

Строение синтезированных N_4 -замещенных 6-азацитидинов и особенностей их пространственной структуры изучали с помощью УФ и ПМР спектров. В сравнении с 6-азацитидином для УФ-макси-



IV: R = CH_2COOH (a); $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$ (b); $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ (c); $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (d); $\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$ (e); H (f);

V, VI: R' = $\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ (a); $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ (b); $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$ (c); $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ (d); $\text{C}_6\text{H}_4\text{COOCH}_3$ (e); H (f);

VII: R'' = CH_2CONH_2 (a); CH_2COOH (a'); $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$ (b); $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$ (c); $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ (d); $\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$ (e); H (f)

мумов поглощения соединений VII а—е в нейтральных растворах характерными являются батохромные смещения полос на 10—25 нм, связанные с электронным влиянием боковых заместителей и вызванные, по-видимому, поляризацией триазинового агликона наведенной внутримолекулярной водородной связью за счет взаимодействия амидной и карбоксильной группировок с гетероатомами цикла. Полосы УФ-поглощения соединений VII а—е в щелочной среде остаются неизменными ввиду отсутствия ионизации агликона при pH 10.

В соответствии со структурой 6-азацитидина в ПМР спектрах его N₄-производных VII а—е имеются характерные сигналы для аномального протона ($\delta \approx 6$ м. д., константа спин-спинового взаимодействия $J_{1,2} < 4$ Гц) и трех гидроксильных протонов рибозного фрагмента, присущие рибонуклеозидам с природной β -конфигурацией гликозидного центра (см. табл. 2). Электронное влияние экзоаминогруппы на положение протона у атома С-5 гетероцикла несколько ослаблено, что можно проследить по данным табл. 2. Химический сдвиг протона экзо-NH₂-группы подвержен дезэкранирующему влиянию N₄-заместителей, в случае арильного радикала в соединении VII е смещение протона в слабое поле выражено в наибольшей степени ($\delta > 2,5$ м. д.).

Изучение биологической активности производных 6-азацитидина включало определение их токсичности для культуры клеток и антиаденовирусного действия. В сравнении с 6-азацитидином его N₄-производные обладают меньшей токсичностью для культуры клеток Her-2 (табл. 3).

Исследование их антиаденовирусного действия показало, что в зависимости от строения заместителя по N₄-положению они проявляли разную степень активности (табл. 3). Не проявили антиаденовирусной активности N₂-замещенные 6-азацитиди-

на VII б и VII д, а также N₄-производные 6-азацитозина V а и V е при исследовании их в высокой концентрации (250 мкг/мл).

Низкую активность проявил VII е, его ХТИ, равный 1, позволяет рассматривать это соединение как неактивное в соответствии с рекомендациями [12]. Соединения, ХТИ которых в культуре клеток равно 4, считаются активными, а 16 и выше — перспективными для проведения дальнейших испытаний. Среди исследованных нами N₄-производных 6-азацитидина активными в отношении аденовирусов можно считать соединения VII а, VII а' и VII с, имеющие ХТИ соответственно 125, 8, 4. Как видно из представленных результатов, наибольшую антиаденовирусную активность проявил N₄-карбамоилметил-6-азацитидин (VII а), ингибирующий репродукцию аденовируса в культуре клеток хотя и в более высокой концентрации, чем 6-азацитидин (VII ф), но благодаря меньшей токсичности имеющий такой же ХТИ. Особенностью N₄-аминокислотных производных VII а, VII а', VII с является лучшая в сравнении с 6-азацитидином растворимость в физиологических средах. Это преимущество становится особенно ценным при относительно равной степени биологической активности 6-азацитидина и соединения VII а.

Проведенное нами испытание новых соединений в культуре клеток позволило не только обнаружить их первичную специфическую активность, но и выявить взаимосвязь между химической структурой соединения и его антиаденовирусной активностью в данном ряду соединений.

Наблюдаемая разница в активности соединений VII а—е связана с особенностями строения N₄-заместителя. Следует отметить, что структура остатка природной аминокислоты (глицина, α -аланина), в котором карбонильная группа максималь-

Таблица 3
Антиаденовирусная активность синтезированных соединений

Соединение	Активный остаток	МПК, мкг/мл	МНК, мкг/мл	ХТИ
VIIa	Амид глицина	> 1000	8	125
VIIa'	Глицин	1000	125	8
VIIb	Амид глицилглицина	> 1000	Отсутствует	—
VIIc	Амид α -аланина	> 1000	250	4
VIIe	Амид β -аланина	> 125	Отсутствует	—
VIIe	<i>n</i> -Аминобезойная кислота	> 250	250	> 1
VIIg*	—	125	1	125

но приближена к аминогруппе, имеет, по-видимому, важное значение для сохранения антивирусной активности 6-азануклеозида. У соединений VII d, e, N₄-заместитель которых представлен остатком неприродной аминокислоты (β -аланина, *n*-аминобензойной кислоты), где амино- и карбонильная группы разнесены в боковой цепи на одно и более метиленовых звеньев, активность ключевого 6-азацитидина не сохраняется.

При наличии в экзоциклическом заместителе карбомильной или карбоксильной группы возможной становится реализация псевдоциклических структур вследствие наведения внутримолекулярных водородных связей между N₃- или N₆-атомами гетероцикла и функциональными группами заместителя. Факт образования таких структур в ряде случаев подтвержден полученными нами ПМР-спектрами азапиримидиннуклеозидов. Указанные пространственные перестройки могут повлиять на конформацию молекулы 6-азануклеозида в целом и вызвать существенные изменения в их биологических свойствах. Таким образом, в антиаденовирусовом действии N₄-производных 6-азацитидина, по нашему предположению, важным является сохранение конформации и электронного строения агликона ключевой молекулы.

I. V. Алексеева, Л. Г. Пальчиковська, А. С. Шаламай, С. С. Тарнавський, Л. М. Носач, В. Л. Жовновата, Н. С. Дяченко

N₄-амінокіслотні похідні 6-азацитидину: синтез та біологічна активність

Резюме

Досліджено варіанти синтезу N₄-амінозаміщених 6-азацитидинів в умовах спрощеного методу «силільної конденсації». Вивчено противірусну дію одержаних сполук по відношенню до аденовірусу людини (серотипу 2) у культурі клітин Hep-2. Встановлено їх первинну специфічну активність, а також розглянуто взаємозв'язок між хімічною структурою похідних 6-азацитидину та їх біологічними властивостями.

I. V. Alexeeva, L. G. Palchikovskaya, A. S. Shalamay, S. S. Tarnavsky, L. M. Nosach, V. L. Zhovnovataya, N. S. Dyachenko

N₄-derivatives of 6-azacytidine: synthesis and biological activity

Summary

Different methods of the synthesis of N₄-derivatives of 6-azacytidine in conditions of simplified «sililic condensation» methods were

investigated. Their antiviral activity with respect to the serotype 2 adenovirus in the culture of Hep-2 cells was studied. Primary specific activity of the compounds obtained was defined. Correlation between chemical structure of the new 6-azacytidine derivatives and its biological properties is discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Бутенко С. И. и др. Влияние 6-азацитидина на экспрессию аденовирусного генома // Новые подходы к химиотерапии вирусных инфекций.—Рига: Зинатне, 1991.—С. 87—93.
2. Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Шаламай А. С. и др. Антиаденовирусное и иммуностимулирующее действие 6-азацитидина // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 1.—С. 75—85.
3. Петруша Н. А. Токсикофармакологические свойства 6-азацитидина // Фармакология и токсикология.—1987.—№ 2.—С. 75—76.
4. Левенко Б. А., Семенов Д. В., Кунах В. А. и др. Изучение влияния производных 6-азацитидинов на рост изолированных тканей растений // Эксперим. генетика растений.—Киев: Наук. думка, 1982.—116 с.
5. Чернецький В. П. Синтез антиметаболітів нуклеїнового обміну та їх використання в хіміотерапії молекулярних хвороб // Вісник АН УРСР.—1971.—№ 8.—С. 30—41.
6. Алексеева И. В., Пальчиковская Л. И., Шаламай А. С. и др. Синтез и биологическая активность N₄-замещенных 6-азацитозинов // Хим.-фарм. журн.—1994.—№ 4.—С. 16—18.
7. Cristescu C., Sitaru S. As-triazine derivatives with potential therapeutic action. XI. Thionation of 6-methylthio-as-triazine-3,5 (2H, 4H)-dione // Revue Roumaine Chimie.—1971.—16, N 1.—P. 135—141.
8. Гордон А., Форд Р. Спутник химика.—М.: Мир, 1976.—541 с.
9. Огняник С. С., Тарнавский С. С., Сикора Л. И., Алексеева И. В. Синтез и спектроскопические исследования 3-тио-6-алкиламинозамещенных 1,2,4-триазинов-5 // Укр. хим. журн.—1988.—54, № 11.—С. 1197—1199.
10. Zemlicka J., Sorm F. Nucleic acids components and their analogues LXI. The reaction of dimethylchloromethyleneammonium chloride with the 2,3,5-tri-O-acyl derivatives of uridine and 6-azauridines. A new synthesis of 6-azacytidine // Coll. Czech. Chem. Commun.—1965.—30, N 10.—P. 2052—2067.
11. Носач Л. Н., Дяченко Н. С. Цитопатология аденовирусной инфекции.—Киев: Наук. думка, 1982.—124 с.
12. Галегов В. А., Пушкарекая Н. А., Леонтьева Н. А. и др. Программа экспериментального химиотерапевтического изучения антивирусных (антигриппозных) препаратов и критерии их поэтапной оценки // Вопр. вирусологии.—1976.—№ 4.—С. 503—507.

УДК 547.963.32+578.826:615.281.8
Поступила в редакцию 10.02.97