



УДК 547.963.32.057 : 577.123.383

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ 1- β -D-РИБОФУРАНОЗИЛ-4-МЕТИЛ-
МЕРКАПТОПИРАЗОЛО(3,4-d)ПИРИМИДИНА
И ЕГО 5'-МОНОФОСФАТА

*Корбук И. А., Горюнова О. В., Стукалов Ю. В.,
Иванова Т. П., Добрынин Я. В., Преображенская М. Н.*

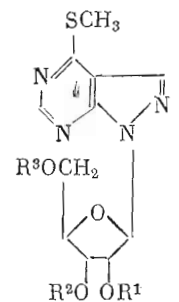
*Всесоюзный онкологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва*

1- β -D-Рибофуранозил-4-метилмеркаптопирозоло(3,4-d)пиримидин (I) превращен в 5'-монофосфат (II) действием хлорокиси фосфора в триалкилфосфатах или взаимодействием 2',3'-O-этоксиметилиденового производного рибозидов (I) с 2-цианэтилфосфатом в присутствии DCC с последующим удалением защитных групп. Конденсацией имидазолида монофосфата (III) с три-*n*-бутиламмониевой солью пирофосфорной кислоты синтезирован соответствующий 5'-трифосфат. С помощью ВЭЖХ контролировали содержание природных NTP и фосфатов рибозидов (I) в опухолевых клетках после введения соединений (I), (III) или 4-метилмеркаптопирозоло(3,4-d)пиримидина (II) мышам с лейкозом L1210 или после инкубации этих соединений с культурой клеток СаОv. При введении нуклеозидов (I) и нуклеотидов (III), обладающих противолейкозным и цитотоксическим действием, внутриклеточное содержание фосфата (III) было значительно выше, чем при введении биологически неактивного основания (II). Нуклеозид (I) и нуклеотид (III) уменьшают содержание АТР и GTP в клетках СаОv на 60–70%, а основание (II) не влияет на пул NTP. Биоактивация рибозидов (I) превращением в фосфат (III) протекает путем прямого фосфорилирования аденозинкиназой (КФ 2.7.1.20); в этих условиях превращения основания (II) в соединения (I) и (III) не происходит.

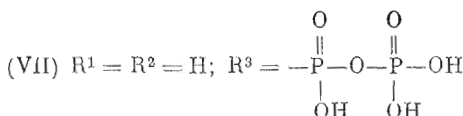
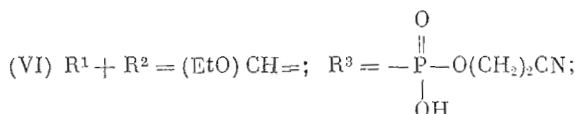
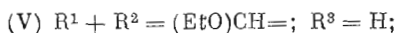
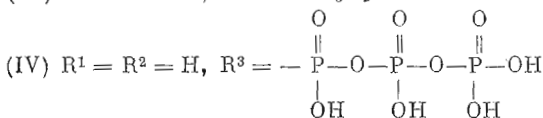
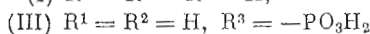
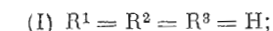
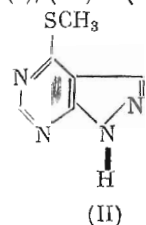
Используемые в химиотерапии злокачественных новообразований аналоги нуклеиновых оснований и нуклеозидов (например, 6-меркаптопурин, 5-фторурацил, 1- β -D-арабинофуранозилцитозин) проявляют биологическую активность только после внутриклеточного превращения в нуклеотиды. Ферментативное образование монофосфатов нуклеозидов осуществляется двумя основными путями: фосфорилированием нуклеозидов киназами или фосфорибозилированием оснований фосфорибозилтрансферазами. Последующий метаболизм монофосфатов состоит в их фосфорилировании до ди- и трифосфатов. Модифицированные нуклеотиды, образуясь в клетке и воздействуя на синтез или функционирование нуклеиновых кислот, ответственны за проявление противоопухолевого действия [1]. Ранее в нашей лаборатории был синтезирован структурный аналог аденозина — 1- β -D-рибофуранозил-4-метилмеркаптопирозоло(3,4-d)пиримидин [2–4]. Рибозид (I) обладает противоопухолевой активностью: увеличивает продолжительность жизни мышей с лейкозом L 1210 на 40–60%, в то время как соответствующее гетероциклическое основание — 4-метилмеркаптопирозоло(3,4-d)пиримидин (II) — неактивно в эксперименте на животных.

В настоящей работе осуществлено сравнительное изучение биотрансформации в нуклеотиды соединений (I) и (II) в опухолевых клетках при введении этих соединений мышам с лейкозом L 1210 и в культуру клеток карциномы яичника человека СаОv. С этой целью мы синтезировали 5'-монофосфат (III) и 5'-трифосфат (IV) рибозидов (I). Фосфат (III) представлял интерес не только как свидетель для изучения биотрансформации, но и как растворимое в воде производное рибозидов (I). Оказалось, что он действительно обладает противоопухолевым действием, сходным с действием рибозидов (I): увеличивает продолжительность жизни мышей

с лейкозом L 1210 на 30%. Поэтому мы также определяли содержание фосфорилированных производных рибозида (I) в опухолевых клетках мышей с лейкозом L 1210, которым вводился фосфат (III).



(I), (III) — (VII)



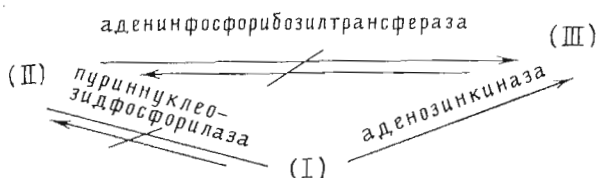
Фосфат (III) синтезирован взаимодействием 2',3'-O-этоксиметилденового производного (V) с 2-цианэтилфосфатом (способ А) или фосфорилированием незащищенного рибозида (I) хлорокисью фосфора в триметил- или триэтилфосфате (способы Б и В). Этоксиметилденовую защиту в рибозид (I) вводили кислотокатализируемым взаимодействием с этилортоформиатом [5]. Конденсацию полученной смеси диастереомеров (V) с 2-цианэтилфосфатом проводили стандартным методом [6] в присутствии DCC в пиридине. Образующийся защищенный фосфат (VI) очищали анионообменной хроматографией и после удаления защитных групп выделили аммониевую соль фосфата (III) с выходом 56%. В ПМР-спектре этого фосфата при сравнении с рибозидом (I) наблюдается усложнение сигналов 5'-протонов, что свидетельствует о присоединении фосфатной группы по первичному гидроксилу рибозного остатка. УФ-спектр фосфата (III) идентичен в области 230–325 нм УФ-спектру рибозида (I). Фосфорилирование рибозида (I) (способ Б) по методу Йошикавы [7, 8] осуществляли в триметилфосфате при действии эквимольного количества воды и более чем трехкратного избытка хлорокиси фосфора в течение 40 мин. В этих условиях выход фосфата (III) составил 54%. Увеличение продолжительности реакции до 2 ч вызывало уменьшение выхода и образование побочных продуктов, которые, по данным УФ- и ПМР-спектроскопии, не содержали меркаптогруппы. Наиболее эффективным оказалось фосфорилирование рибозида (I) в триэтилфосфате в условиях, описанных в работе [9] для получения 5'-фосфата 9-β-D-рибофуранозил-6-метилмеркаптопурина, — небольшим избытком хлорокиси фосфора без добавления воды (выход 90%).

Для синтеза трифосфата (IV) фосфат (III) реакцией с карбонилдиимидазолом превращали по известной методике [10] в имидазолид и затем конденсировали с три-*n*-бутиламмониевой солью пирофосфорной кислоты. Хроматографией на DEAE-целлюлозе с выходом 30% выделили трифосфат (IV) в виде аммониевой соли, а также продукт (VII), время удерживания которого в условиях аналитической ТСХ и при анионообменной ВЭЖХ представляло величину, среднюю между временами удерживания для трифосфата (IV) и фосфата (III). Продукт (VII) образовывался наряду с фосфатом (III) и при хранении образцов трифосфата (IV) свыше 2 мес при $-20^\circ C$. На основании этих данных соединение (VII) идентифицировано как 5'-дифосфат рибозида (I). Образование его при

получении трифосфата (IV) обусловлено примесью ортофосфата в солях пирофосфорной кислоты. Величины времен удерживания синтезированных фосфатов (III), (VII) и (IV), по данным ТСХ и анионообменной ВЭЖХ, падалились в области времен удерживания для моно-, ди- и трифосфатов рибозидов пуринов соответственно.

Фосфаты (III), (IV), (VII) и нуклеозид (I) были использованы в качестве стандартов при анализе кислоторастворимой фракции лейкозных клеток мышей после введения им препаратов (I)–(III). Содержание моно-, ди- и трифосфата рибозида (I) определяли методом анионообменной ВЭЖХ при элюировании калий-фосфатным буфером, состав которого подбирали таким образом, чтобы обеспечивалось полное разделение соединений (I), (III), (VII) и (IV). Детектирование проводили при 313 нм для устранения фона природных нуклеотидов. В предварительных опытах для изучения динамики изменения содержания нуклеотидных производных лейкозные асцитные клетки отбирали через 1, 2, 5 и 24 ч после введения мышам рибозида (I). Как в этих опытах, так и во всех последующих экспериментах кислоторастворимая фракция опухолевых клеток содержала только фосфат (III). Трифосфат (IV) или дифосфат (VII) практически не обнаруживались. Поэтому в дальнейшем о биотрансформации вводимых препаратов судили по содержанию монофосфата (III). Поскольку наибольшая концентрация фосфата (III) в клетках наблюдалась через 2 ч после введения рибозида (I), сравнительное изучение метаболизма соединений (I)–(III) проводили также через 2 ч после их введения. При введении экспериментальным животным соединений (I) или (III), которые обладают противолейкозным действием, содержание фосфата (III) в кислоторастворимой фракции опухолевых клеток составило 523 ± 161 и 1009 ± 302 пмоль/ 10^6 клеток соответственно. При введении не обладающего противолейкозной активностью основания (II) фосфат (III) не обнаружен. Не обнаруживался он и через 5 и 24 ч после введения соединения (II). Таким образом, можно сделать вывод, что противоопухолевое действие соединений (I) и (III) на лейкоз L 1210 коррелирует с появлением в клетках этой опухоли фосфата (III).

Превращение рибозида (I) в его активный метаболит — фосфат (III) — осуществляется, по-видимому, под действием фермента аденозинкиназы (КФ 2.7.1.20), поскольку показано, что рибозид (I) является субстратом для аденозинкиназы из печени кролика [11]. Превращения основания (I) в фосфат (III), которое могло бы происходить, например, под действием аденинфосфорилрибозилтрансферазы (КФ 2.4.2.7), не наблюдается. Это исключает путь превращения рибозида (I) в его фосфат (III) через промежуточное расщепление рибозида (I) до основания (II) под действием пурииннуклеозидфосфорилазы (КФ 2.4.2.1). Не идет также синтез рибозида (I) из основания (II). При введении экспериментальным животным фосфата (III) он обнаруживается в клетках, что может быть результатом его проникновения через мембраны клеток опухоли или результатом предварительного расщепления экзогенного фосфата (III) под действием фермента 5'-эктонуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) до рибозида (I) с последующим фосфорилированием в клетке. Нельзя также исключить возможность прямого проникновения нуклеотида в клетку, что было ранее показано на примере 5'-монофосфата 1- β -D-рибофуранозил-4-аминопиразоло(3,4-d)-пиримидина [12].



Пути биотрансформации соединений (I) — (III) в опухолевых клетках

**Влияние соединений (I)–(III) на содержание NTP
в кислоторастворимой фракции клеток СаОv**

Соединение	Ингибирование, %		
	УТР	АТР	ГТР
(I)	40	64	63
(II)	Не определяли	2	5
(III)	41	77	70

Установленные нами пути биотрансформации соединений (I)–(III) представлены на схеме. Несмотря на присутствие в клетках заметных количеств фосфата (III), нам не удалось показать наличие в них дифосфата (VII) или трифосфата (IV). По-видимому, монофосфат (III) — плохой субстрат для нуклеотидкиназ, которые могли бы осуществлять его превращение в ди- и трифосфат. Аналогично 5'-монофосфат 9- β -D-рибофуранозил-6-метилмеркаптопурина преобладает среди нуклеотидных метаболитов 6-меркаптопурина в опухолевых клетках, и только в эритроцитах человека обнаруживаются соответствующие ди- и трифосфаты [13].

Представлялось интересным выяснить, сходны ли особенности биотрансформации соединений (I)–(III), установленные нами в опытах на животных, с особенностями метаболизма этих соединений в культуре клеток СаОv. Мы оценили цитотоксичность соединений (I)–(III) для этих клеток, определили содержание в них фосфата (III) после инкубации с рибозидом (I) и основанием (II) и охарактеризовали изменения содержания природных NTP под действием соединений (I)–(III). Степень цитотоксичности оценивали по величине CE_{50} (концентрация препарата, ингибирующая на 50% включение [3H]тимидина в ДНК) [14]. В то время как основание (II) не обладало цитотоксической активностью, для рибозида (I) и монофосфата (III) величины CE_{50} составили $1,7 \cdot 10^{-5}$ и $2,7 \cdot 10^{-5}$ М соответственно. Таким образом, цитотоксичность соединений (I)–(III) коррелирует с их активностью по отношению к лейкозу L 1210 мышей. Содержание фосфата (III) в кислоторастворимой фракции клеток СаОv после их инкубации в течение 2 ч с $6,7 \cdot 10^{-6}$ М рибозидом (I) или основанием (II) анализировали методом ВЭЖХ. В клетках, инкубированных с рибозидом (I), количество фосфата (III) составляло 188 ± 22 пмоль/ 10^6 клеток, а в клетках, инкубированных с основанием (II), — на порядок ниже: $16,8 \pm 2$ пмоль/ 10^6 клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что цитотоксичность соединений (I) и (II) и их противоопухолевая активность коррелируют со степенью превращения этих соединений в фосфат (III).

По влиянию антиметаболитов нуклеинового обмена на содержание природных NTP в клетках можно судить как об их биологической активности, так и о молекулярных механизмах действия. Не обладающее цитотоксической или противолейкозной активностью основание (II) не вызывало изменения содержания NTP (таблица), а активные рибозид (I) и фосфат (III) уменьшали уровень АТР, ГТР и в меньшей степени УТР. Ранее нами было показано, что сходное влияние на клетки СаОv оказывает 6-меркаптопурин [15]. Можно предполагать, что, как и в случае 6-меркаптопурина, мишенями внутриклеточного действия фосфата (III) являются ферменты биосинтеза пуринов.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР регистрировали на спектрометре Bruker (ФРГ) с рабочей частотой 360 МГц, в качестве внутреннего стандарта в D_2O использовали воду (δ 4,80 м. д.). Сигналы протонов рибозного остатка относили с помощью двойного резонанса. Обозначения сигналов: с — синглет, д — дублет, дд — дублет дублетов, м — мультиплет. УФ-спектры снимали в воде на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР). Для фосфатов (III), (IV)

п (VII) принимали ту же величину ϵ , что и для исходного рибозид (I).

Ионообменную хроматографию на колонке с DEAE-целлюлозой DE-52 (Whatman, Англия) проводили в аммоний-бикарбонатном буфере, контролируя поглощение элюата при 260 нм с помощью детектора РЭППС (ЦКБ АМН СССР). Препаративную адсорбционную хроматографию на смеси силикагелей LL 5/40 и L 40/100 (ЧССР) (2 : 1 по весу) проводили на пластинках (20×20 см) с толщиной слоя 1 мм в системе хлороформ — этанол, 95 : 5 (А), аналитическую ТСХ — на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧССР) в системе А или в смеси Pr⁺OH — конц. NH₃ — вода, 7 : 1 : 2 (Б).

ВЭЖХ осуществляли на хроматографе 1084 В (Hewlett-Packard, США), снабженном детектором с переменной длиной волны. Детектирование проводили при длине волны 254 или 313 нм. Использовали предколонку (50×4,6 мм), упакованную сорбентом Perisorb RP18 (Merck) с размером частиц 30—40 мкм, и колонки (250×4 мм) с сорбентами PG-DEAE (Serva), Lichrosorb NH₂ (Merck) и Partisil SAX (Whatman) с размером частиц 10 мкм. В качестве подвижной фазы применяли 0,5 М КН₂РО₄ (для колонки PG-DEAE), 0,375 М КН₂РО₄ (Lichrosorb NH₂) и 0,025 М КН₂РО₄ (Partisil SAX). Скорость потока 2 мл/мин, объем пробы для биологических образцов 100 мкл, для синтетических образцов — 10 мкл. Количество фосфата (III) в биологических образцах определяли методом абсолютной калибровки, рассчитывали среднее значение и доверительный интервал при вероятности P 0,95; содержание фосфата (III) в стандартном образце устанавливали спектрофотометрически.

5'-Монофосфат 1-β-D-рибофуранозил-4-метилмеркаптопиразоло(3,4-д-пириимидина) (III). А. Рибозид (I) превращали в этоксиметилденеовое производное (V) по методике [5] с выходом 70%. Вещество получено в виде смеси диастереомеров в соотношении 2 : 1 (по данным ПМР-спектра), R_f 0,42 (А). ПМР-спектр (CDCl₃, δ , м.д.): 8,73 и 8,10 (1H, с, 3-H; 1H, с, 5-H), 6,81 (0,33H, д, $J_{1',2'}$ 3,1 Гц, 1'-H), 6,57 (0,66H, д, $J_{1',2'}$ 3,7 Гц, 1'-H), 6,12 (0,66H, с, >CH—OC₂H₅), 6,04 (0,33H, с, >CH—OC₂H₅), 5,33 (0,66H, дд, $J_{2',3'}$ 5,4 Гц, 2'-H), 5,22 (0,33H, дд, $J_{2',3'}$ 6,6 Гц, 2'-H), 5,20 (0,66H, дд, $J_{3',4'}$ 2,3 Гц, 3'-H), 5,15 (0,33H, дд, $J_{3',4'}$ 2,1 Гц, 3'-H), 4,63 (0,33H, м, 4'-H), 4,53 (0,66H, м, 4'-H), 3,96—3,58 (4H, м, 5'a-H, 5'b-H, —O—CH₂—CH₃), 2,72 (3H, с, SCH₃), 1,44—1,22 (3H, м, —O—CH₂—CH₃). К раствору 60 мг (0,17 ммоль) смеси диастереомеров (V) в 5 мл пиридина добавляли раствор 0,68 ммоль пиридиниевой соли 2-цианэтилфосфата в 0,6 мл пиридина и 570 мг (2,7 ммоль) DCC, встряхивали до полного растворения реагентов, через 63 ч при 20° С прибавляли 1 мл воды, перемешивали 4,5 ч, образовавшуюся суспензию экстрагировали гексаном (3×7 мл), органические слои промывали 10 мл воды, водные слои объединяли и отфильтровывали от осадка N,N'-дициклогексилмочевины, фильтрат наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 30 мл). Колонку промывали 70 мл воды и затем 160 мл 0,1 М NH₄HCO₃ до исчезновения поглощения элюата в УФ-свете, фракции 150—240 мл упаривали досуха, вновь упаривали с водой (5×20 мл), получали 0,11 ммоль защищенного нуклеотида (VI), R_f 0,65 (Б), УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 226, 293, 300 (плечо) нм. Соединение (VI) растворяли в 3,6 мл 1 н. NaOH, через 7 мин наносили на колонку с дауксом 50W×4 (H⁺, 7 мл) и промывали колонку водой, отбирая кислую фракцию, поглощающую в УФ-свете, нейтрализовали ее NH₄OH, упаривали досуха в вакууме при температуре не выше 40° С, снова упаривали с водой (5×20 мл), остаток растворяли в 20 мл воды, добавляли несколько капель NH₄OH и после лиофилизации получали 33 мг (0,11 ммоль) фосфата (III). Выход 45% в расчете на рибозид (I), $R_{\text{АМР}}$ 1,1 (Б). Найдено, %: С 30,05, Н 6,33. C₁₁H₁₅N₅O₇PS·2NH₃. Вычислено, %: С 29,37 Н 6,33. УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ (ϵ) 226 (11 000), 293 (17 300), 300 (плечо) нм. ПМР (D₂O, δ , м.д.): 8,68 и 8,41 (1H, с, 3-H; 1H, с, 5-H), 6,41 (1H, д, $J_{1',2'}$ 5,5 Гц, 1'-H), 4,97 (1H, дд, $J_{2',3'}$ 4,8 Гц, 2'-H), 4,59 (1H, дд, $J_{3',4'}$ 4,7 Гц, 3'-H), 4,34 (1H, м, $J_{4',5'}$ 8,9 Гц, 4'-H), 4,57—4,01 (2H, м, 5'a-H, 5'b-H), 2,75 (3H, с, SCH₃). ВЭЖХ, время удерживания, мин (сорбент): 5,12 (PG-DEAE), 4,63 (Lichrosorb NH₂), 10,89 (Partisil SAX); для AMP и GMP 4 мин (PG-DEAE).

В. К суспензии 90 мг (0,3 ммоль) рибозида (I) в 1,8 мл триметилфосфата добавляли 80 мкл (1 ммоль) POCl_3 и 5,4 мкл (0,3 ммоль) воды, перемешивали 45 мин при 4°C , экстрагировали 3 мл эфира, водный слой доводили NH_4OH до pH 4–5, разбавляли водой до объема 5 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 85 мл), которую промывали последовательно 180 мл воды и 350 мл 0,1 М NH_4HCO_3 . Фракцию 245–460 мл упаривали досуха, снова упаривали с водой (5×20 мл) и после лиофилизации получали 47,3 мг (0,16 ммоль, 54%) диаммониевой соли фосфата (III). Из фракции 65–130 мл выделяли 22% исходного рибозида (I).

В. Растворили 60 мг (0,2 ммоль) рибозида (I) в 0,5 мл триэтилфосфата при 100°C , охлаждали до 0°C и при перемешивании добавляли 22 мкл (0,25 ммоль) POCl_3 , через 2,5 ч при 4°C добавляли 0,3 мл воды и перемешивали 1 ч при 4°C , экстрагировали 2 мл эфира, водный слой доводили NH_4OH до pH 4–5, разбавляли водой до объема 5 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 220 мл), которую промывали последовательно 200 мл 0,01 М и 810 мл 0,1 М NH_4HCO_3 . Фракцию 700–1000 мл упаривали досуха при 40°C , снова упаривали с водой (5×20 мл) и после лиофилизации выделяли 54 мг (0,18 ммоль, 90%) диаммониевой соли фосфата (III). По данным ТСХ (Б), ВЭЖХ, спектров УФ и ПМР, вещества, полученные способами А, Б и В, оказались идентичными.

5'-Трифосфат 1- β -D-рибофуранозил-4-метилмеркаптопиразоло(3,4-d)-пириимидина (IV). К раствору 0,1 ммоль диаммониевой соли (III) в 2 мл воды добавляли 0,03 мл три-*n*-бутиламина, упаривали досуха и снова упаривали с безводным DMF, к остатку прибавляли 48,6 мг (0,3 ммоль) N,N'-карбонилдимидазола, перемешивали 3 ч (здесь и далее при 20°C), добавляли 1,4 мл 1 М MeOH/DMF, перемешивали 20 мин, приливали раствор 0,5 ммоль тетра-три-*n*-бутиламмониевой соли пиродифосфорной кислоты в 2,5 мл безводного DMF и перемешивали 2 сут. Осадок отфильтровывали, промывали 8 мл DMF, к фильтрату добавляли 7 мл спирта, упаривали досуха, остаток растворяли в 100 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 1 л), которую промывали 1 л воды и затем линейным градиентом NH_4HCO_3 (0–0,4 М, 9 л). Из фракции, вымываемой 0,21–0,23 М NH_4HCO_3 , упариванием и лиофилизацией выделяли 22 мг (0,03 ммоль, 30%) аммониевой соли трифосфата (IV), $R_{\text{АТР}}$ 1,33 (Б). УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 225, 293, 300 (плечо) нм. ВЭЖХ, время удерживания (PG-DEAE) 18,61 мин (ср. для АТР 10,5 мин, GTP 14,1 мин). Из фракции, вымываемой 0,19–0,21 М NH_4HCO_3 , выделяли 12,5 мкмоль смеси, в которой наряду с трифосфатом (IV) содержался 5'-дифосфат (VII), $R_{\text{АДР}}$ 1,2 (Б), ВЭЖХ, время удерживания (PG-DEAE): 9,63 мин (ср. для АДР 5,91 мин, GDP 8,45 мин).

Получение кислоторастворимой фракции клеток L-1210. Мышам линии BDF₁ (два опыта по 5 мышей на каждый препарат) вводили 10^6 клеток лейкоза L-1210, испытание препаратов проводили на 6-е сут после прививки. Соединения (I) или (II) растворяли в диметилсульфоксиде, затем разбавляли 9 объемами физиологического раствора, фосфат (III) растворяли в физиологическом растворе; концентрация препаратов 10 мг/мл. Животным вводили дозу 100 мг/кг. Через 1, 2, 5 и 24 ч животных забивали и отбирали от каждой мыши по 1 мл асцитной жидкости, содержащей опухолевые клетки. Клетки после освобождения от эритроцитов дважды обрабатывали 0,5 мл 0,5 н. HClO₄ (15 мин при 0°C) при перемешивании и нейтрализовали 3 н. KOH. Соль отделяли центрифугированием, измеряли объем надосадочной жидкости, фильтровали через фильтр GS (Millipore, США) с размером пор 0,45 мкм и методом ВЭЖХ определяли содержание фосфата (III), которое выражали в пмоль/ 10^6 клеток. Количество клеток подсчитывали на счетчике Coulter-Counter (ZBI, Франция).

Определение содержания природных рибонуклеозидтрифосфатов в кислоторастворимой фракции клеток CaOv. Действие препаратов в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М на содержание природных НТР оценивали через 24 ч после их добавления в культуру клеток. Использовали методику, описанную в работе [15]. В каждом опыте три образца с культурами клеток инкубиро-

вали с одним из препаратов; вычисляли среднее для трех опытов значение процента ингибирования содержания НТР по сравнению с контролем.

Авторы выражают благодарность С. Н. Михайлову (Институт молекулярной биологии АН СССР) за помощь и консультации при проведении синтетической части исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Преображенская М. Н., Мельник С. Я. Аналоги компонентов нуклеиновых кислот — ингибиторы нуклеинового обмена. «Биоорганическая химия» (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР). Т. 1. М., 1984, с. 1—244.
2. Бланко Ф. Ф., Корбух И. А., Преображенская М. Н. Ж. орган. химии, 1976, т. 12, № 5, с. 1132—1133.
3. Корбух И. А., Якунина Н. Г., Преображенская М. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1632—1638.
4. Korbukh I. A., Bulyshev Y. N., Yakunina N. G., Preobrazhenskaya M. N. Nucl. Acids Res., 1981, Symposium Series, № 9, p. 73—75.
5. Zemlicka J. Chem. Ind., 1964, № 3, p. 581.
6. Карпейский М. Я., Михайлов С. Н., Падыюкова Н. Ш. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 933—939.
7. Yoshikawa M., Kato T., Takenishi T. Bull. Chem. Soc. Japan, 1968, v. 42, № 12, p. 3505—3508.
8. Dawson W. H., Cargill R. L., Dunlap R. B. J. Carbohydr., Nucleosides and Nucleotides, 1977, v. 4, № 6, p. 363—375.
9. Eckstein F., Goumet M. In: Nucleic Acid Chemistry/Eds Townsend L. B., Tipson R. S. N. Y.: Wiley Intersci. Publ., 1978, part 2, p. 861—864.
10. Hoard D. E., Ott D. G. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 8, p. 1785—1788.
11. Miller R. L., Adamczyk D. L., Miller W. H., Koszalka G. W., Rideout J. L., Beachman L. M., III, Chao E. Y., Haggerty J. J., Krenitsky T. A., Elion G. B. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 7, p. 2346—2352.
12. Plunkett W., Lapi L., Ortiz P. J., Cohen S. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 1, p. 73—77.
13. Yen R. C. K., Raivio K. O., Becker M. A. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 4, p. 1839—1845.
14. Добрынин Я. В., Николаева Т. Г., Муханов В. И., Ярцева И. В., Миникер Т. Д., Эжова Л. В., Толкачев В. Н., Чкаников Н. Д., Преображенская М. Н. Хим.-фарм. ж., 1978, № 5, с. 33—38.
15. Корбух И. А., Стукалов Ю. В., Зимакова Н. И., Преображенская М. Н. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1644—1649.

Поступила в редакцию
13.I.1984

BIOTRANSFORMATION OF 1- β -D-RIBOFURANOSYL-4-METHYLTHIOPYRAZOLO (3,4-*d*)PYRIMIDINE AND ITS 5'-MONOPHOSPHATE

KORBUKH I. A., GORYUNOVA O. V., STUKALOV Yu. V., IVANOVA T. P.,
DOBRYNIN Ya. V., PREOBRAZHENSKAYA M. N.

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

1- β -D-Ribofuranosyl-4-methylthiopyrazolo(3,4-*d*)pyrimidine (I) has been converted into its 5'-monophosphate (III) by reacting with POCl₃ in trialkyl phosphates or by phosphorylating 2',3'-O-ethoxymethylidene derivative of riboside (I) using 2-cyanoethyl phosphate in the presence of DCC and subsequent removal of blocking groups. Condensation of nucleotide (III) imidazolide with pyrophosphoric acid afforded corresponding 5'-triphosphate. Pools of natural NTPs and riboside (I) phosphates were monitored by HPLC after administering riboside (I), phosphate (III), or 4-methylthiopyrazolo(3,4-*d*)pyrimidine (II) into mice with leukemia L1210 or after incubating CaOv culture cells with these compounds. Treatment with riboside (I) or nucleotide (III) possessing anti-leukemic and cytotoxic activities led to much higher level of monophosphate (III), than treatment with biologically inactive base (II). ATP and GTP levels in CaOv cells incubated with (I) or (III) decreased by 60—70%, whereas (II) did not affect NTP pool. Bioactivation of nucleoside (I) into monophosphate (III) proceeds via direct phosphorylation by adenosine kinase. No transformation of (II) into (I) or (III) occurs under these conditions.