



УДК 547.854'.455.522'246.057.577.113.3:541.69

## СИНТЕЗ АНОМЕРНЫХ

## 5-ТРИМЕТИЛГЕРМИЛ-2'-ДЕЗОКСИУРИДИНОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Недорезова Т. П.,  
Ярцева Н. В., Жукова О. С., Добрынин Я. В.,  
Преображенская М. Н., Колесников С. П. \*, Ли В. Я. \*,  
Рсгожий И. С. \*, Нефедов О. М. \*, Чекунова Э. В. \*\*,  
Мареникова С. С. \*\*

Всесоюзный онкологический научный центр  
Академии медицинских наук СССР, Москва;

\* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва;

\*\* Московский научно-исследовательский институт вирусных препаратов  
Министерства здравоохранения СССР

Гликозилированием сильильного производного 5-триметилгермилурацила 2-дезоксид-3,5-ди-*O*-*n*-толуил- $\alpha$ -*D*-рибофуранозилхлоридом в дихлорэтано в присутствии  $\text{SnCl}_4$  и последующим дезацилированием синтезированы аномерные 5-триметилгермил-2'-дезоксинуридин.  $\alpha$ -Нуклеозид подавляет репликацию вируса простого герпеса HSV-1 *in vitro*, в концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  М ингибирует включение 2'-дезоксинуридина и тимидина в ДНК клеток гепатомы 22А на 88 и 27% соответственно, а также включение тимидина в ДНК клеток СаОv ( $\text{CE}_{50}$  5 мкг/мл). Введение  $\alpha$ -нуклеозида в дозе 125 мг/кг  $\times$  5 сут не увеличивает продолжительности жизни мышей с лейкозом Р388.

При изучении модифицированных пиримидиновых 2'-дезоксинуклеозидов с разветвленным заместителем в пятом положении агликона мы впервые обнаружили антигерпетическую активность у  $\alpha$ -аномеров 5-изопропил- [1], 5-( $\alpha$ -оксиизопропил)- [2], 5-( $\alpha$ -оксигексафторизопропил)- [3], 5-изобутил- [2] и 5-триметилсилил-2'-дезоксинуридина [4].  $\alpha$ -Аномеры 5-*трет*-бутил-, 5-перфторизопропил-, 5-*втор*-бутил- и 5-триэтилсилил-2'-дезоксинуридина не обладали противовирусными свойствами. Мы предположили, что удаленность С5-заместителя определенного размера от пиримидинового ядра определяет возможность биоактивации (фосфорилирования)  $\alpha$ -дезоксинуклеозида или возможность взаимодействия его с ферментом-мишенью. По-видимому, длина связи С5—С ( $\sim 1,5$  Å), например, в 5-*трет*-бутил-2'-дезоксинуридине недостаточна для специфического связывания с ферментом, тогда как длина связи С5—Si ( $\sim 1,8$  Å) в 5-триметилсилил-2'-дезоксинуридине оптимальна или близка к таковой.

Для проверки этого предположения было решено синтезировать ряд новых аномерных 5-замещенных 2'-дезоксинуридинов, в частности 5-триметилгермил-2'-дезоксинуридин (длина связи С—Ge составляет  $\sim 2$  Å [5]).

С этой целью из 5-бромурацила (I) последовательным взаимодействием с *n*-бутиллитием и триметилбромгерманом в гексаметилфосфотриамиде при  $-70$ – $-75^\circ\text{C}$  синтезировали 5-триметилгермилурацил (II) (схема). Действием гексаметилдисилазана превращали соединение (II) в бис-*O*-триметилсильильное производное, которое гликозилировали 2-дезоксид-3,5-ди-*O*-*n*-толуил- $\alpha$ -*D*-рибофуранозилхлоридом (III) в дихлорэтано в присутствии  $\text{SnCl}_4$ . При этом образовалась смесь *O*-ацилированных 2'-дезоксинуклеозидов (IV) и (V), соотношение аномеров  $\alpha$  :  $\beta \approx 1$  : 2. После обработки реакционной смеси отщепляя основное количество  $\beta$ -нуклеозида (V) кристаллизацией из метанола, затем колоночной хроматографией выделяли  $\alpha$ -нуклеозид (IV) и дополнительное количество  $\beta$ -апомера (V). Деблокированием соединений (IV) и (V) получали аномерные 5-триметилгермил-2'-дезоксинуридины (VI) и (VII).

Положение остатка 2-дезоксид-*D*-рибозы при атоме азота N1 пиримидинового цикла доказано сохранением максимума поглощения в УФ-спектрах нуклеозидов (VI) и (VII) при переходе от pH 7 к pH 11. Конфигурация аномеров (VI) и (VII) отнесена на основании данных спектров КД и ПМР (см. «Экспер. часть»). В спектре КД  $\beta$ -аномера (VII) имеется положительный, а у  $\alpha$ -аномера (VI) — отрицательный эффект Коттона при 270 нм.

В спектрах ПМР соединений (VI) и (VII) отмечены различия, характерные для аномеров 5-замещенных 2'-дезоксисуридинов [3, 4]: характер расщепления сигнала аномерного протона (дублет дублетов для  $\alpha$ - (VI) и псевдотриплет для  $\beta$ -аномера (VII)), величины химических сдвигов протонов при C2' (две группы сигналов при 2,02 и 2,69 м.д. для  $\alpha$ - и мультиплет при 2,16–2,34 м.д. для  $\beta$ -нуклеозида), а также смещение в слабое поле сигнала протона H4' у  $\alpha$ -аномера (VI) по сравнению с  $\beta$ -аномером (VII).

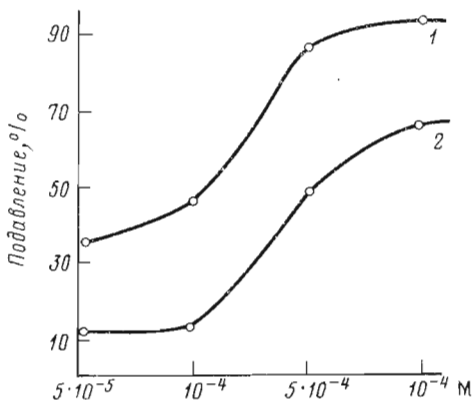
Изучение противовирусной и цитотоксической активности соединений (VI) и (VII) показало, что наибольший интерес представляет  $\alpha$ -нуклеозид (VI). При исследовании на культуре клеток куриных фибробластов, инфицированных вирусом простого герпеса HSV-1, соединение (VI) в концентрации 250 мкг/мл ингибирует репликацию вируса герпеса на 3,5 lg ЦПД<sub>50</sub>. \*  $\alpha$ -Аномер (VI) в концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  М подавляет включение 2'-дезоксисуридина в ДНК клеток гепатомы 22A *in vitro* на 88%, а  $\beta$ -аномер (VII) — на 50% (рисунок). В этом тесте в присутствии соединения (VI) отмечено 27%-ное торможение включения тимидина в ДНК, соединение (VII) не влияет на включение этого предшественника. При изучении на культуре клеток карциномы яичника человека СаОв цитотоксические свойства найдены только у  $\alpha$ -нуклеозида (VI): СЕ<sub>50</sub> составляет  $5 \pm 0,5$  мг/мл. Нуклеозиды (VI) и (VII) не обладают противоопухолевой активностью: введение их в дозе 125 мг/кг  $\times$  5 сут не увеличивало продолжительности жизни мышей с лейкозом Р388.

Таким образом, 5-триметилгермил-2'-дезоксисуридины (VI) и (VII) по своим антиметаболитным свойствам близки соответствующим аномерным 5-триметилсилл-2'-дезоксисуридинам [4]:  $\beta$ -аномеры обладают слабым биологическим действием,  $\alpha$ -аномеры ингибируют репликацию вируса простого герпеса HSV-1, проявляют цитотоксические свойства в опытах *in vitro* и не оказывают противоопухолевого действия *in vivo*.

Авторы выражают признательность Н. Я. Юрченко (ВОНЦ АМН СССР) за изучение противоопухолевой активности.

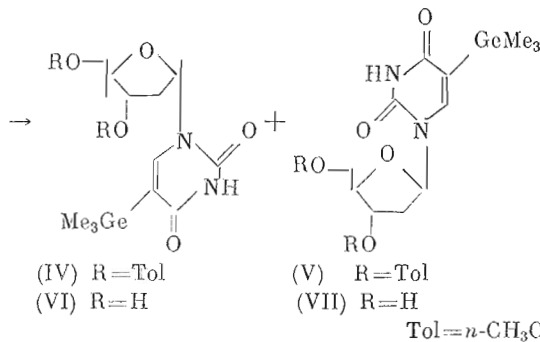
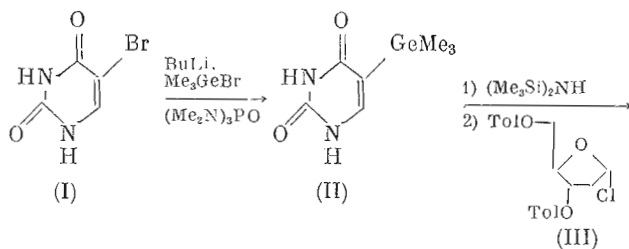
### Экспериментальная часть

Спектр ПМР соединения (II) записан на приборе Tesla BS467 (ЧССР), спектры соединений (VI) и (VII) — на приборе Bruker WH-360 (ФРГ), внутренний стандарт — тетраметилсилан. УФ-спектры получены на спектрофотометре Spexord UV-VIS (ГДР), длина оптического пути 1 см, растворитель — этанол. ИК-спектры записаны на приборе Perkin-Elmer 283 (США) в таблетках с KBr. Измерения кругового дихроизма проводили на дихрографе Rousell-Jouan III (Франция) в этаноле в кювете с длиной оптического пути 1 см. Для ТСХ использовали синюфол UV<sub>254</sub> (Kavalier, ЧССР), колоночную хроматографию проводили на силикагеле



Подавление соединениями (VI) и (VII) включения 2'-дезоксисуридина (1 и 2 соответственно) в ДНК клеток гепатомы 22A *in vitro*

\* ЦПД<sub>50</sub> — 50% цитопатическая доза [1]; СЕ<sub>50</sub> — цитотоксический эффект.



L 40–100 мкм (Chemapol, ЧССР). Опыты с гепатомой 22А проводили на мышцах линии СЗНА. Гепатому 22А перевивали внутрибрюшинно, вводя по 0,25 мл асцитной жидкости с клетками. Клетки CaOv выращивали в стандартных условиях [6], рассевали по  $(2-3) \cdot 10^5$  клеток в 2 мл среды 199 в стеклянные флаконы ( $d$  2 см) и выдерживали 24 ч при 37° С. В качестве меченого предшественника использовали [ $^3\text{H}$ ]тимидин (уд. акт. 444 ГБк/ммоль) фирмы «Изотоп» (СССР). Радиоактивность ДНК измеряли на счетчике Mark III (Nuclear Chicago, США) и выражали в расп/мл. Противовирусную активность дезоксирибонуклеозидов изучали *in vitro* на культуре клеток куриных фибробластов, инфицированных вирусом простого герпеса HSV-1, как описано в работе [1].

**Тетраметилгерман.** К 449,1 г (3,77 ммоль)  $\text{CH}_3\text{MgBr}$  в 1 л ди-*n*-бутилового эфира при перемешивании и охлаждении до  $-20^\circ\text{C}$  прибавляли по каплям 163 г смеси  $(\text{CH}_3)_2\text{GeBr}_2$  и  $\text{CH}_3\text{GeBr}_3$  (3:1) [7]. Поднимали температуру до  $20^\circ\text{C}$  и перемешивали 5 ч. Из реакционной смеси отгоняли 49,7 г тетраметилгермана, т. кип.  $46-47^\circ\text{C}$ . Лит. [8]: т. кип.  $44^\circ\text{C}/748$  мм рт. ст.

**Триметилбромгерман.** Получали из 44 г (0,33 моль) тетраметилгермана в 22 мл бромистого пропила и 56 г (0,35 моль) брома по методике [8]. Выход 60 г (92%), т. кип.  $114-116^\circ\text{C}$ . Лит. [8]: т. кип.  $113^\circ\text{C}/735$  мм рт. ст.

**5-Триметилгермилурацил (II).** К раствору 13 г (0,068 моль) 5-бромурацила (I) в смеси 620 мл тетрагидрофурана и 90 мл гексаметилфосфотриамида при перемешивании в атмосфере аргона при  $-75 \div -70^\circ\text{C}$  прибавляли по каплям 18,6 г (0,29 моль) *n*-бутиллития (116 мл 2,5 н. раствора в гексане). Смесь перемешивали 1 ч при  $-75^\circ\text{C}$ , прибавляли по каплям 56,9 г (0,288 моль) триметилбромгермана в течение 20 мин, выдерживали 2 ч при  $-75^\circ\text{C}$ , затем поднимали температуру реакционной смеси до  $20^\circ\text{C}$ . Растворитель отгоняли в вакууме, остаток выливали в 400 мл воды, нейтрализовали 50% уксусной кислотой, через 1 ч осадок отделяли, сушили. После кристаллизации из этанола получали 4,65 г 5-триметилгермилурацила (II), из маточного раствора дополнительно выделяли 0,5 г продукта. Общий выход 33%, т. пл.  $245-247^\circ\text{C}$ . Найдено, %: С 37,19; Н 5,68; Ge 31,23; N 12,13.  $\text{C}_7\text{H}_7\text{GeN}_2\text{O}_2$ . Вычислено, %: С 36,75; Н 5,25; Ge 31,76; N 12,25. Спектр ПМР,  $\delta$ , м. д.: 0,22 (9H,  $\text{Ge}(\text{CH}_3)_3$ ), 7,04 (1H, H6).

**Аномерные 5-триметилгермил-2'-дезоксуридины (VI) и (VII).** Смесь, состоящую из 4,38 г (19 ммоль) соединения (II), 4 мг сульфата аммония и 35 мл гексаметилдисульфана, кипятили 7 ч. Избыток гексаметилдисульфана отгоняли в вакууме, остаток растворяли в 30 мл дихлорэтана и при-

бавляли к смеси 7,05 г (18 ммоль) галогенозы (III) и 0,2 мл  $\text{SnCl}_4$  в 40 мл того же растворителя. Реакционную смесь перемешивали 4,5 ч при 20–22° С, затем промывали последовательно насыщенным раствором бикарбоната натрия, водой. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток обрабатывали 15 мл метанола, отделяли 3,87 г О-ацелированного  $\beta$ -аномера (V). Фильтрат упаривали в вакууме, остаток наносили на колонку с силикагелем. Смесью бензол — этилацетат, 20 : 1, вымывали углеводные примеси и 1,23 г (45%) соединения (V), затем смесью бензол — этилацетат, 10 : 1, элюировали 2,78 г (25%) О-ацелированного  $\alpha$ -аномера (IV).

Раствор 2,78 г соединения (IV) в 70 мл 0,1 н. метилата натрия в метаноле выдерживали 5 ч при 20–22° С. Реакционную смесь нейтрализовали дауэксом 50 ( $\text{H}^+$ ) до pH 7 по универсальному индикатору, смолу отделяли, промывали метанолом, объединенные фильтраты упаривали в вакууме. Остаток растворяли в воде, раствор экстрагировали петролейным эфиром (40–70° С), воду упаривали, остаток сушили над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Получено 1,47 г (90%)  $\alpha$ -нуклеозида (VI). УФ-спектр:  $\lambda_{\text{макс}}$  267 нм,  $\epsilon$  9850. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3420, 1682, 1625. Спектр КД:  $\lambda_{\text{макс}}$  270 нм,  $[\theta]$  —3800. Спектр ПМР,  $\delta$ , м. д.: 7,89 (1H, H6), 6,27 (1H, H1',  $J_{1'2'_a}$  2,0,  $J_{1'2'_b}$  7,5 Гц), 2,02 (1H, H2'\_a,  $J_{2'_a2'_b}$  14,5,  $J_{2'_a3'}$  1,5 Гц), 2,69 (1H, H2'\_b,  $J_{2'_b3'}$  6,0 Гц), 4,37 (1H, H3',  $J_{3'4'}$  1,5 Гц), 4,26 (1H, H4'), 3,56 (2H, H5'\_a, H5'\_b), 0,35 (9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{Ge}$ ). Найдено, %: С 41,77; Н 5,98; N 8,15.  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{GeN}_2\text{O}_5$ . Вычислено, %: С 41,78; Н 5,85; N 8,12.

Аналогично из 3,83 г соединения (V) в 97 мл 0,1 н. метилата натрия в метаноле получали 1,97 г (88%)  $\beta$ -нуклеозида (VII). УФ-спектр:  $\lambda_{\text{макс}}$  268 нм,  $\epsilon$  9700. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3420, 1680, 1610. Спектр КД:  $\lambda_{\text{макс}}$  272 нм,  $[\theta]$  +7900. Спектр ПМР,  $\delta$ , м. д.: 7,83 (1H, H6), 6,31 (1H, H1',  $J_{1'2'_a} \approx J_{1'2'_b} \approx 6,3$  Гц), 2,16–2,34 (2H, H2'\_a, H2'\_b), 4,41 (1H, H3',  $J_{3'4'}$  3,0 Гц), 3,94 (1H, H4',  $J_{4'5'_a} = J_{4'5'_b}$  3,0 Гц), 3,77 (1H, H5'\_a,  $J_{5'_a5'_b}$  11,0 Гц), 3,72 (1H, H5'\_b), 0,35 (9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{Ge}$ ). Найдено, %: С 41,51; Н 5,85; N 8,05.  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{GeN}_2\text{O}_5$ . Вычислено, %: С 41,78; Н 5,85; N 8,12.

*Изучение влияния соединений (VI) и (VII) на синтез ДНК в клетках гепатомы 22А.* На седьмой день роста гепатомы животных забивали смещением шейных позвонков, клетки извлекали из брюшной полости, освобождали от эритроцитов и суспендировали в среде Игла с добавлением глутамина. После инкубации с препаратом в течение 15 мин в 5% суспензию клеток добавляли [ $^{14}\text{C}$ ]тимидин (3,7 кБк) и [ $^3\text{H}$ ]дезоксисуридин (37 кБк) и выдерживали 1 ч. Смесь обрабатывали 1 н.  $\text{HClO}_4$  в течение 20 мин при 0° С, осадок отделяли от кислоторастворимой фракции центрифугированием, промывали его последовательно охлажденной до 0–5° С 5 и 2,5% трихлоруксусной кислотой, водой. Для освобождения от фосфолипидов осадок обрабатывали этанолом, смесью этанол — эфир (3 : 1) при 60° С в течение 15 мин, эфиром при 30° С в течение 10 мин. Разделяли РНК и ДНК по методу Шмидта и Талгаузера [9], количество ДНК определяли спектрофотометрически по методу Спирина [10]. Радиоактивность измеряли жидкостным сцинтилляционным методом в ЖС-8, удельную радиоактивность ДНК выражали в расп/мин·мг. При сопоставлении с контрольной инкубационной смесью, не содержащей препарата, рассчитывали торможение включения меченого предшественника в ДНК.

*Изучение цитотоксического действия соединений (VI) и (VII) на культуре клеток СаОv.* Растворы дезокси-нуклеозидов (VI) и (VII) в 2 мл среды 199 с концентрацией 1, 10 и 100 мкг/мл инкубировали с клетками СаОv 24 ч при 37° С. За 1 ч до окончания срока инкубации вводили [ $^3\text{H}$ ]тимидин до конечной концентрации 37 кБк/мл. Включение тимидина останавливали, помещая пробы в лед. Среду сливали, клетки промывали раствором Хенкса, 2,5%  $\text{HClO}_4$ , затем обрабатывали 20 мин 5%  $\text{HClO}_4$  при 80° С. Гидролизаты охлаждали, из каждой пробы отбирали по 0,1 мл, помещали во флаконы с ЖС-8 и определяли радиоактивность в расп/мин. Синтез ДНК в клетках СаОv оценивали по уровню радиоактивности гидролизатов

и выражали в % от контроля. С помощью пробит-анализа кривых зависимости эффекта от концентрации нуклеозида с учетом 95% доверительного интервала графически определяли величину  $CE_{50}$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Ярцева И. В., Преображенская М. Н., Загуляева О. А., Мамаев В. П. *Биоорган. химия*, 1982, т. 8, № 8, с. 1102–1107.
3. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Недорезова Т. П., Ворновицкая Г. И., Преображенская М. Н., Аветисян Э. А., Герман Л. С., Полищук В. Р., Чекунова Э. В., Бектемиров Т. А., Анджапаридзе О. Г. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 7, с. 1047–1053.
4. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Миникер Т. Д., Ярцева И. В., Преображенская М. Н., Загуляева О. А., Мамаев В. П., Чекунова Э. В., Маренникова С. С. *Биоорган. химия*, 1984, т. 10, № 12, с. 1645–1654.
5. *Glockling F. The Chemistry of Germanium*. L.—N. Y.: Acad. Press, 1969, p. 13.
6. Добрынин Я. В., Монатова Т. С., Мирзоян Е. Е. *Вопр. онкологии*, 1974, т. 20, № 3, с. 44–53.
7. Зуева Г. Я., Лукьянкина Г. В., Попомаренко В. А. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1967, № 1, с. 192–194.
8. Миронов В. Ф., Кравченко В. Л. *Изв. АП СССР. Сер. хим.*, 1965, № 6, с. 1026–1035.
9. Schmidt G., Thannhauser S. J. *J. Biol. Chem.*, 1945, v. 161, N 1, p. 83–84.
10. Спириин А. С. *Биохимия*, 1958, т. 23, № 5, с. 656–662.

Поступила в редакцию  
11.11.1985

#### SYNTHESIS OF ANOMERIC 5-TRIMETHYLGERMYL-2'-DEOXYURIDINES AND INVESTIGATION OF THEIR ANTIVIRAL AND CYTOTOXIC PROPERTIES

MEL'NIK S. Ya., BAKHMEDOVA A. A., NEDOREZOVA T. P., YARTSEVA I. V.,  
ZHUKOVA O. S., DOBRYNIN Ya. V., PREOBRAZHENSKAYA M. N.,  
KOLESNIKOV S. P. \*, LEE V. Ya. \*, ROGOZHIN I. S. \*,  
NEFEDOV O. M. \*, CHEKUNOVA E. V. \*\*, MARENNIKOVA S. S. \*\*

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

*\*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; \*\* Moscow Research Institute of Viral  
Preparations, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow*

Glycosylation of silylated 5-trimethylgermyluracil with 2-deoxy-3,5-di-*O-p*-toluyl- $\alpha$ -D-ribofuranosylchloride in dichloroethane in the presence of  $SnCl_4$  and subsequent deacylation led to anomeric 5-trimethylgermyl-2'-deoxyuridines. The  $\alpha$ -nucleoside inhibits HSV-1 replication in vitro, blocks 2'-deoxyuridine incorporation into DNA of hepatoma 22A cells and incorporation of thymidine into DNA of cancer ovarian cells as well. Treatment with 125 mg/kg $\times$ 5 days of  $\alpha$ -nucleoside fails to increase the life-span of mice with leukemia P388.