

К.В. Серёгин
аспирант,
Н.А. Ильякова
студент группы БМ-69,
М.В. Чудинов
ассистент,
В.И. Швец
академик РАМН
кафедра Биотехнологии
МИТХТ им. М.В. Ломоносова

СИНТЕЗ НОВЫХ 3'-N-АЦИЛЬНЫХ И 3'-N-АЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3'-АМИНО-3'- ДЕЗОКСИТИМИДИНА

УДК 547.854.4'455.522.057+615.012.1

Получен ряд новых 3'-N-ацильных производных 3'-амино-3'-дезокситимидина путем конденсации нуклеозида с карбоновыми кислотами, а также проведено его алкилирование эфирами α,β -ненасыщенных карбоновых кислот с получением новых 3'-N-алкильных производных.

Введение.

Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) - одна из болезней, вызывающих большое беспокойство в обществе. Для этого заболевания до сих пор не существует терапии, приводящей к полному выздоровлению. Продолжающееся во всём мире распространение этой болезни требует широких научных и клинических исследований, направленных на понимание механизма и борьбу с ней. На данный момент наиболее эффективной оказывается комбинированная терапия с помощью так называемых анти-ВИЧ "коктейлей", состоящих из (i) нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ (NRTI) (зидовудин, ставудин, ламивудин), (ii) ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ (NNRTI) (невирапин, делавирдин, эфавиренц) и (iii) ингибитора протеазы (ритонавир, индинавир) [1]. Хотя жизненный цикл вируса предоставляет много возможных мишеней для атаки различными химическими агентами, и разработки ведутся не только в области ингибирования выше упомянутых жизненно важных для вируса ферментов, поиски ингибиторов именно этих трех типов ведутся наиболее широко.

Азидотимидин, 3'-азидо-3'-дезокситимидин (1), являющийся NRTI, был первым лекарством, официально принятым для лечения СПИДа. Высокая анти-ВИЧ активность этого соединения побудила многих исследователей к поиску более эффективных соединений среди веществ подобного типа. В частности проводились многочисленные исследования производных тимидина, содержащих по 3'-положению атом азота [2-7]. Один из представителей этих соединений - 3'-амино-3'-дезокситимидин (2) - способен эффективно ингибировать работу некоторых ДНК-полимераз, в том числе и обратную транскриптазу ВИЧ [8], обладает противоопухолевыми свойствами [9,10], но, к сожалению, не может использоваться в клинической практике ввиду высокой токсичности [11]. Поиск потенциальных фармакофоров в ряду его производных велся довольно широко [12, 13].

Обсуждение результатов.

Возможности модификации аминотимидина чрезвычайно широки, а многие из полученных соединений также являются активными веществами. Представляется возможным модификация аминотимидина путем ацилирования 3'-аминогруппы и получения соединений, представляющих собой депо-формы аминотимидина с приемлемым соотношением активность/токсичность, способных гидролизироваться *in vivo* до активной формы. Другой возможной модификацией является алкилирование 3'-аминогруппы различными алкилирующими агентами. Это позволит сохранить основность 3'-аминогруппы, от которой,

возможно, зависит активность аминотимидина, и снизить токсичность [14].

Нами был получен ряд 3'-N-ацилированных производных аминотимидина (3a-e) путем конденсации аминотимидина с соответствующими кислотами.

Конденсация проводилась с помощью гексафторфосфат-(бистриазол-1-илокси)-трис-(диметиламино)-фосфония (BOP-реагент) в диметилформамиде при комнатной температуре в присутствии диизопропилэтиламина (ДИЭА) (рис.1).

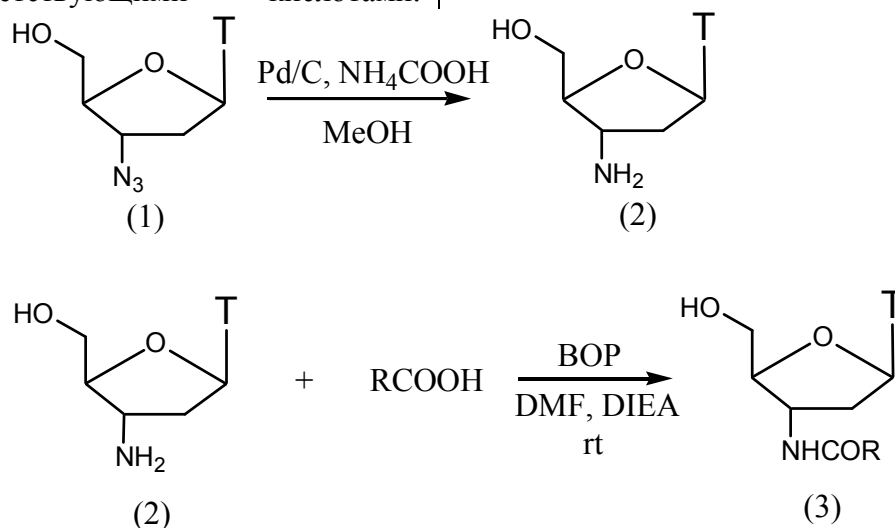


Рисунок 1.

Используемый нами BOP-реагент ранее не упоминался в литературе как конденсирующий агент для ацилирования аминотимидина кислотами, хотя в работе [15] использовали конденсирующий агент EEDQ для ацилирования аминотимидина уксусной кислотой.

Для ацилирования применяли 3-бензоилпропионовую, 2-(4,5-дифенил-1H-пиразол-1-ил)-уксусную, гидрокоричную, изоникотиновую и *O*-анисовую кислоты. Выходы продуктов колебались от среднего

(54% для 3-бензоилпропионовой кислоты) до высокого (90% для *O*-анисовой кислоты) (табл. 1). Все реакции проводили на незащищенном аминотимидине, который получали каталитическим восстановлением (Pd/C) 3'-дезоксиз-3'-азидотимидина (1) формиатом аммония [16]. Попытка провести конденсацию с акриловой кислотой не удалась, вероятно, из-за протекания конкурентного присоединения по Михаэлю к двойной связи акриловой кислоты.

Таблица.1. Выходы реакций конденсации 3'-амино-3'-дезокситимидина с различными кислотами

(3)	Вещество	Выход
a	<i>O</i> -анисовая кислота	90
b	изоникотиновая кислота	76
c	2-(4,5-дифенил-1H-пиразол-1-ил)-уксусная кислота	67
d	3-бензоилпропионовая кислота	54
e	гидрокоричная кислота	75

В качестве алкилированных производных аминотимидина нами были получены соединения (4) и (5), являющиеся продуктами моно- и диакилирования аминотимидина этилакрилатом, протекающего как присоединение по Михаэлю (рис.2). Реакцию аминотимидина с этилакрилатом проводили в абсолютном

метаноле при 50°C. Выход продукта моноалкилирования составил 95%. Провести повторное алкилирование в тех же условиях не удалось. Поэтому повторное алкилирование проводили в кипящем изопропанол в присутствии КОН. После очистки на хроматографической колонке продукт был получен с выходом 85%.

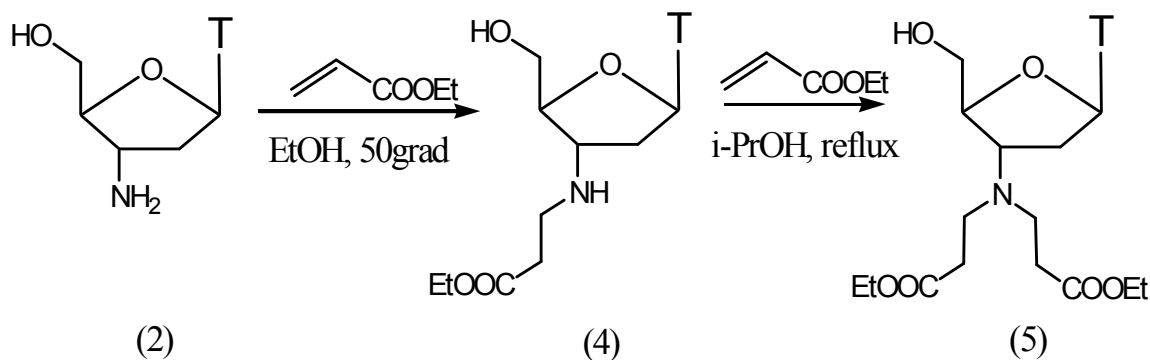


Рисунок 2.

Попытка алкилировать аминотимидин метиловым эфиром итаконовой кислоты привела к образованию лактама (6). Вероятно, реакция протекает через присоединения по Михаэлю по метиленовой группе итаконовой кислоты, за которым происходит немедленное замыкание продукта присоединения в пятичленный лактам (Рис.3).

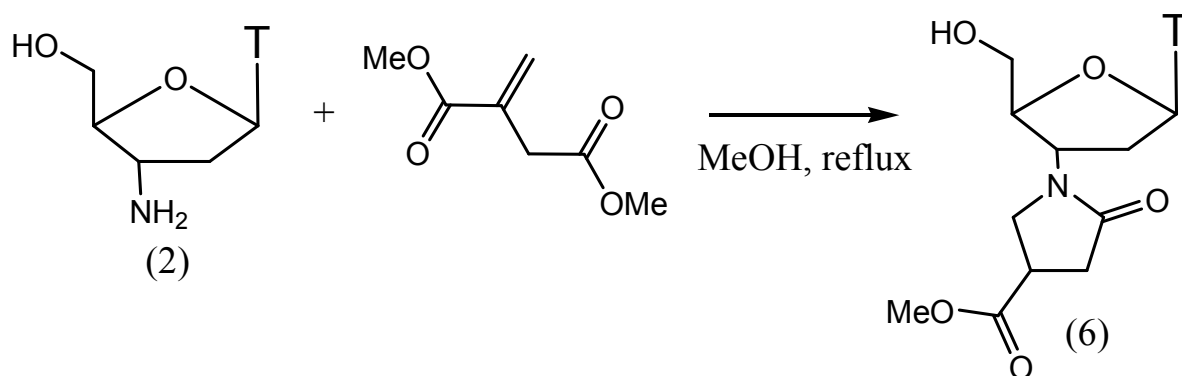


Рисунок 3

Экспериментальная часть.

В работе применялись реактивы производства фирм Merk (Германия), Lancaster (США), Fluka (Швеция) и отечественного производства. Использовались перегнанные растворители отечественного производства. Метанол и этанол перед использованием абсолютировались.

Для проведения ТСХ использовались хроматографические пластинки Kieselgel F₂₅₄ (Merk, Германия). ТСХ проводили в системах: А - 100%хлороформа, Б - 10%метанола-90%хлороформа, В - 20%метанола-80%хлороформа.

Колоночную хроматографию проводили с использованием силикагеля Kieselgel 60.

Спектры ¹H-ЯМР регистрировались на приборе MSL200 (Bruker, Германия) с резонансной частотой протонов 200,13МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях.

3'-дезоксидеокси-3'-(о-метоксибензоиламидо)-тимидин (3a)

100мг (0,41ммоль) 3'-амино3'-дезокситимидина, при перемешивании, растворили в 3мл ДМФА и добавили 70мг (0,46ммоль) о-анисовой кислоты, 203мг (0,46ммоль) ВОР, 0,07мл (0,5ммоль) ДИЭА. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе А. R_f конечного продукта ~0,8. По окончании реакции (2 часа) реакционную массу разбавили 20% раствором K₂CO₃, экстрагировали этилацетатом (20x2), затем промыли объединенные органические экстракты насыщенным раствором NaCl (10мл) и высушили над Na₂SO₄. Затем удалили растворитель в вакууме. Хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент – хлороформ). Выход 140мг (90%). ¹H-ЯМР (CDCl₃) 8,42 (д., 1H, 3'-NH), 7,68-7,01 (м., 6H, H-5, бензоил), 6,22 (т., 1H, H-1'), 4,55 (м., 1H, H-4'),

3,92 (м., 1H, H-3'), 3,61 (д., 2H, H-5'), 3,29 (с., 3H, CH₃O-Phe), 2,28 (м., 2H, H-2'), 1,80 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-дезоксизоникотинамидотимидин (3b)

Условия реакции те же, что и для (3a), но с 56мг (0,46ммоль) изоникотиновой кислоты. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. R_f конечного продукта ~0,5. По окончании реакции (2 часа) реакционную массу разбавили 20% раствором K₂CO₃, экстрагировали этилацетатом (20x2), затем промыли объединенные органические экстракты насыщенным раствором NaCl (10мл) и высушили над Na₂SO₄. Затем удалили растворитель в вакууме. Растворили остаток горячем этаноле, охладили раствор до комнатной температуры и добавили 4 капли 4М HCl в диоксане. Выпавшие кристаллы желтоватого цвета отфильтровали и сушили в вакууме (1 мм рт.ст.) в течение 3 часов. Выход 110мг (76%). ¹H-ЯМР (CDCl₃) 9,07 (д., 2H, C₂, C₆-Py), 8,42 (д., 1H, 3'-NH), 7,96 (д., 2H, C₃, C₅-Py), 7,59 (д., 1H, H-6), 6,22 (т., 1H, H-1'), 4,55 (м., 1H, H-4'), 3,92 (м., 1H, H-3'), 3,61 (д., 2H, H-5'), 2,28 (м., 2H, H-2'), 1,80 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-дезоксизоникотинамидотимидин (3c)

Условия реакции те же, что и для (3a), но с 122мг (0,46ммоль) 2-(4,5-дифенил-1H-пиразол-1-ил)-уксусной кислоты. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. Выделение целевого продукта проводилось также, как и для (3a). Выход 130мг (67%). ¹H-ЯМР (CDCl₃) 9,24 (д., 1H, 3'-NH), 7,66 (д., 1H, H-6), 7,45 (д., 4H, C₂, C₆-Phe), 6,21 (т., 1H, H-1'), 4,71 (с., 2H, -NHCOCH₂-), 4,53 (м., 1H, H-3'), 3,92 (м., 1H, H-4'), 3,78 (д., 2H, H-5'), 2,36 (м., 2H, H-2'), 1,92 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-(3-бензоилпропионамидо)-3'-дезокситимидин (3d)

Условия реакции те же, что и для (3a), но с 82мг (0,46ммоль) 3-бензоилпропионовой кислоты. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе А. R_f конечного продукта ~0,8. Выделение целевого продукта проводилось также, как и для (3a). Выход 90мг (54%). ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) 7,96 (д., 2H, C₅, C₃-Phe), 7,61 (д., 1H, H-6), 7,50 (т., 2H, C₆, C₂-Phe), 6,21 (т., 1H, H-1'), 4,33 (т., 1H, H-4'), 3,78 (т., 1H, H-3'), 3,62 (м., 2H, H-5'), 3,25 (т., 2H, -NCOCH₂-), 2,19 (м., 2H, H-2'), 1,77 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-дезоксизоникотинамидотимидин (3e)

Условия реакции те же, что и для (3a), но с 69мг (0,46ммоль) гидрокоричной кислоты. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. R_f конечного продукта ~0,9. Выделение целевого продукта проводилось также, как и для (3a), но хроматографировали с элюентом этилацетатом. Выход 100мг (75%). ¹H-ЯМР (CDCl₃) 7,96 (д., 1H, 3'-NH), 7,71 (д., 1H, H-6), 6,04 (т., 1H, H-1'), 4,44 (т., 1H, H-4'), 3,87 (м., 1H, H-3'), 3,61 (д., 2H, H-5'), 2,96 (т., 2H, -NHCH₂CH₂-), 2,51 (т., 2H, -NHCH₂CH₂-), 2,22 (м., 2H, H-2'), 1,93 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-амино-3'-дезоксизоникотинамидотимидин (4)

1г (4,1ммоль) 3'-амино-3'-дезокситимидина растворили в 20 мл этанола и при перемешивании добавили 1,35мл (12ммоль) этилового эфира акриловой кислоты. Кипятили в течении 12 часов. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе В. R_f конечного продукта ~0,85. После окончания реакции растворитель удалили в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке (элюент: хлороформ-метанол, градиент метанола 0-5%). Выход 1,41г (95%). ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) 7,72 (с., 1H, H-6), 6,08 (т., 1H, H-1'), 4,05 (м., 2H, -COOCH₂CH₃), 3,9 (м., 2H, H-5'), 3,65 (м., 1H, H-4'), 3,22 (м., 1H, H-3'), 2,72 (т., 2H, -CH₂COOEt), 2,4 (т., 2H, -CH₂CH₂COOEt), 2,06 (м., 2H, H-2'), 1,77 (с., 3H, 5-CH₃), 1,18 (т., 3H, -COOCH₂CH₃).

3'-амино-3'-N,N-ди-(β-этоксикарбонилэтил)-3'-дезокситимидин (5)

0,675г (2ммоль) соединения (4a) растворили в изопропанолу и при перемешивании добавили 0,64мл (6ммоль) этилового эфира акриловой кислоты и каталитическое количество КОН. Раствор кипятили в течение четырех суток. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. R_f конечного продукта ~0,85. Затем удалили растворитель в вакууме. Хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент: ПЭЛ – хлороформ, градиент ПЭЛ 50-10%). Выход 750мг (85%). ^1H -ЯМР (CDCl_3) 7,82 (д., 1H, H-6), 6,10 (т., 1H, H-1'), 4,04 (м., 4H, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 3,66-3,28 (м., 3H, H-3',5'), 2,75-2,53 (м., 2H, 3'- NCH_2), 2,40-2,06 (м., 2H, 3'- NCH_2), 2,12 (м., 2H, H-2'), 1,82 (с., 3H, 5- CH_3), 1,18 (т., 6H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

3'-дезоксид-3'-(3-этоксикарбонил-5-пирролидон-1-ил)-тимидин (6).

К раствору 1,5г (2ммоль) 3'-амино-3'-дезокситимидина в 25мл метанола добавили 2,15г (14ммоль) диметилового эфира итаконовой кислоты. Раствор кипятили в течение 72 часов. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. R_f конечного продукта ~0,3. Затем реакционную смесь экстрагировали петролейным эфиром (2x20мл). Удалили растворитель в вакууме из объединенных органических фракций. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент: ПЭЛ-хлороформ, градиент ПЭЛ 50-0%). Выход 1,7г (89%). ^1H -ЯМР (CDCl_3) 6,14 (т., 1H, H-1'), 4,72 (м., 1H, H-4'), 3,90 (м., 2H, H-5'), 3,70-3,62 (м., 6H, H-3', $-\text{COOCH}_3$, 3'- NCH_2), 3,31-2,70 (м., 2H, CH_2 пирролидона), 2,74-2,29 (м., 2H, H-2'), 1,89 (с., 3H, 5- CH_3).

ЛИТЕРАТУРА:

1. DeClercq E.//Current Medicinal Chemistry, 2001, P.1543 - 1572
2. Celewicz L., Urjasn W., Golankiewicz K.//Nucleosides & Nucleotides, 1993, v.12, №9, P.951 - 966
3. Chung K., Raymond F., Moon K., Giliyar V., Zi P.//J. Med. Chem., 1989, V.32, P.612 - 617
4. Wigerinck P., Van Aerceshot A., Janssen G., Claes P.//J. Med. Chem., 1990, V.33, P.868 - 873
5. Zehl A., Cech D.//Libigs Ann., 1997, P.595 - 600
6. Handlon A., Oppenheimer N.//Pharm. Res., 1988, P.297 - 299
7. Leffler J., Temple R.//J. Am. Chem. Soc., 1967, P.5235 - 5245
8. Krenitsky T., Freeman G., Shaver S., Beacham III L., Hurlbert S.//J. Med. Chem., 1983, V.26, P.891 - 895
9. Lin T., Prusoff W.//J. Med. Chem., 1978, V.21, P.109 - 112
10. Ashida N., Asano S., Kohda K.//Anticancer Res., 1994, V.14, P.2061 - 2062
11. Cretton E., Sommadossi J. //Drug Metab. Dispos., 1993, V.21, P.946 - 950
12. Maillard M., Faraj A., Frappier F., Florent J.-C., Grierson D., Monneret C.//Nucleic Acids Res. Suppl., 2001, P.121 - 122
13. Pannecouque C., Van Poppel K., Balzarini J., Claes P., De Clercq E., Herdewijn P.//Nucleosides & Nucleotides, 1995, V.14, №3-5, P.541 - 544
14. Jasko M., Fedorov I., Atrazhev A.//Nucleosides & Nucleotides, 1995, V.14, №1&2, P.23 - 37
15. Hampton A., Kappler F., Chawia R.//J. Med. Chem., 1979, V.22, №6, P.621 - 631.