

УДК 577.113.3.:577.152.111*205'134

Карбоциклические аналоги инозин-5'-монофосфата: синтез и биологическая активность

Е. С. Матюгина¹, С. Н. Андреевская², Т. Г. Смирнова², А. Л. Хандажинская^{1*}¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32²Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564, Москва, Яузская аллея, 2

*E-mail: khandazhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 03.08.2012

РЕФЕРАТ Осуществлен синтез 9-(4'-фосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)гипоксантина и 9-(4'-фосфонометокси-2',3'-дигидроксициклопент-1'-ил)гипоксантина – изостерных карбоциклических аналогов инозин-5'-монофосфата. Показано, что синтезированные соединения способны ингибировать активность инозинмонофосфатдегидрогеназы (IMPDH II) человека ($EC_{50} = 500$ мкМ) и в концентрациях до 500 мкМ не влияют на рост *Mycobacterium tuberculosis*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА карбоциклические нуклеозиды, конкурентное ингибирование, инозин-5'-монофосфат, IMPDH II человека, *Mycobacterium tuberculosis*.

ВВЕДЕНИЕ

Инозинмонофосфатдегидрогеназа (IMPDH, [КФ 1.1.1.205]) – один из ключевых ферментов биосинтеза *de novo* пуриновых нуклеотидов (GTP и dGTP). Природным субстратом IMPDH служит инозин-5'-монофосфат (IMP). IMPDH катализирует NAD^+ -зависимую реакцию, приводящую к образованию NADH и ксантозин-5'-монофосфата, который затем превращается в гуанозин-5'-монофосфат (GMP). Ингибирование IMPDH приводит к понижению внутриклеточного уровня гуанинсодержащих нуклеотидов, обеспечивая антимикробный, антипаразитарный, антивирусный, противоопухолевый и иммуноподавляющий эффекты [1, 2].

Существующие ингибиторы IMPDH по месту связывания с ферментом делятся на три группы: аналоги IMP, аналоги NAD^+ и аллостерические ингибиторы. Модифицированные нуклеозиды, принадлежащие к первой группе, подвергаются внутриклеточному фосфорилированию и в виде 5'-монофосфатов конкурентно взаимодействуют с центром связывания IMP. Среди аналогов IMP есть обратимые (5'-монофосфаты рибавирина, 3-дезагуанозина, мизорибина) и необратимые ингибиторы (5'-монофосфаты 2-винилинозина, 6-хлорпуридиннуклеозида, 5-этинил-1-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамид). Наиболее известными представителями второй группы ингибиторов являются тиазофуридин, селеназофуридин и микофеноловая кислота.

IMPDH человека представлена двумя изоформами – I и II, гомологичными на 84%. Фермент типа I преобладает в нормальных лимфоцитах и лейкоцитах, типа II – в активно делящихся и опухолевых клетках. Бактериальные IMPDH из разных источников значительно отличаются от фермента человека, процент гомологии составляет 30–41%. Средство IMPDH из разных источников к одним и тем же ингибиторам может существенно различаться [2]. Например, IMPDH II человека более чувствительна к микофеноловой кислоте ($K_i = 7$ нМ), чем IMPDH I ($K_i = 33$ нМ), а активность данного соединения в отношении бактериальных ферментов еще ниже ($K_i = 0.2$ –20 мкМ) [2]. Селективность IMPDH в отношении ингибиторов делает этот фермент весьма привлекательной мишенью для потенциальных противоопухолевых, антимикробных и антипаразитарных препаратов [2].

Ингибирование IMPDH из *Mycobacterium tuberculosis*, как показано недавно, подавляет рост этой бактерии [3]. В настоящий момент основная задача в терапии туберкулеза – поиск новых препаратов, эффективных против штаммов, устойчивых к существующим лекарственным средствам. Механизм действия новых препаратов должен отличаться от механизма уже используемых лекарств, поэтому целесообразным представляется поиск новых противотуберкулезных агентов не среди представителей известных классов антибиотиков, а среди соединений другой природы, нацеленных на иные

ферменты-мишени. Среди лекарственных средств, применяемых при туберкулезе, нет аналогов нуклеозидов, что в сочетании с их потенциальной активностью в отношении IMPDH позволяет считать такие аналоги перспективными для изучения в качестве антимикобактериальных средств.

В представленной работе описан синтез 9-(4'-фосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)-гипоксантина (**1**) и 9-(4'-фосфонометокси-2',3'-дигидроциклопент-1'-ил)гипоксантина (**2**) (рис. 1) – изостерных карбоциклических аналогов IMP, и оценена способность соединений **1** и **2** ингибировать IMPDH II человека и подавлять рост *M. tuberculosis*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы коммерчески доступные реактивы и растворители («Acros», «Aldrich» и «Fluka»). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ («Merck») в системах: CHCl₃–MeOH, 98 : 2 (система А); CHCl₃–MeOH, 9 : 1 (система Б), диоксан–NH₃, 4 : 1 (система В), изопропанол–NH₃–вода, 7 : 2 : 1 (система Г). Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Kieselgel (40–63 мкм, «Merck»), обращенно-фазовом силикагеле Lichroprep RP-18 и ионообменной смоле DEAE-Toyorearl. Системы для элюции указаны в тексте.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1201 (Япония). Спектры ¹H-ЯМР, ³¹P-ЯМР регистрировали на спектрометре AMX III-400 («Bruker») с рабочей частотой 400 МГц для ¹H-ЯМР (приведены химические сдвиги относительно внутренних стандартов – Me₄Si для органических растворителей и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат натрия (DSS) для D₂O) и 162 МГц для ³¹P-ЯМР (с подавлением фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия; приведены химические сдвиги относительно внешнего стандарта – 85% фосфорной кислоты). Химические сдвиги приведены в миллионных долях.

Исходный 6-хлор-9-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)пурин (**3**) был синтезирован по ранее описанной методике [4].

6-Этокси-9-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)пурин (**4**)

К раствору соединения **3** (300 мг, 13 ммоль) в 10 мл этанола добавляли прокаленный K₂CO₃ (300 мг, 2.3 ммоль), полученную суспензию кипятили в течение 1 ч. Ход реакции контролировали посредством ТСХ (система А). Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, для элюции использовали систему Б, целевые фракции концентрировали в вакууме. Выделили 220 мг (78%) продукта **4** в виде белой пены. ¹H-ЯМР (CD₃OD): 8.42 (1 H, с, H₂), 7.95 (1 H, с, H₈), 6.34–6.33 (1 H, м, H₂), 5.82 (1 H, м, H₃), 5.34–5.32 (1 H, м, H₁), 4.86 (1 H, м, H₄), 4.64–4.62 (2 H, м, O–CH₂), 3.02–2.98 (1 H, м, H_{a5}), 2.23–2.19 (1 H, м, H_{b5}), 1.5–1.48 (3 H, м, CH₃).

6-Этокси-9-(4'-этилфосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)пурин (**5**)

К раствору соединения **4** (230 мг, 0.93 ммоль) в 5 мл диметилформамида (ДМФА) при перемешивании в токе аргона добавляли NaN (33.5 мг, 1.4 ммоль) и Cs₂CO₃ (234 мг, 0.72 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 1.5 ч при комнатной температуре, добавляли раствор этилового эфира *n*-толуолсульфон илоксиметилфосфоновой кислоты (334 мг, 1.8 ммоль) в 2 мл ДМФА, и раствор перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали при помощи ТСХ (система В). Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с DEAE-Toyorearl, элюировали линейным градиентом NH₄HCO₃ (0–0.2 М), целевой продукт **5** элюировали 0.1 М NH₄HCO₃, полученный раствор концентрировали, целевой продукт выделяли на колонке с обращенно-фазовым сорбентом LiChroprep RP-18, элюировали линейным градиентом водного этанола (0–10%), продукт элюировали 8% раствором этанола в воде. Получили 240 мг (67%) продукта **5** в виде бесцветного масла. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.14 (1 H, с, H₂), 8.06 (1 H, с, H₈), 6.34–6.32 (1 H, м, H₂), 6.15 (1 H, м, H₃), 5.35 (1 H, м, H₁), 4.63 (1 H, м, H₄), 4.38 (2 H, м, O–CH₂), 3.76–3.72 (2 H, м, O–CH₂), 3.58–3.56 (2 H, м, O–CH₂-P), 2.89 (1 H, м, H_{a5}), 1.80 (1 H, м, H_{b5}), 1.33–1.29 (3 H, м, CH₃), 1.15–1.11 (3 H, м, CH₃). ³¹P-ЯМР (D₂O): 17.99 с.

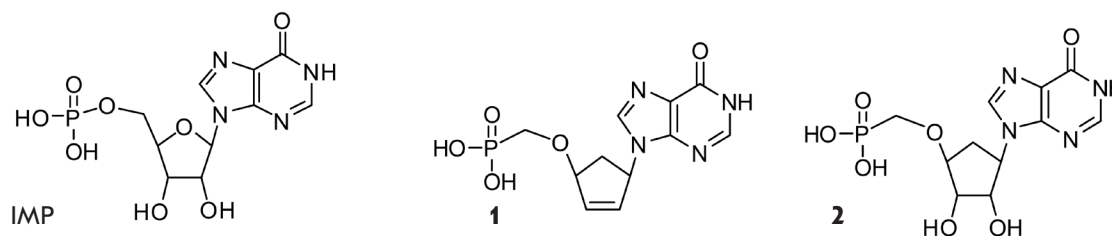


Рис. 1. Инозин-5'-монофосфат и его изостерные карбоциклические аналоги

6-Этокси-9-(4'-этилфосфонометокси-2',3'-дигидроксициклопент-1'-ил)пурин (6)

К суспензии фосфоната **5** (200 мг, 0.54 ммоль) в смеси растворителей диоксан-вода (10 : 1) добавляли 0.5 М раствор тетраоксида осмия в диоксане и *N*-метилморфолиноксид (0.3 мл, 3 ммоль). Раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали посредством ТСХ (система Г). Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с DEAE-Toyopearl, элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0–0.3 М) и далее на колонке с обращенно-фазовым силикагелем Lichroprep RP-18, элюировали водой. Выход продукта составил 74%. УФ-спектры (H_2O , pH 7) λ_{max} 252.0 нм (ϵ 9600). ^1H -ЯМР (D_2O): 8.36 (1 H, с, H_2), 8.29 (1 H, с, H_8), 4.85 (1 H, м, H_1), 4.23 (1 H, м, H_4), 3.92–3.89 (2 H, м, $\text{O}-\text{CH}_2$), 3.73 (2 H, м, $\text{O}-\text{CH}_2$), 3.60–3.59 (2 H, м, $\text{O}-\text{CH}_2$ -P), 2.88–2.85 (1 H, м, H_{a5}), 2.10 (1 H, м, H_{b5}), 1.37 (3 H, м, CH_3), 1.21 (3 H, м, CH_3). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 18.23 с.

9-(4'-Фосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)-гипоксантин (1)

К суспензии фосфоната **5** (100 мг, 0.27 ммоль) в ДМФА при перемешивании в токе аргона добавляли триметилбромсилан (0.65 мл, 5 ммоль), и полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система В). Реакционную смесь нейтрализовали 25% водным аммиаком, растворитель удаляли в вакууме, остаток очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichroprep RP-18, элюировали водой. Выделили 70 мг (84%) продукта **1** в виде лиофилизата. ^1H -ЯМР (D_2O): 8.39 (1 H, с, H_2), 8.26 (1 H, с, H_8), 6.44–6.42 (1 H, м, H_2), 6.18–6.17 (1 H, м, H_8), 5.57–5.55 (1 H, м, H_1), 4.81 (1 H, м, H_4), 3.61 (2 H, м, $\text{O}-\text{CH}_2$ -P), 3.04 (1 H, м, H_{a5}), 1.93 (1 H, м, H_{b5}). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 16.66 с.

9-(4'-Фосфонометокси-2',3'-дигидроксициклопент-1'-ил)гипоксантин (2)

Соединение **2** получали аналогично соединению **1**, исходя из соединения **6** (140 мг, 0.35 ммоль). Выделили 105 мг (81%) продукта в виде лиофилизата. УФ-спектры (H_2O , pH 7) λ_{max} 251.0 нм (ϵ 9300). ^1H -ЯМР (D_2O): 8.27 (1 H, с, H_2), 8.11 (1 H, с, H_8), 4.20 (1 H, м, H_1), 3.93 (1 H, м, H_4), 3.53–3.51 (2 H, м, $\text{O}-\text{CH}_2$ -P), 2.81 (1 H, м, H_{a5}), 2.07 (1 H, м, H_{b5}). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 14.06 с.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Эксперименты по изучению способности синтезированных соединений ингибировать IMPDH II человека проводила компания «NovoCib» (Франция). Соединения **1** и **2** исследовали в тестах с рекомбинантной IMPDH II человека (~0.0003 единиц актив-

ности на лунку) при 37°C в 200 мкл буфера (KH_2PO_4 0.1 М, pH 7.8, NAD 250 мкМ, DTT 2 мМ) на 96-луночном планшете. Реакция начиналась с добавления субстрата, IMP, в концентрации 250 мкМ. До начала реакции соединения инкубировали в буфере с IMPDH II в течение 5 мин. Поглощение измеряли при 340 нм, на приборе iEMS Reader MF («Labsystems», Финляндия). В качестве положительного контроля использовали рибавирин. Влияние синтезированных соединений на активность IMPDH II человека тестировали одновременно в двух аналогичных экспериментах.

Противотуберкулезная активность

Препараты испытывали на чувствительном к противотуберкулезным препаратам лабораторном штамме *M. tuberculosis* H37Rv. Микобактерии были переведены в суспензию одиночных клеток в одинаковой фазе роста и стандартизованы по КОЕ [5]. Использовали обогащенную жидкую питательную среду Дюбо («Difco»).

Оценка эффективности препаратов

Влияние препаратов на рост штамма микобактерий изучали с помощью автоматической системы детекции роста Bactec MGIT 960 («BD», США). Суспензию микобактерий (500 мкл) инокулировали в 7.9 мл питательной среды. Конечная концентрация *M. tuberculosis* в образце составляла 10^6 КОЕ/мл. Анализировали по три повторности каждой пробы (концентрации), включая контрольные пробы без препарата. Антимикобактериальное действие препаратов оценивали методом пропорций в формате TB Exist [6]. При тестировании этим методом сравнивают рост микобактерий, культивируемых с анализируемым препаратом, и рост контрольной культуры, разведенной в 100 раз по сравнению с опытной. Культура считается чувствительной (а соединение действующим) к такой концентрации препарата, при которой показатели роста в опыте не превышали 100 относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) при достижении 400 ОЕФ в контроле. Кроме того, методом абсолютных концентраций оценивали влияние соединений в концентрациях, меньших минимальной ингибирующей концентрации (МИК) на жизнеспособность микобактерий, по задержке роста культуры по сравнению с контролем. Рост культуры определяли автоматически с интервалом 1 ч, регистрировали с помощью программного обеспечения Epicenter («BD», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За последние десятилетия карбоциклические нуклеозиды стали объектом интенсивного изучения. Оказалось, что они обладают биологической активностью, в частности противовирусной и противоопухолевой

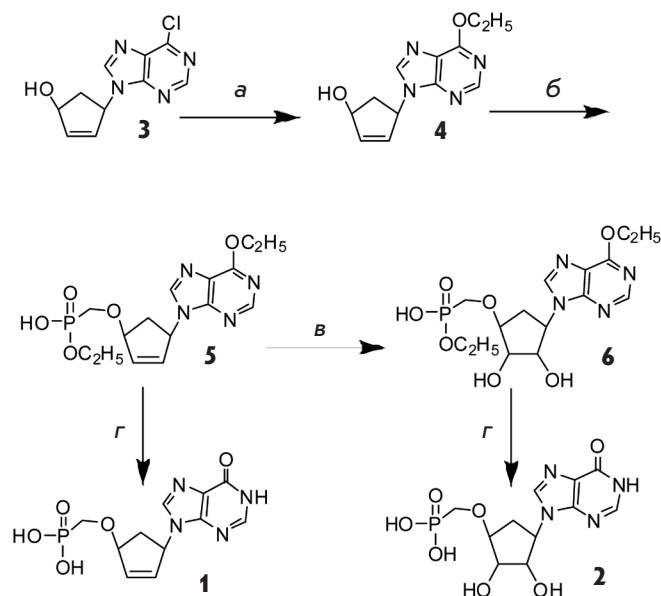


Схема. а – Этанол (абс.), K_2CO_3 , кипячение 1 ч;
 б – NaH, $TosOCH_2P(O)(OC_2H_5)OH$, Cs_2CO_3 , ДМФА;
 в – OsO_4 , NMMO, диоксан; г – $(CH_3)_3SiBr$, ДМФА

[7]. Такие нуклеозиды узнаются многими ферментами и рецепторам, поскольку их структура сходна со структурой природных нуклеозидов, и при этом обладают повышенной стабильностью к расщеплению C–N-связи фосфорилазами и гидролазами.

В качестве карбоциклического фрагмента в соединениях **1** и **2** используется гидроксциклопентен. Аналоги с этим фрагментом называются 5'-норкарбоциклическими нуклеозидами. Замена первичного 5'-гидроксильного остатка на вторичный 4'-гидроксил приводит к понижению токсичности за счет потери субстратных свойств по отношению к клеточным киназам. Принимая во внимание невозможность внутриклеточного фосфорилирования 5'-норкарбоциклических нуклеозидов, мы синтезировали метиленфосфонаты 9-(4'-гидроксициклопентен-1'-ил)гипоксантина и 9-(4',2',3'-тригидроксициклопент-1'-ил)гипоксантина (схема). Ранее было показано, что изостерные фосфонаты такого типа имитируют соответствующие монофосфаты, но существенно более устойчивы к действию гидролизующих и дефосфорилирующих ферментов [8].

9-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-хлорпурин **3** получали конденсацией эпоксициклопентена и 6-хлорпурина по ранее описанной методике [4]. Кипячение в этаноле соединения **3** приводило к образованию эфира **4**, из которого реакцией с этиловыми эфирами тозилосиметилфосфоновой или йодметил-

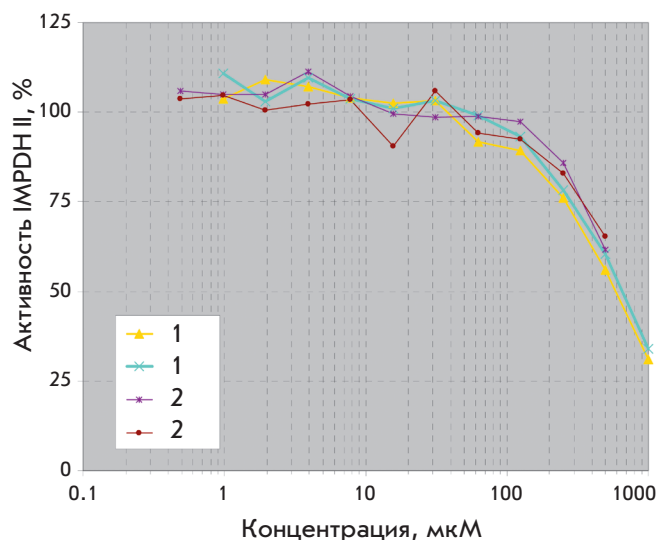


Рис. 2. Ингибирование активности IMPDH II в зависимости от концентрации соединений **1** и **2**

фосфоновой кислот получали соединение **5**. Эфир **5** гидролизовали до 9-(4'-фосфонилметиленокси-2'-циклопентен-1'-ил)гипоксантина **1** избытком триметилбромсилана. Для получения монофосфоната **2** двойную связь соединения **5** окисляли тетраоксидом осмия в присутствии N-метилморфолиноксида, а затем удаляли этильные группы соединения **6** в присутствии триметилбромсилана (схема). Целевые продукты **1** и **2** очищали при помощи колоночной хроматографии на ионообменной смоле DEAE-Toyorearl в линейном градиенте концентраций NH_4HCO_3 . Последующую очистку от солей осуществляли на обращенно-фазовом силикагеле LiChroprep RP-18. Выход составил 84 и 81% соответственно.

Соединения **1** и **2** были проверены в качестве ингибиторов IMPDH II человека (рис. 2).

Как видно из рис. 2, карбоциклический аналог **1** в концентрации 500 мкМ подавлял активность фермента на 50% (K_i 474 мкМ), а соединение **2** на 35–39% (K_i 975 мкМ). В качестве контроля использовали монофосфат рибавирина, который ингибировал активность фермента на 50% в концентрации 2 мкМ, величина K_m природного субстрата IMP в данной системе составила 124.4 мкМ.

Также изучена способность монофосфонатов **1** и **2** ингибировать рост *M. tuberculosis*. Рост культуры *M. tuberculosis* H37Rv под действием соединений **1** и **2** в концентрации 2–100 мкг/мл (5–320 мкМ) был таким же, как в контроле – начало роста культур зафиксировано на 7-й день, выход в стационарную фазу роста – на 17-й. Время активного деления культуры – 10 сут. Соединение **2** лишь в концентрации

200 мкг/мл (578 мкМ) приводило к несущественной (на 2 сут) задержке начала роста культуры по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированные 9-(4'-фосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)гипоксантин и 9-(4'-фосфонометокси-2',3'-дигидроксициклопент-1'-ил)гипоксантин являются слабыми ингибиторами IMPDH II человека. В концентрации 20–200 мкг/мл эти соединения практически не влияют на рост культуры *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*, что может быть связано как с трудностью их проникновения в микобактериальную клетку из-за особенностей строения ее клеточной стенки, так и с наличием у микобактерий альтернативных

путей синтеза, необходимых для жизнедеятельности соединений. Нельзя также исключить, что IMPDH *M. tuberculosis* менее чувствительна к тестируемым соединениям, чем IMPDH II человека. ●

Авторы благодарят Л. Балакиреву и Н. Годарда из компании «NovoCib» (Франция, Лион) за биологические испытания синтезированных соединений с рекомбинантной IMPDH II человека.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 11-04-12035-офи-м, 11-04-00603) и Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nair V., Shu Q. // *Antiviral. Chem. Chemotherapy*. 2007. V. 18. P. 245–258.
2. Shu Q., Nair V. // *Med. Res. Rev.* 2008. V. 28. № 2. P. 219–232.
3. Usha V., Hobrath J.V., Gurcha S.S., Reynolds R.C., Besra G.S. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e33886.
4. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Shipitsin A.V., Karpenko I.L., Belanov E.F., Kukhanova M.K., Yasko M.V. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2006. V. 71. P. 1107–1121.
5. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларио-

- нова Е.Е., Кузьмин А.В. // *Пробл. туберкулеза и болезни легких*. 2006. № 12. С. 43–48.
6. Siddiqi S.H., Rusch-Gerdes S. *MGIT procedure manual for Bactec MGIT 960 TB system*. Foundation for Innovative New Diagnostics, Geneva, Switzerland, 2006.
7. Matyugina E.S., Khandazhinskaya A.L., Kochetkov S.N. // *Russian Chemical Reviews*. 2012. V. 81. № 8. P. 729–746.
8. Wu T., Froeyen M., Kempeneers V., Pannecouque C., Wang J., Busson R., De Clercq E., Herdewijn P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. № 14. P. 5056–5065.