

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 54.057+543.42+547.854+547.874

БОЖОК
ТАТЬЯНА СТАНИСЛАВОВНА

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА 2'(3')-ФТОРЗАМЕЩЕННЫХ
ПИРИМИДИНОВЫХ D-НУКЛЕОЗИДОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.03 – органическая химия

Минск, 2017

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель:

Калиниченко Елена Николаевна,
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор химических наук, зам. директора Института биоорганической химии НАН Беларуси по научной и инновационной работе – начальник НПЦ «ХимФармСинтез»

Официальные оппоненты:

Королева Елена Вадимовна,
доктор химических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории биополимерных капсулированных структур Института химии новых материалов НАН Беларуси

Пашковский Феликс Сигизмундович,
кандидат химических наук, заведующий лабораторией химии простагландинов Института биоорганической химии НАН Беларуси

Оппонирующая организация:

Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»

Защита состоится «21» ноября 2017 г. в 10.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, зал заседаний Ученого Совета, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел. 8 (017) 267-85-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «20» октября 2017 г.

Ученый секретарь
Совета по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук



С.В. Бабицкая

ВВЕДЕНИЕ

Большая группа эффективных противовирусных и противоопухолевых лекарственных препаратов представлена структурными аналогами компонентов нуклеиновых кислот, в частности нуклеозидами. Основная идея создания лекарственных средств для химиотерапии инфекционных и опухолевых заболеваний на основе нуклеозидных аналогов заключается во внесении сравнительно небольших химических изменений в структуру молекулы физиологических метаболитов, в результате чего происходит блокирование важнейших биохимических реакций, происходящих в клетке. Механизм действия биологически активных модифицированных нуклеозидов основан на включении их в молекулы ДНК и РНК или ингибировании ферментов обмена нуклеиновых кислот, что приводит к гибели опухолевых клеток или вирусов.

Особенно большой прогресс в последние десятилетия достигнут в области создания эффективных лекарственных средств, содержащих атомы фтора. Введение атома фтора в биологически активные молекулы оказывает существенное влияние на физико-химические и биологические свойства таких соединений. Установлено, что фторсодержащие нуклеозиды отличаются хорошей растворимостью, высокой химической стабильностью, имеют улучшенные фармакокинетические свойства, менее токсичны по сравнению с аналогами.

Анализ последних достижений по поиску терапевтически значимых нуклеозидов, указывает, что разработка методов получения новых 2'(3')-фторсодержащих нуклеозидных аналогов и их структурная модификация, а также установление зависимостей «структура-свойства» синтезированных соединений остается актуальным направлением исследований в плане поиска эффективных антиметаболитов с целью создания химиопрепаратов для лечения онкологических и вирусных заболеваний.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами. Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг. (раздел 2 «Супрамолекулярная химия, химический синтез новых веществ и материалов с заданной структурой, функциональными и физико-химическими свойствами. Новые химические продукты и технологии», пункт 2.2 «Биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты»). Диссертационная работа является частью плановых исследований лаборатории химии нуклеотидов и полинуклеотидов Института биоорганической химии НАН Беларуси,

выполненных в рамках ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» (2011-2015 гг.), подпрограмма «Химфармсинтез», задание 2.19 «Разработка методов синтеза биологически значимых пентафурано-фторнуклеозидов D- и L-ряда, их новых структурных аналогов с химиотерапевтическим потенциалом» (№ ГР 20114750), ГПНИ «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал» (2011-2015 гг.), подпрограмма «Химфармсинтез», задание 4.20 (2014-2015 гг.) «Разработка химических и биотехнологических методов синтеза биологически значимых, модифицированных в углеводном фрагменте нуклеозидных аналогов азапиримидинов и производных пуринов, их конъюгатов с фосфолипидами для создания лекарственных препаратов» (№ ГР 20141727), гранта на выполнение научно-исследовательских работ докторантами и аспирантами Национальной академии наук Беларуси на 2013 г. «Синтез и биологические свойства C(3')-α- и C(2')-β-фторзамещенных D- и L-нуклеозидов» (№ ГР 20132237), Государственной программы по развитию импортозамещающих производств фармацевтических субстанций, готовых лекарственных и диагностических средств в Республике Беларусь на 2010-2014 гг. и на период до 2020 г., подпрограмма «Фармсубстанции и готовые лекарственные средства», задание Ф55 «Разработать опытно-промышленную технологию производства противолейкозного препарата Азациитидин и внедрить ее на опытно-экспериментальном участке ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (№ ГР 20114750).

Цель и задачи исследования. Целью работы являлась разработка методов синтеза новых 2'(3')-фторзамещенных пиримидиновых D-нуклеозидов, модифицированных по гетероциклическому основанию, а также исследование физико-химических свойств синтезированных нуклеозидов.

Обозначенная цель требовала решения следующих задач:

- разработать методы синтеза 1-(β-D-рибофуранозил)-6-фтортимина и его аналогов с атомом фтора в C(3')-положении углеводного фрагмента;
- разработать методы синтеза 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил нуклеозидов 6-замещенного тимина;
- разработать методы синтеза 2'(3')-фтордезоксинуклеозидов 6-азатимина и 5-метил-6-азацитозина;
- разработать методы синтеза 5-азациитидина и его 2'(3')-фторсодержащих аналогов, изучить их гидролитическую стабильность;
- оценить биологическую активность синтезированных нуклеозидов, выявить наиболее перспективные соединения для углубленных испытаний и практического использования в качестве химиотерапевтических средств.

Объектом исследования являлись пиримидиновые D-нуклеозиды, модифицированные в углеводной и (или) гетероциклической части молекулы.

Предметом исследования являлись методы конвергентного синтеза, направленные на получение новых практически значимых нуклеозидных аналогов.

Научная новизна. Впервые установлены закономерности протекания реакции N-гликозилирования 2,4-бис-О-(триметилсилил)-6-фтортимина перацильными производными D-рибозы в зависимости от температуры, способа силилирования гетероциклического основания, структуры и аномерной конфигурации гликозилирующего агента.

Разработаны методы синтеза 1-(β-D-рибофуранозил)-6-фтортимина и его новых 2'(3')-фтордезоксипродериватов, позволяющие получать целевые нуклеозиды без побочной реакции замещения атома фтора в С(6)-положении гетероцикла на нуклеофил.

Впервые обнаружено образование пиримидиновых 6,2'-О-α-D-ангидро-нуклеозидов путем реакции внутримолекулярной циклизации при деблокировании бензоилированных N(1)-α-нуклеозидов 6-фтортимина в щелочных условиях.

Синтезирован ряд новых 2'(3')-фторсодержащих нуклеозидных аналогов 6-азатимина, 5-метил-6-азацитозина и 5-азацитозина с использованием производных С(2)-α- и С(3)-β-фтордеокси-D-пентафураноз в качестве универсальных гликозилирующих агентов.

Впервые получены экспериментальные свидетельства влияния структурно-конформационных особенностей 2'(3')-фтор- и 5'-дезоксинуклеозидов 5-азацитозина на скорость их гидролиза при различных значениях рН.

Обнаружен новый 2'-фторсодержащий аналог 5-азацитидина, проявляющий 9-10 кратное усиление специфического цитотоксического эффекта по сравнению с известным препаратом азацитидином при наличии более высокой гидролитической стабильности, что делает его перспективным для дальнейших биологических исследований *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Региоспецифичный, стереоселективный метод синтеза 1-(β-D-рибофуранозил)-6-фтортимина и его новых 3'-фтордезоксипродериватов путем N-гликозилирования 2,4-бис-О-(триметилсилил)-6-фтортимина перацильными производными D-рибозы и установление закономерностей протекания данной реакции в зависимости от температуры, способа силилирования гетероциклического основания, структуры и аномерной конфигурации гликозилирующего агента.

2. Эффективный способ удаления бензоильных групп в углеводном фрагменте блокированных β-нуклеозидов 6-фтортимина с помощью гидроксида лития в смеси ацетонитрил-вода, приводящий в случае дебензоилирования α-нуклеозидов данного ряда к образованию ранее не описанных 6,2'-О-α-D-ангидронуклеозидов.

3. Метод синтеза ранее неизвестных 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-D-арабинонуклеозидов 6-замещенного тимина путем N-гликозилирования 2,4-бис-O-(триметилсилил)-6-фтортимина 1- α -бромпроизводным 2-дезоксидезокси-2'-фтор-D-арабинофуранозы и дебензоилирования промежуточных β/α -нуклеозидов 6-фтортимина в присутствии нуклеофильного агента.

4. Использование производных C(2)- α - и C(3)- β -фтордезоксидезокси-D-пентафураноз в качестве универсальных гликозилирующих агентов в синтезе 2'(3')-фторсодержащих нуклеозидных аналогов 6-азатимина, 5-метил-6-азацитозина и 5-азацитозина, что позволило получить ряд новых азапиримидиновых нуклеозидов с высокими выходами, в том числе, нуклеозиды обладающие высокой биологической активностью.

5. Установление взаимосвязи структурно-конформационных особенностей и кинетических характеристик реакции гидролиза 2'(3')-фтор- и 5'-дезоксинуклеозидов 5-азацитозина при различных значениях pH, что позволило выявить новый 2'-фтордезоксинуклеозидный аналог 5-азацитозина, обладающий высокой гидролитической стабильностью.

Личный вклад соискателя ученой степени заключается в проведении экспериментальной части работы, разработке методик, установлении структуры полученных соединений, анализе полученных данных, поиске, систематизации и анализе научной и патентной литературы по теме диссертации. Постановка цели и задач исследования, интерпретация результатов, подготовка материалов для научных публикаций осуществлялись совместно с чл.-корр. НАН Беларуси, д.х.н. Е.Н. Калиниченко. При выполнении работы соискатель пользовался консультационной помощью д.х.н. Г.Г. Сивца. Соавторы работ, представленных в списке публикаций соискателя, участвовали в проведении отдельных экспериментов и обсуждении результатов. Исследование биологической активности полученных соединений проводилось совместно с сотрудниками лаборатории биоиспытаний (д.м.н., проф. Б.Б. Кузьмицкий, к.б.н. М.Б. Голубева). Анализ спектров ЯМР выполнен в соавторстве с к.х.н. А.В. Барановским.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Материалы диссертационной работы представлены в виде докладов на 9-ой Всероссийской конференции «Химия фтора» (Москва, Россия, 2012), Всероссийской школе-конференции «Химия биологически активных веществ» («ХимБиоАктив-2012») (Саратов, Россия, 2012), IV и V Международных научных конференциях «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, Республика Беларусь, 2012, 2014), Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, Республика Беларусь, 2013), 14th Tetrahedron Symposium «Challenges in Organic & Bioorganic Chemistry» (Wien, Austria, 2013), Международной научно-практической конференции

«Белорусские лекарства» (Минск, Республика Беларусь, 2014), Drug Discovery Conference (Riga, Latvia, 2015).

Опубликование результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ: 6 статей в рецензируемых научных журналах, в том числе 2 – в иностранных научных изданиях; 2 статьи в сборниках конференций; тезисы 7 докладов международных конференций и 2 заявки на патент Республики Беларусь. Общий объем опубликованных работ составил 7,0 авторских листов (из них 4,5 авторских листа – статьи в рецензируемых журналах).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из оглавления, перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, трёх глав, заключения, библиографического списка и приложения. В первой главе приводится обзор литературных данных по синтезу и биологическим свойствам модифицированных пиримидиновых D-нуклеозидов. Вторая глава посвящена обсуждению результатов собственных исследований. Третья глава содержит экспериментальные данные. Диссертация изложена на 136 страницах, содержит 13 рисунков, 68 схем, 7 таблиц и 1 приложение. Список использованных источников включает 158 ссылок на цитируемую литературу на 12 страницах.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. Синтез и биологические свойства модифицированных пиримидиновых D-нуклеозидов (обзор литературы)

В первой главе приведен обзор литературных данных по синтезу и биологическим свойствам 5(6)-аза- и 6-замещенных пиримидиновых D-нуклеозидов, выявлены нерешенные проблемы, определившие цели и задачи данного исследования.

Глава 2. Синтез и свойства биологически значимых пиримидиновых D-нуклеозидов и их 2'(3')-фторзамещенных аналогов (обсуждение результатов)

2.1 Получение универсальных гликозилирующих агентов

Синтез C(2)- α - и C(3)- β -фтордезоксид-D-пентафураноз – 1,3,5-три-O-бензоил-2-дезоксид-2-фтор- α -D-арабинофуранозы (**1**) и 1-O-ацетил-2,5-ди-O-бензоил-3-дезоксид-3-фтор- α,β -D-рибофуранозы (**2**) – для получения новых 2'(3')-фторсодержащих нуклеозидных аналогов – осуществлен с использованием известных методов, исходя из D-рибозы и D-ксилозы, соответственно (Схемы 1 и 2).

С целью получения универсального гликозилирующего агента в синтезе биологически значимых нуклеозидов нами разработан эффективный путь синтеза 1,2,3,5-тетра-O-бензоил- β -D-рибофуранозы (**7**) и ее α -аномера **8**, исходя из легкодоступной 1-O-ацетил-2,3,5-три-O-бензоил- β -D-рибофуранозы (**3**) (Схема 3).

Схема 1

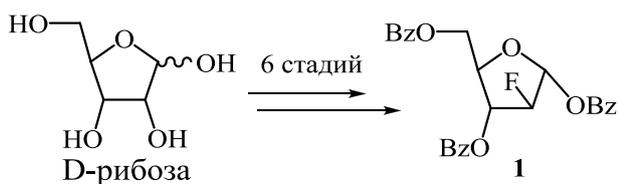
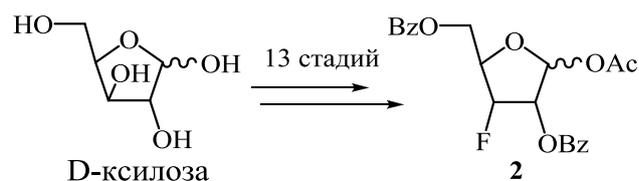
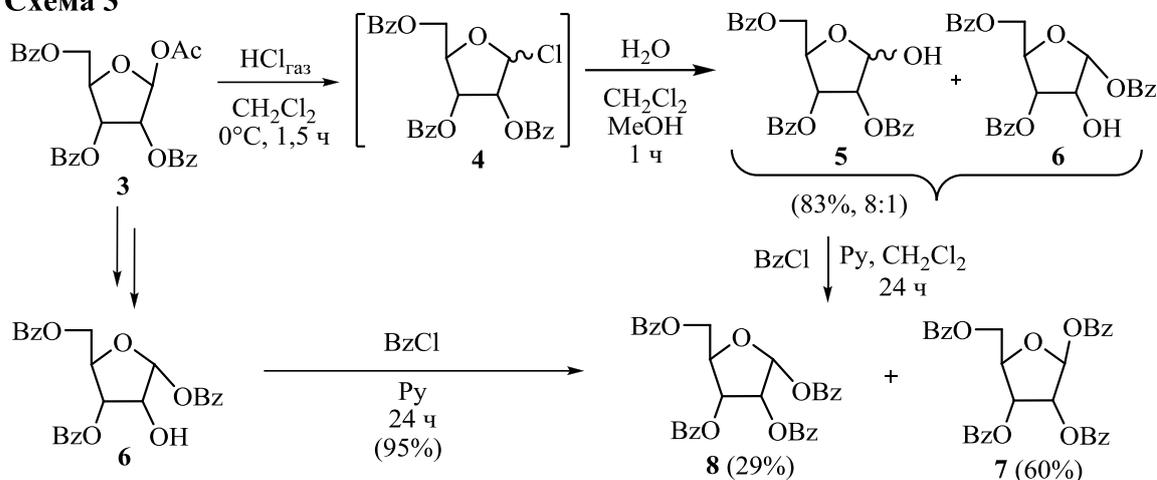


Схема 2



Обработка ацетата **3** газообразным HCl с последующим гидролизом промежуточного хлорсахара **4** давали смесь изомерных 2,3,5-три-О-бензоил- α,β - (**5**) и 1,3,5-три-О-бензоил- α - (**6**) D-рибозидов с выходом 83% в соотношении 8:1. Бензоилирование полученной смеси приводило к образованию пербензоильных производных D-рибозы **7** и **8**, которые успешно разделены колоночной хроматографией на силикагеле с выходами 60 и 29%, соответственно.

Схема 3



Для доказательства строения полученных аномеров осуществлен встречный синтез индивидуального α -тетрабензоата **8** через 1,3,5-три-О-бензоил- α -D-рибофуранозу (**6**) с использованием известной последовательности превращений, исходя из ацетата **3**. После стандартной процедуры бензоилирования получена 1,2,3,5-тетра-О-бензоил- α -D-рибофураноза (**8**) с выходом 95%.

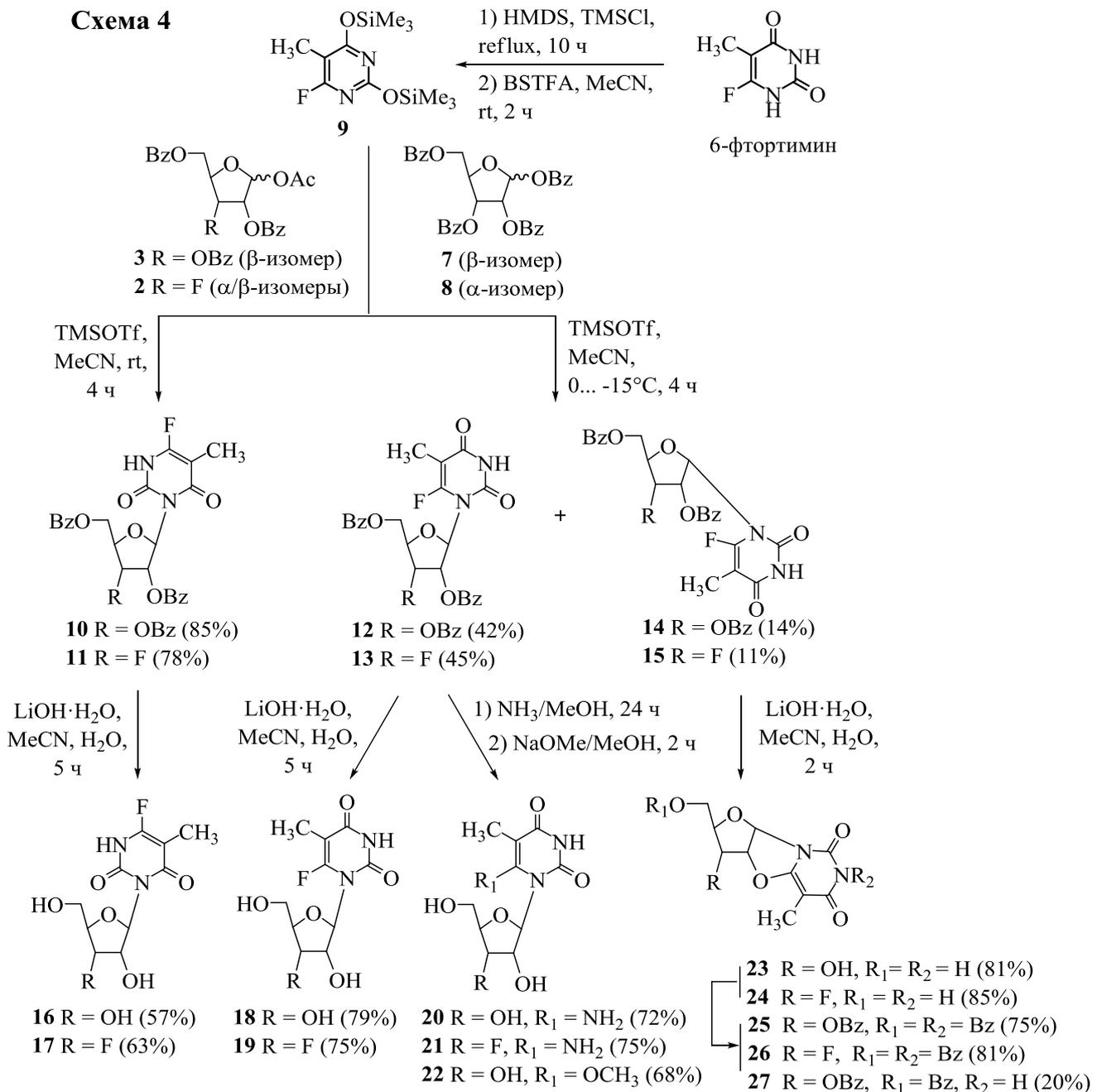
2.2 Синтез D-рибонуклеозидов 6-замещенного тимина и их 3'-фторсодержащих аналогов

В рамках данного исследования решены две основные задачи: 1) определить оптимальные условия реакции регио- и стереоселективного N-гликозилирования 2,4-бис-О-(триметилсилил)-6-фтортимина перацильными производными D-рибозы; 2) разработать эффективный способ удаления защитных групп бензоилированных нуклеозидов 6-фтортимина.

2.2.1 Регио- и стереоселективность N-гликозилирования 2,4-бис-О-(триметилсилил)-6-фтортимина перацильными производными D-рибозы в условиях реакции Форбрюггена

Синтез 1-(β -D-рибофуранозил)-6-фтортимина и его новых аналогов с атомом фтора в C(3')-положении углеводного фрагмента осуществлен с использованием

метода Форбрюггена, исходя из перацильных производных D-рибозы **2**, **3**, **7** и **8**, в присутствии триметилсилил трифторметансульфоната (TMSOTf) в качестве катализатора и последующим удалением защитных групп промежуточных нуклеозидов под действием нуклеофильного агента (Схема 4).



Результаты исследований влияния различных условий реакции N-гликозилирования 2,4-бис-О-(триметилсилил)-6-фтортимина (**9**) блокированными производными D-рибозы **2**, **3**, **7** и **8** на состав и выход продуктов представлены в Таблице 1. Установлено, что исход реакции гликозилирования 2,4-бис-О-(триметилсилил)-6-фтортимина перацильными производными D-рибозы, содержащими 2-α-ацилоксаместитель, существенно зависит от условий реакции,

а именно: температуры, способа силилирования гетерооснования, а также структуры и аномерной конфигурации гликозилирующего агента.

Конденсация силильного производного **9**, полученного обработкой 6-фтортимина в смеси гексаметилдисилазана (HMDS) и триметилхлорсилана (TMSCl), с ацетатом **3** или фторидом **2** в присутствии TMSOTf в ацетонитриле при комнатной температуре приводила к нежелательному образованию N(3)-нуклеозидных производных **10** (85%) или **11** (78%), соответственно, как единственных продуктов реакции гликозилирования (Таблица 1, эксперименты 1 и 5).

Конденсация силилированного основания **9** с производными D-рибозы **3** или **2** в аналогичных условиях, но при более низкой температуре (от 0°C до -15°C) давала целевые блокированные N(1)-β-рибонуклеозиды **12** (42%) или **13** (45%), соответственно (Таблица 1, эксперименты 2 и 6). Важно отметить, что при проведении реакции в этих условиях наряду с основным классическим продуктом конденсации – β-аномером происходило нехарактерное для реакции Форбрюггена образование α-аномеров блокированного рибозида 6-фтортимина **14** и его 3'-фтордезоксипродукта **15** (соотношение β:α – 3,0/3,7:1). Образование N(3)-изомерных производных **10** и **11** при низких температурах не наблюдалось.

Таблица 1. – Получение блокированных рибонуклеозидов 6-фтортимина из перацильных производных D-рибозы **2**, **3**, **7** и **8**

Эксперимент	Сахар	Условия силилирования 6-фтортимина	Условия конденсации ^а	Продукты реакции	Соотношение β/α ^б	Выход β-изомера (%) ^в
1	3	HMDS, TMSCl, reflux, 8 ч	TMSOTf, MeCN, rt, 4 ч	N(3)-β (10)	-	85
2	3	HMDS, TMSCl, reflux, 8 ч	TMSOTf, MeCN, 0°C → -15°C, 4 ч	N(1)-β/α (12/14)	3,0:1	42
3	3	BSTFA, MeCN, rt, 2 ч	TMSOTf, MeCN, 0°C → -15°C, 4 ч	N(1)-β/α (12/14)	2,2:1	53
4	3	BSTFA, MeCN, rt, 2 ч	TMSOTf, MeCN/(CH ₂ Cl) ₂ , 0°C → -15°C, 4 ч	N(1)-β/α (12/14)	3,2:1	55
5	2	HMDS, TMSCl, reflux, 8 ч	TMSOTf, MeCN, rt, 4 ч	N(3)-β (11)	-	78
6	2	HMDS, TMSCl, reflux, 8 ч	TMSOTf, MeCN, 0°C → -15°C, 4 ч	N(1)-β/α (13/15)	3,7:1	45
7	7	BSTFA, MeCN, rt, 2 ч	TMSOTf, MeCN, 0°C → -15°C, 4 ч	N(1)-β/α (12/14)	4,3:1	60
8	7	BSTFA, MeCN, rt, 2 ч	TMSOTf, MeCN/(CH ₂ Cl) ₂ , 0°C → -15°C, 4 ч	N(1)-β/α (12/14)	4,5:1	53
9	8	BSTFA, MeCN, rt, 2 ч	TMSOTf, MeCN, 0°C → -15°C, 4 ч	N(1)-β/α (12/14)	2,4:1	49

^{а)} Молярное соотношение сахар : пиримидиновое основание : TMSOTf – 1 : 1,2 : 1,1.

^{б)} Соотношение аномерной смеси определялось на основании данных ¹H ЯМР-спектроскопии в CDCl₃ после выделения с использованием колоночной хроматографии.

^{в)} Выход индивидуального блокированного β-рибонуклеозида после колоночной хроматографии.

С целью оптимизации условий конденсации силилированного основания **9** с ацилпроизводным **3** при низких температурах осуществлен ряд синтезов. Во-первых, процедуру силилирования 6-фтортимина проводили с использованием более эффективного силилирующего агента – N,O-бис(триметилсилил) трифторацетамида (BSTFA) (Таблица 1, эксперименты 3 и 4). В результате данных изменений блокированный N(1)- β -рибонуклеозид **12** выделен с выходом 53-55%, что несколько выше, чем в эксперименте 2. Во-вторых, в качестве гликозилирующих агентов в реакцию конденсации вводили β -тетрабензоат **7** и его α -аномер **8** (Таблица 1, эксперименты 7-9), в результате чего N(1)- β -рибонуклеозид **12** получен с выходами 49-60% после хроматографического выделения на силикагеле. Следует отметить, что наилучший выход N(1)- β -нуклеозида и хорошая стереоселективность реакции гликозилирования (соотношение β : α – 4,3/4,5:1) достигнуты при низких температурах с использованием β -тетрабензоата **7**.

2.2.2 Деблокирование β -рибозидов 6-фтортимина и внутримолекулярная циклизация α -аналогов

Стандартная процедура деблокирования индивидуальных бензоилированных нуклеозидов **12** и **13** аммиаком в метаноле или метилатом натрия в метаноле приводила к замещению атома фтора в 6-ом положении гетероцикла на нуклеофил с образованием N(1)- β -D-рибозидов 6-аминотимина **20**, **21** и 6-метокситимина **22**, соответственно, с выходами 68-75%.

Нами найдено, что деацилирование индивидуальных N(1)- β -нуклеозидов 6-фтортимина **12** и **13** под действием гидроксида лития в смеси ацетонитрил-вода приводило к целевым нуклеозидам 6-фтортимина **18** и **19** с высокими выходами (75-79%). Аналогичной обработкой рибонуклеозидов **10** и **11** получены их N(3)- β -аналоги **16** и **17** с выходами 57% и 63%, соответственно.

Дебензоилирование индивидуальных α -нуклеозидов 6-фтортимина **14** и **15** под действием гидроксида лития в смеси ацетонитрил-вода неожиданно давало 6,2'-O- α -D-ангидронуклеозиды **23** и **24** с высокими выходами (81-85%). Вероятно, образование ангидронуклеозидов **23** и **24** протекало в процессе удаления защитных групп в углеводном фрагменте нуклеозидов **14** и **15** в щелочных условиях в результате внутримолекулярной реакции замещения атома фтора при C(6)-атоме гетероцикла активированной гидроксигруппой при C(2')-атоме промежуточных деблокированных нуклеозидов.

2.2.3 Структурный анализ синтезированных соединений

Структура всех синтезированных соединений подтверждена методами ИК-, УФ-, ЯМР- (^1H , ^{13}C , ^{19}F), 2D ЯМР-, КД- и масс-спектрометрии.

2.2.3.1 *Регио- и стереоизомерное отнесение.* Детальное изучение полученных рибонуклеозидов 6-фтортимина с использованием спектральных методов анализа вызвано: 1) неожиданным образованием N(3)-производных;

2) нетипичным образованием N(1)- α -нуклеозидов; 3) получением ранее неизвестных 6,2'-O- α -D-ангидронуклеозидов.

Регио- и стереоизомерное строение N(1)- β/α , N(3)- β -рибонуклеозидных производных 6-фтортимина установлено с помощью данных УФ- и ЯМР-спектроскопии, включая 2D эксперимент. Обнаружено, что в УФ-спектрах N(3)-рибозидов 6-фтортимина **16** и **17** наблюдался значительный батохромный сдвиг максимумов (с 257 до 281 нм) не только при pH 13, что характерно для N(3)-нуклеозидов, но и при нейтральных значениях pH, вызванный, очевидно, наличием электроотрицательного атома фтора в 6-ом положении гетероцикла, который оказывает существенное влияние на степень ионизации N(1)-протона. Для N(1)-изомеров **18** и **19** при щелочном pH наблюдалось незначительное смещение максимума в длинноволновую область (с 255 до 258 нм).

При доказательстве β/α -конфигурации блокированных N(1)-производных **12-15** обнаружены следующие особенности. В ^{13}C ЯМР-спектрах β -нуклеозидов **12** и **13** наблюдалась константа спин-спинового взаимодействия (КССВ) через три связи между C(1')-атомом углеводной части и атомом фтора гетероцикла $^3J_{\text{C}1',\text{F}6}$ (4,8 Гц и 4,9 Гц, соответственно). Для α -изомеров **14** и **15** выявлена дальняя КССВ через шесть связей между C(4')-атомом и C(6)-атомом фтора $^6J_{\text{C}4',\text{F}6}$ (5,4 Гц и 3,8 Гц, соответственно) при отсутствии КССВ $^3J_{\text{C}1',\text{F}6}$ (Рисунок 1).

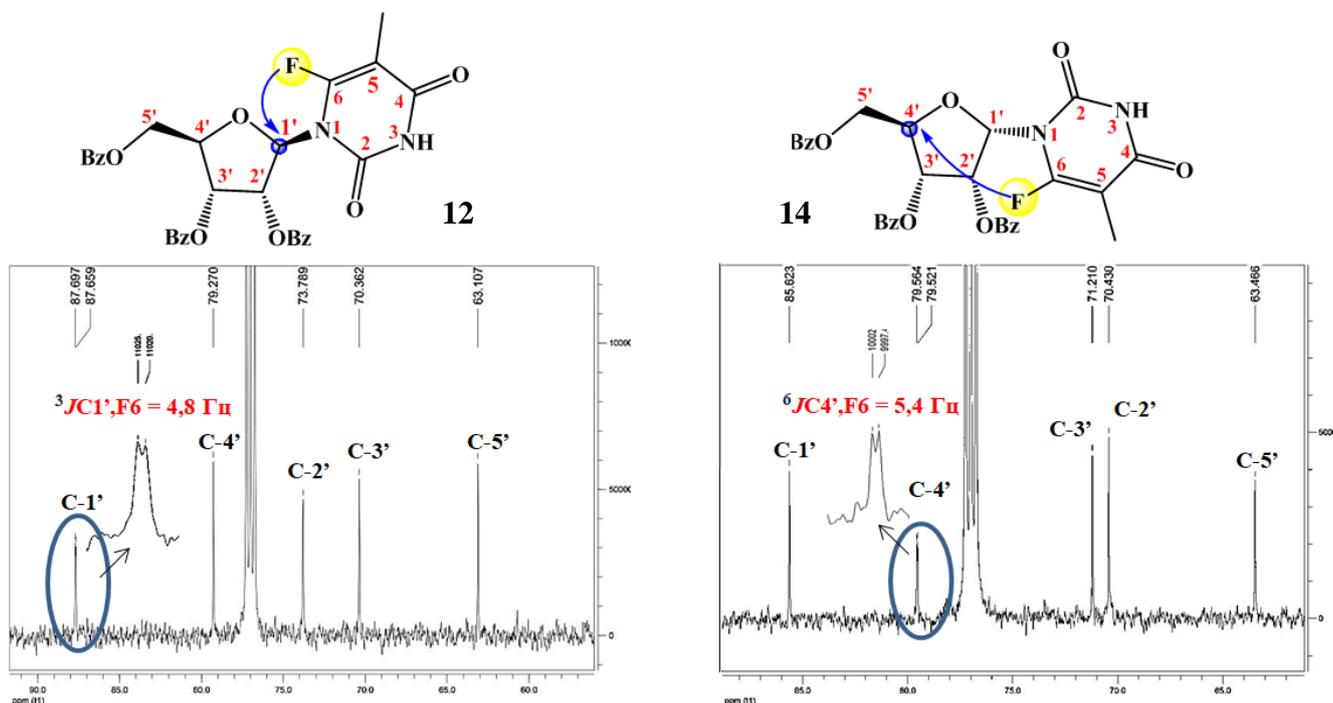


Рисунок 1. – Сигналы углеводной части в ^{13}C ЯМР-спектрах N(1)- β -рибозиды **12 и N(1)- α -рибозиды **14** в CDCl_3**

Следует отметить, что в ряду пиримидиновых фторнуклеозидов впервые обнаружено прямое ^{13}C - ^{19}F взаимодействие ядер «через пространство», а не «через

связи», которое вносит основной вклад в дальнюю, через шесть связей, константу спин-спинового взаимодействия (${}^6J_{C4',F6}$), что указывает на пространственное сближение атома фтора гетероцикла и C(4')-атома углеводной части N(1)- α -рибозидов.

2.2.3.2 *Циклизация.* Структура 6,2'-O- α -D-ангидронуклеозидов **23** и **24** доказана на основании данных ЯМР-спектроскопии, включая 2D эксперимент, а также сравнением их с таковыми для их бензоильных производных **25-27**, полученных обработкой соединений **23** и **24** хлористым бензоилом в пиридине.

Наиболее информативными особенностями в ПМР-спектрах новых α -циклонуклеозидов **23** и **24** являлись, во-первых, сдвиг резонансного сигнала H(2') в слабое поле на 0,85-0,87 м.д. по сравнению с аналогичными сигналами β -рибозидов **18** и **19**, во-вторых, отсутствие сигналов 2'-ОН группы при наличии соответствующих сигналов 3'-ОН и 5'-ОН групп для соединения **18** и 5'-ОН – для **19**, что однозначно указывало на присутствие 6,2'-ангидросвязи. Кроме того, в ${}^{19}\text{F}$ ЯМР-спектрах циклонуклеозидов **23** и **24** отсутствовал сигнал фтора при C(6)-атоме гетероцикла, а для 3'-фторциклонуклеозида **24** наблюдался только сигнал фтора при C(3')-атоме (дд, -212,65 м.д.).

В спектре NOESY у обоих циклонуклеозидов **23** и **24** наблюдались выраженные кросс-пики между H(1')- и H(2')-, H(3')-атомами. Взаимодействие между H(1')- и H(4')-протонами отсутствовало. Этот факт свидетельствует об α -конфигурации полученных соединений (Рисунок 2).

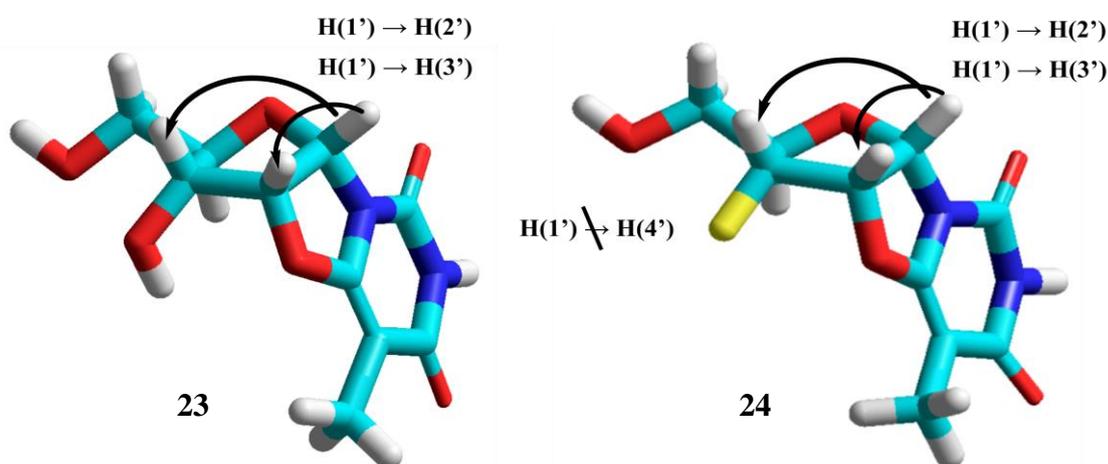


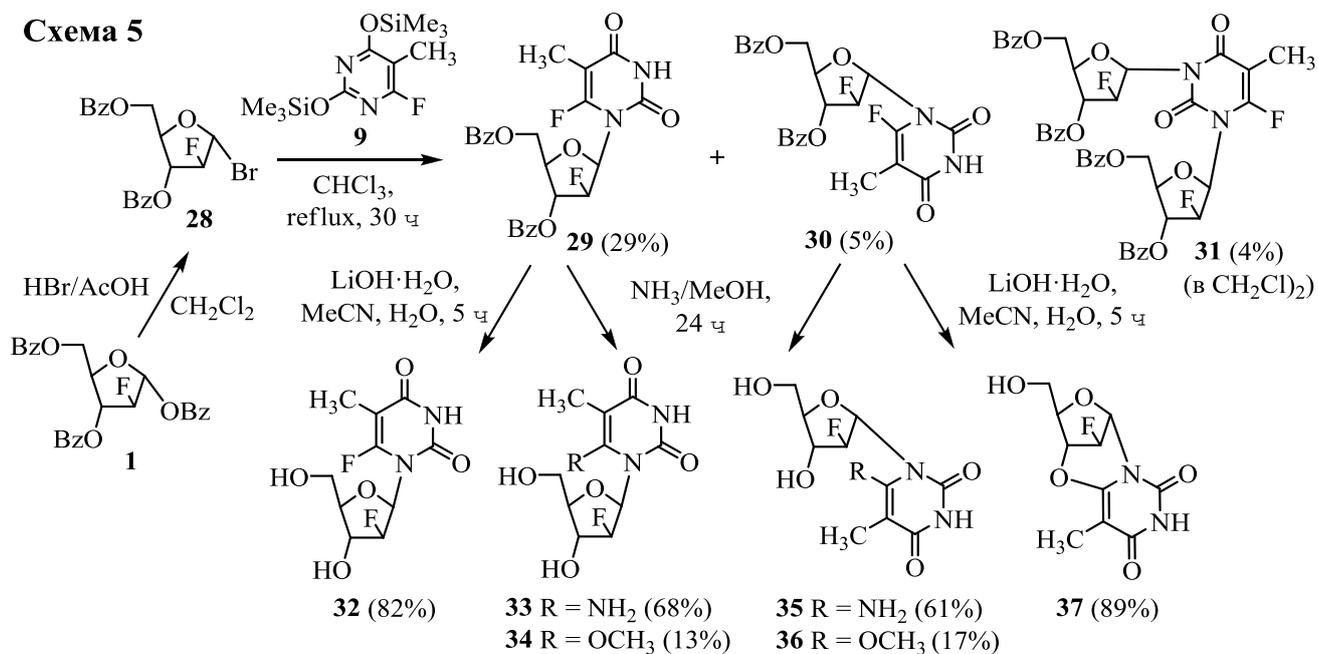
Рисунок 2. – Ключевые NOE-корреляции и трехмерный вид молекулы (HyperChem 8.0) 6,2'-O- α -D-ангидронуклеозидов **23** и **24**

Сравнение данных ПМР-спектра известного 6,2'-ангидро-1-(β -D-арабинофуранозил)-6-гидрокситимина с таковым для полученного нами α -ангидронуклеозида **23** позволило выявить ключевые различия в структуре рассматриваемых соединений, а именно: большую величину КССВ (9,3 Гц) между H(3')- и H(4')-протонами, наблюдаемую в спектре соединения **23**, в то время как в

спектре изомерного β -ангидронуклеозида данная константа не регистрировалась. Аналогичная тенденция прослеживалась для КССВ $J_{3',4'}$ 3'-дезоксиг-3'-фтор-6,2'-О- α -D-ангидронуклеозида **24**. Эти спектральные данные демонстрируют крайне напряженную конформацию новых α -циклонуклеозидов.

2.3 Синтез 2'-дезоксиг-2'-фтор-D-арабинонуклеозидов 6-замещенного тимина

Конвергентный синтез пиримидиновых 2'-фторарабинонуклеозидов 6-фтортимина осуществлен с использованием 1- α -бромсахара **28**, полученного из α -бензоата **1**. Конденсация бромсахара **28** с персилильным производным 6-фтортимина **9** при кипячении в хлороформе давала смесь блокированных N(1)- β/α -изомеров **29** и **30** в соотношении 6:1 с невысоким выходом (34%), которые разделены колоночной хроматографией на силикагеле (Схема 5). Проведение реакции в 1,2-дихлорэтане существенно снижало выход β -нуклеозида **29** (13%). В последнем случае наряду с классическими продуктами реакции в незначительном количестве (4%) выделено дипроизводное **31**.



Стандартная процедура деблокирования бензоилированных нуклеозидов **29** и **30** аммиаком в метаноле приводила к 2'-дезоксиг-2'-фтор- β/α -D-арабинозидам 6-амино- и 6-метокситимина **33-36**, которые выделены в индивидуальном состоянии колоночной хроматографией на силикагеле.

Обработка β -арабинозида **29** с помощью гидроксида лития в смеси ацетонитрил-вода приводила к целевому нуклеозиду **32** с высоким выходом (82%). Аналогичная щелочная обработка индивидуального блокированного α -нуклеозида **30** неожиданно давала 2'-фтор-6,3'- α -D-ангидронуклеозид **37** с выходом 89%.

Конфигурация аномерных центров арабинонуклеозидов 6-фтортимина **29** и **30** подтверждена данными ЯМР-спектроскопии, включая 2D эксперимент.

Следует отметить наличие в ^{13}C ЯМР-спектре β -нуклеозида **29** дальнейшей КССВ через пять связей между углеродом $\text{C}(3')$ углеводной части и атомом фтора гетероцикла ($^5J_{\text{C}3',\text{F}6} = 3,9$ Гц), а для α -изомера **30** КССВ через три связи между $\text{C}(1')$ и $\text{F}(6)$ ($^3J_{\text{C}1',\text{F}6} = 8,1$ Гц), что свидетельствует о присоединении 2-дезоксид-2-фтор-D-арабинофуранозы к $\text{N}(1)$ -атому 6-фтортимина в обоих продуктах конденсации. Выявлены дальнейшие КССВ (25-29 Гц) в ^{19}F ЯМР-спектрах β -фтордезоксинуклеозидов 6-фтортимина **29** и **32** между $\text{C}(6)$ -атомом фтора гетерооснования и $\text{C}(2')$ -атомом фтора углеводной части, при отсутствии таковых для α -изомера **30** (Рисунок 3).

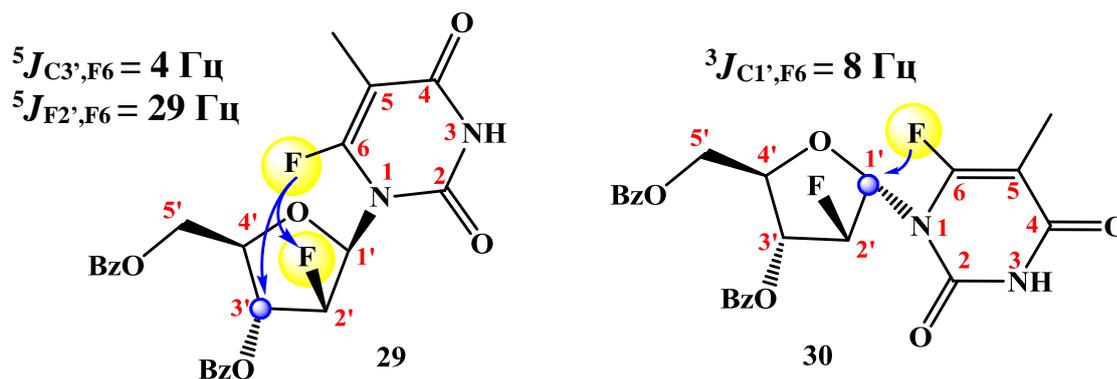


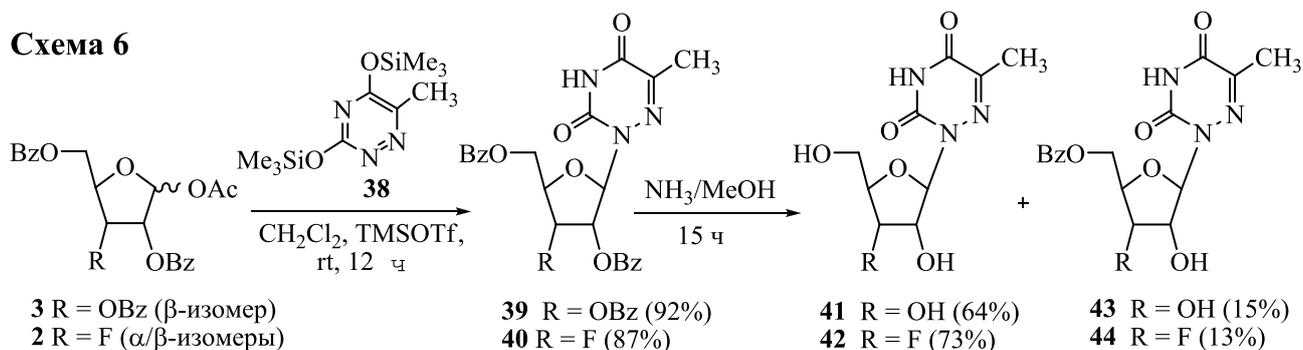
Рисунок 3. – КССВ в ^{13}C ЯМР-спектрах β -арабинозида **29** и его α -аномера **30** в CDCl_3

Дальнейшим подтверждением аномерной конфигурации 2'-дезоксид-2'-фтор-D-арабинонуклеозидов 6-замещенного тимина **32-36** и структуры α -циклонуклеозида **37** являются данные КД-спектроскопии. В КД-спектре α -аномеров **35** и **36** наблюдался отрицательный эффект Коттона при 265-268 нм, тогда как в спектрах β -аномеров **33** и **34** присутствовал характерный в таких случаях положительный максимум при 260-268 нм. Яркий выраженный положительный эффект Коттона при 260 нм (полоса $\text{V}_{2\text{u}}$) с аномально большим значением амплитуды ($\theta = 8,7 \times 10^3$) в КД-спектре 6,3'- α -циклонуклеозида **37** обусловлен жесткой конформацией полученного нуклеозида и изменением электронной структуры модифицированного пиримидинового основания в сравнении с β -арабинонуклеозидом 6-фтортимина **32**.

2.4 Синтез 6-азапиримидиновых 2'(3')-фтордезоксинуклеозидов

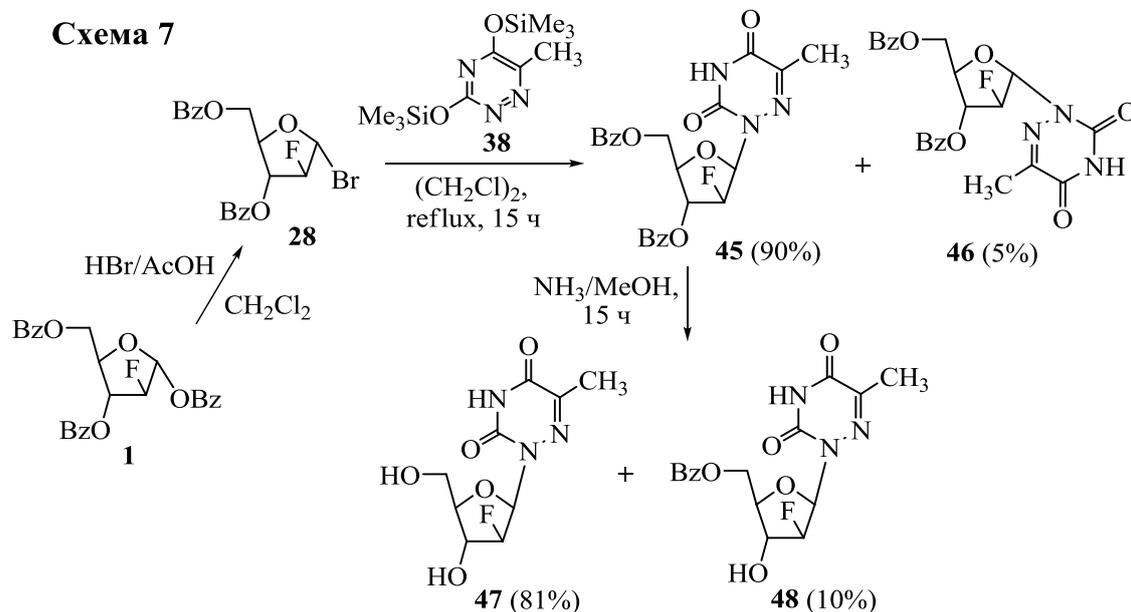
Целевые D-рибонуклеозиды **41** и **42** получены путем реакции конденсации 2,4-бис-O-триметилсилильного производного 6-азатимина **38** и перацильных производных D-рибозы **3** и 3-дезоксид-3-фтор-D-рибозы **2** по методу Форбрюггена в присутствии TMSOTf в хлористом метиле при комнатной температуре с образованием исключительно бензоилированных $\text{N}(1)$ - β -нуклеозидов **39** и **40** с выходами 92% и 87%, соответственно, после колоночной хроматографии (Схема 6).

Схема 6



1-(β -D-Рибофуранозил)-6-азатимин (**41**) и его новый 3'-фтордезоксипродукт **42** получены дебензоилированием промежуточных соединений **39** и **40** аммиаком в метаноле с выходами 64 и 73%, соответственно. Следует отметить, что наряду с основными продуктами реакции деблокирования выделены их 5'-О-бензоильные производные **43** и **44** (13-15%), выход которых существенно не изменялся с увеличением продолжительности реакции.

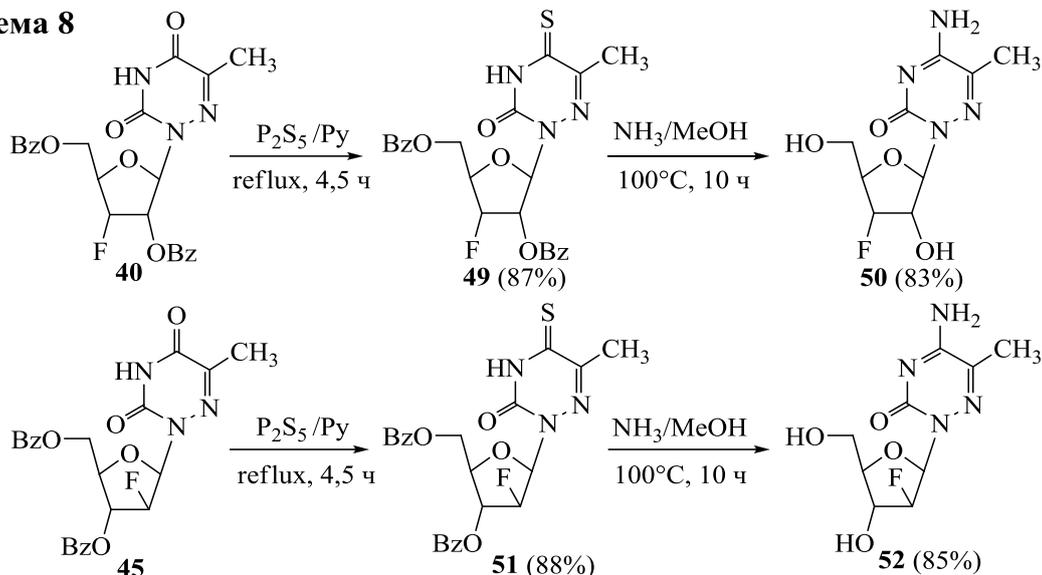
Конвергентный синтез C(2')- β/α -фторзамещенных нуклеозидов **45** и **46** осуществлен с использованием 1- α -бромсахара **28**, конденсация которого с триметилсилильным производным 6-азатимина **38** при кипячении в 1,2-дихлорэтане давала смесь блокированных N(1)- β/α -изомеров **45** и **46** в соотношении 18:1 с высоким выходом (95%), которые удалось разделить колоночной хроматографией на силикагеле (Схема 7).



Дебензоилирование β -арабинозида **45** аммиаком в метаноле приводило к целевому 1-(2-деокси-2-фтор- β -D-арабинофуранозил)-6-азатимину (**47**) и его 5'-О-бензоильному производному **48** с выходами 81 и 10%, соответственно.

С целью получения 2'(3')-фторнуклеозидов 5-метил-6-азацитозина **50** и **52** исследован подход превращения урацильного фрагмента нуклеозидов в цитозинный через образование промежуточных 4-тиопродуктов (Схема 8).

Схема 8



Обработка дибензоильных производных **40** и **45** пентасульфидом фосфора при кипячении в пиридине приводила к образованию 1-(3,5-ди-О-бензоил-3-дезоксидеокси-3-фтор- β -D-рибофуранозил)-4-тио-6-азатимина (**49**) и соответствующего 2'-фторарабиноаналога **51**, последующий аммонолиз и деацилирование которых давали целевые 1-(3-дезоксидеокси-3-фтор- β -D-рибофуранозил)-5-метил-6-азацитозин (**50**) и 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор- β -D-арабинофуранозил)-5-метил-6-азацитозин (**52**) с высокими суммарными выходами (72-74%).

2.5 Синтез и гидролитическая стабильность 5-азацитидина и его 2'(3')-фторсодержащих аналогов

Азацитидин – известный противоопухолевый препарат, используемый для лечения злокачественных заболеваний крови. Ограничивающим фактором для его широкого использования в медицинской практике является высокая гидролитическая нестабильность в водных растворах. При этом сообщалось, что 5'-ОН группа углеводной части нуклеозидов 5-азацитозина, по-видимому, может оказывать влияние на скорость гидролиза пиримидинового кольца. Одним из путей решения проблемы увеличения гидролитической стабильности азацитидина может являться изменение конформации путем введения атома фтора в углеводную часть молекулы. С этой целью осуществлен синтез 2'(3')-фтор- и 5'-дезоксинуклеозидов 5-азацитозина и изучена их гидролитическая стабильность.

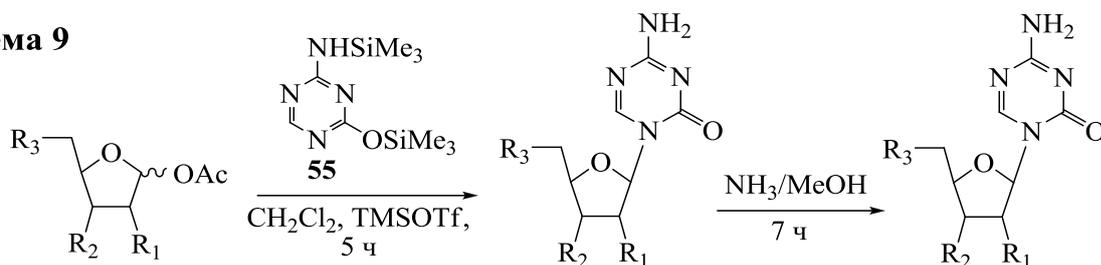
2.5.1 Синтез 5-азацитидина и его аналогов

Несмотря на значительное количество методов получения 5-азацитидина (азацитидин, 5-АЦ, **60**), он остается весьма труднодоступным продуктом, и выход целевого продукта фармакопейной чистоты колеблется от 11% до 34-40%.

Азацитидин (**60**), 5'-дезоксидеокси- и 3'-фтордезоксидеокси-рибоаналоги **61** и **62** получены с высоким выходом взаимодействием перацильных производных D-рибозы **3**, **54** и **2**, соответственно, с силилированным 5-азацитозинном **55**. Реакцию проводили в хлористом метиле при комнатной температуре в

присутствии TMSOTf с последующим удалением защитных групп промежуточных соединений **56**, **58** и **59** под действием аммиака в метаноле (Схема 9).

Схема 9



3 R₁ = R₂ = R₃ = OBz (β-изомер)

53 R₁ = R₂ = R₃ = OAc (β-изомер)

54 R₁ = R₂ = OAc, R₃ = H (β-изомер)

2 R₁ = R₃ = OBz, R₂ = F (α/β-изомер)

56 R₁ = R₂ = R₃ = OBz (65%)

57 R₁ = R₂ = R₃ = OAc

58 R₁ = R₂ = OAc, R₃ = H (80%)

59 R₁ = R₃ = OBz, R₂ = F (67%)

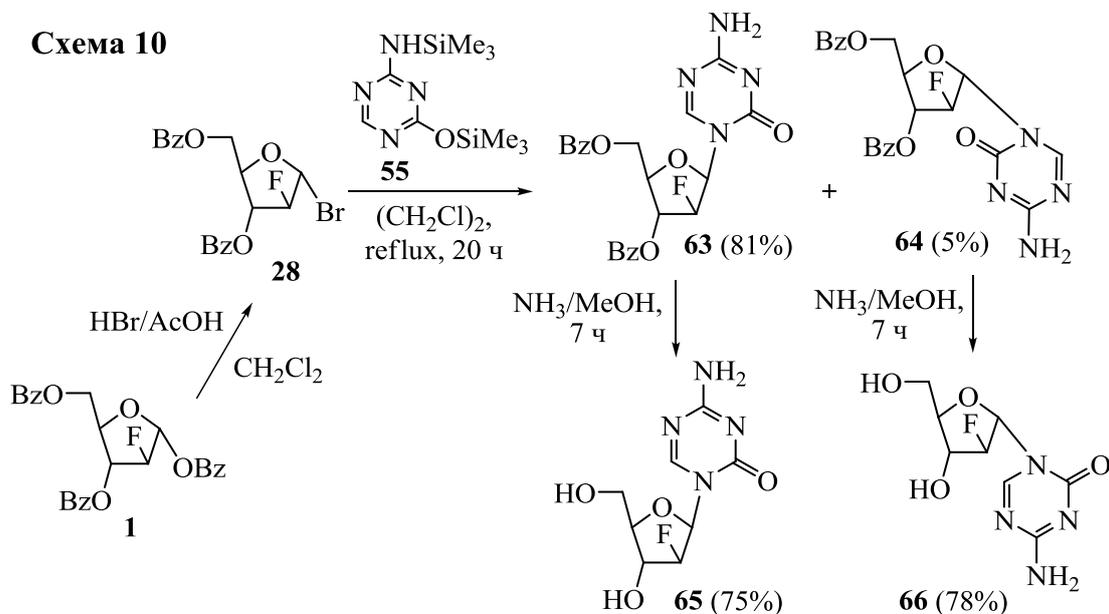
60 R₁ = R₂ = R₃ = OH (60%)

61 R₁ = R₂ = OH, R₃ = H (92%)

62 R₁ = R₃ = OH, R₂ = F (67%)

Исходя из коммерчески доступного тетраацетата **53**, разработан препаративный метод синтеза азациитидина (**60**), позволяющий получать субстанцию с высоким суммарным выходом 55-60% и хроматографической чистотой $\geq 99\%$. Совместно с сотрудниками ЛХНиП и НПЦ «ХимФармСинтез» разработан опытно-промышленный регламент на производство фармсубстанции азациитидина (ОПР № 16/2015).

Конденсация 1-α-бромсахара **28** и триметилсилильного производного 5-азацитозина **55** в 1,2-дихлорэтане давала смесь β/α-изомеров **63** и **64** в соотношении 16:1 с высоким выходом (86%), которые выделены в индивидуальном состоянии колоночной хроматографией на силикагеле (Схема 10).



Дебензоилирование соединений **63** и **64** аммиаком в метаноле приводило к целевому 2'-фтордезоксипрологу **65** и его α-аномеру **66** с выходом 75% и 78%, соответственно.

Стереохимические и структурные особенности нуклеозидных аналогов 5-азацитозина **60-62**, **65** и **66** находят свое отражение в данных КД-спектроскопии (Рисунок 4).

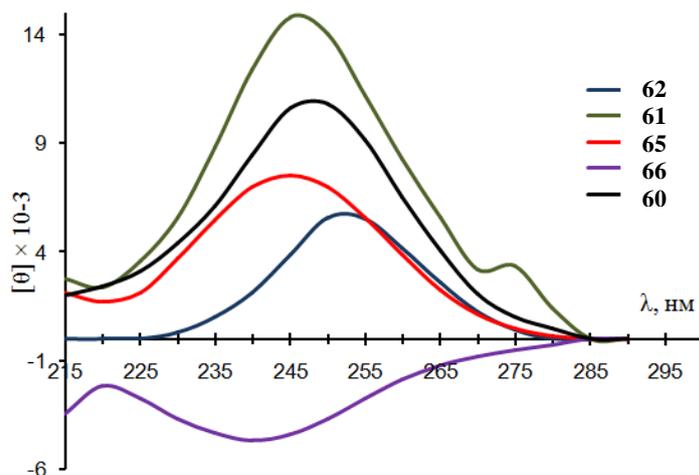


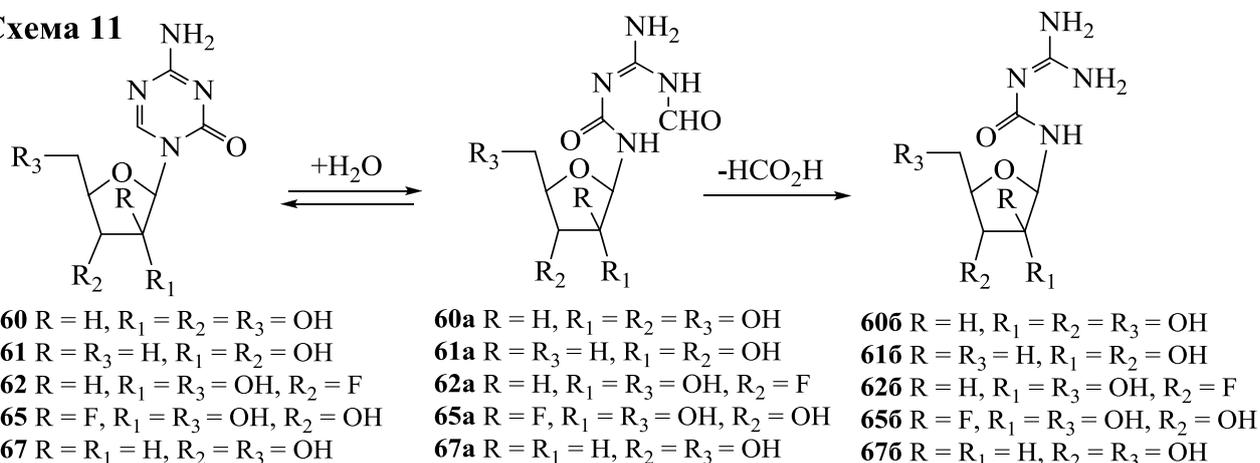
Рисунок 4.— КД-спектры соединений **60-62**, **65** и **66** в воде

Форма кривых КД-спектров 2'(3')-фтордезоксиприпуринаналогов похожа на форму кривых 5-азацитидина (**60**), однако амплитуды эффекта Коттона обнаруживают существенные различия и зависят от положения атома фтора. Кроме того, в КД-спектре α -аномера **66** наблюдался отрицательный эффект Коттона при 240 нм, тогда как в спектрах β -аномеров **60-62** и **65** присутствовал характерный в таких случаях положительный максимум при 245-250 нм.

2.5.2 Гидролитическая стабильность 5-азацитидина и его аналогов

Согласно литературным данным, гидролитическая нестабильность азацитидина (**60**) и его 2'-дезоксиприпуринаналогов (**67**, децитабин) в нейтральных, кислых и щелочных условиях обусловлена расщеплением триазинового кольца с обратимым образованием нестабильного промежуточного продукта N-формилрибозилгуанилмочевины (**60a** и **67a**); последующая потеря формиата приводит к рибозилгуанилмочевине (**60b** и **67b**), что вызывает частичную потерю эффективности лекарственного средства (Схема 11).

Схема 11



Гидролитическая стабильность фтордезоксиприанов **62**, **65** и 5'-дезоксиприана **61** изучена в сравнении с 5-АЦ (**60**) при различных значениях pH. Методом ВЭЖХ измеряли содержание исходных веществ и продуктов гидролиза через заданные промежутки времени. Методом ВЭЖХ-МС доказано, что профиль разложения нуклеозидных аналогов **61**, **62** и **65** схож с профилем разложения азацитидина (Схема 11). На основании полученных данных строили графики зависимости концентрации от времени и рассчитывали необходимые показатели, а именно период полураспада ($t_{1/2}$) и время, необходимое для снижения концентрации 5-АЦ (**60**) и его аналогов **61**, **62** и **65** на 10, 20 и 30% при нейтральном значении pH (Таблицы 2 и 3).

Таблица 2. – Период полураспада* 5-АЦ (**60**) и его фтордезоксиприанов **62** и **65** при различных значениях pH

Соединение	Период полураспада, $t_{1/2}$, мин		
	H ₂ O	pH 3,2	pH 10,2
5-АЦ (60)	1280 ± 57	450 ± 50	97 ± 10
3'F-5-АЦ (62)	440 ± 43	40 ± 5	1 ± 0,5
2'F-ара-5-АЦ (65)	1070 ± 54	100 ± 11	5 ± 1
Децитабин (67)	549 ± 43 [#]		

Таблица 3. – Время*, необходимое для снижения концентрации 5-АЦ (**60**) и его аналогов **61**, **62** и **65** на 10, 20 и 30%

Остаточное количество, %	Время, мин			
	60 (5-АЦ)	62 (3'F-5-АЦ)	65 (2'F-ара-5-АЦ)	61 (5'-дезоксиприан)
90	25 ± 1,2	12 ± 0,5	43 ± 1,7	65 ± 3,1
80	80 ± 3,9	30 ± 1,5	89 ± 4,2	175 ± 8,2
70	350 ± 14,8	75 ± 3,4	360 ± 15,1	...

*Значения параметров гидролиза представлены в виде $X \pm SD$ (среднее ± стандартное отклонение) трех независимых экспериментов, уровень достоверности $P < 0,05$ принимали статистически значимым; [#]литературные данные.

Сравнение полученных данных показывает, что гидролитическая стабильность 2'-фторарабинозида **65** в водных растворах при всех изученных значениях pH оказалась значительно выше, чем у изомерного 3'-фтордезоксиприана **62**, несмотря на структурное подобие 2'-фторнуклеозида **65** и 2'-дезоксиприана азацитидина (**67**). 3'-Фторрибозид **62** неожиданно оказался неустойчивым к гидролизу в воде более чем в 2 раза по сравнению с изомерным арабиноаналогом **65** и по своей гидролитической способности более соответствовал децитабину (**67**).

Найдено, что время, необходимое для разложения 10% 2'F-5-АЦ (**65**), составляет 43 мин, тогда как для 5-АЦ этот показатель достигается уже при 25 мин, т.е. гидролитическая стабильность нуклеозидного аналога **65**, содержащего атом фтора при С(2') в арабино-конфигурации, в 1,7 раз выше, чем 5-АЦ. Этот факт является важным показателем, т.к. период полувыведения 5-АЦ после подкожного введения составляет 41±8 мин.

5'-Дезокси-5-азацитидин (**61**) оказался наиболее стабильным соединением (Таблица 3), что подтверждает влияние 5'-ОН группы на скорость гидролиза нуклеозидных аналогов 5-азацитозина.

Очевидно, атом фтора в 5-азацитидиновых рибо- и арабиноаналогах **62** и **65**, наиболее эффективно смещает S↔N конформационное равновесие в сторону одного из конформеров, что отражено и в амплитудах эффекта Коттона. В результате различной конформации уменьшается либо увеличивается расстояние между гетероциклическим основанием и гидроксильной группой в пятом положении углеводного остатка, что и приводит к различной гидролитической стабильности 3'-фторрибо- и 2'-фторарабинонуклеозидов 5-азацитозина.

2.6 Биологическая активность синтезированных соединений

Исследования противолейкозной активности *in vitro* и острой токсичности *in vivo* синтезированных фтордезоксиприанов 5-АЦ (Таблицы 4 и 5) показали, что нуклеозидный аналог **65** (2'F-ара-5-АЦ) в модельных системах роста клеток трех линий острого миелогенного лейкоза человека проявил существенно более высокую степень ингибирования жизнеспособности лейкозных клеток по сравнению с активностью 3'F-5-АЦ (**62**). Цитотоксический эффект данного нуклеозида также оказался значительно выше, чем используемого в клинической практике противолейкозного препарата 5-АЦ (**60**).

Таблица 4. – Специфическая цитотоксическая активность *in vitro* новых нуклеозидных аналогов 5-АЦ в культурах клеток гемобластозов человека

Линия лейкозных клеток	Величина средней эффективной концентрации* (EC ₅₀ , мкМ) тестируемых соединений		
	60 (5-АЦ)	65 (2'F-ара-5-АЦ)	62 (3'F-5-АЦ)
KG-1	3,66 ± 0,10	0,35 ± 0,06	>1,0
TPH-1	4,25 ± 0,25	0,51 ± 0,01	>10,0
HL-60	5,37 ± 0,07	0,58 ± 0,05	>10,0
K-562	4,64 ± 0,15	>10,0	>50,0
MOLT-3	н/а [#]	н/а [#]	н/а [#]

*Значения EC₅₀ представлены в виде X ± SD (среднее ± стандартное отклонение) трех независимых экспериментов, уровень достоверности P<0,05 принимали статистически значимым; [#] н/а – неактивно.

Фтораналог **65**, как и препарат сравнения 5-АЦ (**60**), дозозависимо избирательно подавлял жизнеспособность клеток острого миелогенного лейкоза линии KG-1, острого моноцитарного лейкоза ТРН-1 и острого промиелоцитарного лейкоза HL-60. Клетки хронического миелогенного лейкоза К-562 показали низкую чувствительность к 2'-F-ара-5-АЦ, тогда как 5-АЦ в тест-системе роста лейкозных клеток К-562 проявил практически такую же цитотоксическую активность, как и в отношении клеток трех линий острого миелогенного лейкоза. Клетки острого Т-лимфобластного лейкоза MOLT-3 оказались абсолютно резистентны как к новому нуклеозидному аналогу **65**, так и к 5-АЦ.

Величины EC_{50} , отражающие концентрацию нуклеозида, которая обеспечивает 50% ингибирования жизнеспособности лейкозных клеток по сравнению с контролем, указывают на 9-10 кратное усиление специфического цитотоксического эффекта нового 2'-фторсодержащего аналога **65** по сравнению с контрольным препаратом.

Таблица 5. – Острая токсичность соединений **60** и **65** на мышах линии ICR

Пол мышей	LD ₅₀ (мг/кг) i.p.	
	60 (5-АЦ)	65 (2'-F-5-АЦ)
Самцы	75 (59,1÷95,3)*	73 (52,5÷100,1)
Самки	120 (102,8÷144,4)	84 (66,7÷105,8)

* в скобках доверительный интервал

Результаты исследования острой токсичности нового 2'-фторсодержащего аналога **65** в сравнении с 5-АЦ при внутрибрюшинном однократном введении в возрастающих дозах показали, что исследуемые образцы имели сравнимые значения LD₅₀ (средняя доза вещества, вызывающая гибель половины животных испытываемой группы). Учитывая тот факт, что ингибирующая концентрация 2'-F-ара-5-АЦ на порядок ниже, чем известного противолейкозного средства азациитидина, можно предположить возможное снижение общего токсического действия нового фтораналога при использовании его в терапевтических дозах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработан эффективный метод получения ранее труднодоступной 1,2,3,5-тетра-О-бензоил-β-D-рибофуранозы – универсального гликозилирующего агента в синтезе биологически значимых нуклеозидов, включающий реакции галогенирования 1-О-ацетил-2,3,5-три-О-бензоил-β-D-рибофуранозы, гидролиз промежуточного 1-хлорсахара и бензоилирование свободной гидроксигруппы ацильных производных D-рибозы [4].

2. Разработан эффективный метод синтеза 1-(β-D-рибофуранозил)-6-фтортимина и его новых 3'-фтордезоксипроизводных через N-гликозилирование 2,4-бис-О-(триметилсилил)-6-фтортимина перацильными производными D-рибозы в условиях реакции Форбрюггена. Установлено, что состав продуктов данной реакции зависит от температуры, способа силилирования гетероциклического основания, а также от структуры и аномерной конфигурации гликозилирующего агента, что в совокупности позволяет смещать направление реакции к получению желаемого продукта [4, 7].

3. Синтезированы ранее неизвестные 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-D-арабинонуклеозиды 6-замещенного тимина путем N-гликозилирования 2,4-бис-О-(триметилсилил)-6-фтортимина 1-α-бромпроизводным 2-дезоксидезокси-2'-фтор-D-арабинофуранозы и дебензоилирования промежуточных β/α-нуклеозидов 6-фтортимина под действием нуклеофильного агента [6, 9, 10].

4. Предложен эффективный метод удаления бензоильных групп в углеводном фрагменте блокированных β-нуклеозидов 6-фтортимина и его 2'(3')-фторсодержащих аналогах с помощью гидроксида лития в смеси ацетонитрил-вода, позволяющий получать целевые нуклеозиды с высокими выходами в результате исключения побочной реакции замещения атома фтора в С(6)-положении гетероцикла на нуклеофил. При деблокировании в аналогичных условиях соответствующих бензоилированных N(1)-α-нуклеозидов 6-фтортимина обнаружена реакция внутримолекулярной циклизации, приводящая к образованию 6,3'-О-α-D-ангидронуклеозидов или ранее не описанных пиримидиновых 6,2'-О-α-D-ангидронуклеозидов, в результате замещения атома фтора при С(6)-атоме гетероцикла активированной гидроксигруппой при С(3')- или С(2')-атоме промежуточных деблокированных нуклеозидов [4, 6, 9, 10].

5. Исходя из производных С(2)-α- и С(3)-β-фтордезоксидезокси-D-пентафураноз в качестве универсальных гликозилирующих агентов разработаны эффективные методы синтеза 2'(3')-фторсодержащих нуклеозидных аналогов 6-азатимина, 5-метил-6-азацитозина и 5-азацитозина, что позволило получить ряд новых азапиримидиновых нуклеозидов. В результате оценки противолейкозной активности синтезированных нуклеозидов выявлен новый 2'-фторсодержащий аналог азацитидина, показавший 9-10 кратное усиление специфического цитотоксического эффекта по сравнению с известным препаратом азацитидином, что делает его перспективным для дальнейших биологических исследований *in vivo* [2, 3, 5, 12, 13, 14, 15, 16].

6. Получены экспериментальные подтверждения влияния структурно-конформационных особенностей 2'(3')-фтор- и 5'-дезоксинуклеозидов 5-азацитозина на скорость их гидролиза при различных значениях pH. Обнаружен новый аналог 5-АЦ с атомом фтора при С(2') в арабино-конфигурации, гидролитическая стабильность которого в 1,7 раз выше, чем известного

лекарственного препарата азациитидина, что может позволить избежать частичную потерю его биологической активности за предполагаемый период полувыведения [1, 3].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Для практического использования представляет интерес новый 2'-фтордезоксинуклеозидный аналог 5-азациитозина, обладающий высокой противолейкозной активностью, а также эффективный метод его получения (заявка по получение патента РБ № а20140359 от 27.06.2014). Новый 2'-фтордезоксинуклеозидный аналог обладает повышенной устойчивостью к гидролизу при физиологических рН.

Разработан препаративный способ синтеза 5-азациитидина с использованием коммерчески доступных исходных реагентов, что позволило оптимизировать технологию его производства, достичь высокого суммарного выхода (56-60%) и получить фармацевтическую субстанцию с хроматографической чистотой $\geq 99\%$ (заявка по получение патента РБ № а20150554 от 12.11.2015). Опытным промышленным регламентом (ОПР № 16/2015) подтверждается внедрение в производство на НПЦ «ХимФармСинтез» способа получения фармацевтической субстанции азациитидина.

Разработанные эффективные методы синтеза новых фторсодержащих пиримидиновых Д-нуклеозидов могут использоваться для дальнейших исследований и поиска в их ряду соединений, обладающих противовирусной или противоопухолевой активностью.

Список публикаций соискателя

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. Гидролитическая стабильность 2'(3')-фторсодержащих аналогов 5-азациитидина / Е. Н. Калиниченко, Т. С. Божок, Т. Н. Буравская, П. С. Шабуня, С. А. Фатыхова // Труды БГУ. – 2013. – Т. 8, Ч. 1 – С. 235–240.

2. Божок, Т. С. Синтез фторсодержащих аналогов 5-азациитидина / Т. С. Божок, Е. Н. Калиниченко // Известия НАН Беларуси, сер. хим. наук. – 2014. – № 3. – С. 60–65.

3. Synthesis, Hydrolytic Stability, and Antileukemic Activity of Azacytidine Nucleoside Analogs / T. S. Bozhok, E. N. Kalinichenko, M. B. Golubeva, B. B. Kuz'mitskii // Pharm. Chem. J. – 2016. – Vol. 49, iss. 12. – P. 804–809. (Синтез, гидролитическая стабильность и противолейкозная активность нуклеозидных аналогов азациитидина / Т. С. Божок, Е. Н. Калиниченко, М. Б. Голубева, Б. Б. Кузьмицкий // Хим.-фарм. журнал. – 2015. – Т. 49, № 12. – С. 7–11).

4. Synthesis of novel 6-substituted thymine ribonucleosides and their 3'-fluorinated analogues / T. S. Bozhok, G. G. Sivets, A. V. Baranovsky, E. N. Kalinichenko // Tetrahedron. – 2016. – Vol. 72, iss. 41. – P. 6518–6527.

5. Божок, Т. С. Синтез новых 6-азапиримидиновых 2'(3')-фтордезоксинуклеозидов / Т. С. Божок, Е. Н. Калиниченко // Известия НАН Беларуси, сер. хим. наук. – 2016. – № 6. – С. 51–59.

6. Божок, Т. С. Синтез 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-D-арабинонуклеозидов 6-замещенного тимина / Т. С. Божок, Е. Н. Калиниченко // Докл. НАН Беларуси. – 2017. – № 1. – С. 61–67.

Статьи в сборниках трудов международных конференций:

7. Божок, Т. С. Синтез 1-β-D-рибофуранозил-6-фтортимина / Т. С. Божок, Е. Н. Калиниченко // Химия биологически активных веществ : межвуз. сб. науч. тр. Всероссийской школы-конф. молодых учёных, аспирантов и студентов / Ин-т химии СГУ им. Н. Г. Чернышевского ; редкол.: О. В. Федотова [и др.]. – Саратов, 2012. – С. 46–47.

8. Применение нуклеозидфосфорилаз для получения практически важных нуклеозидов / Е. Н. Калиниченко, С. В. Квач, С. Н. Михайлов, А. И. Береснев, Г. Г. Сивец, Т. С. Божок, В. А. Степченко, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко // Биорегуляторы: исследование и применение, выпуск 3 : сб. науч. тр. / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси ; под ред. С. А. Усанова. – Минск, 2014. – С. 33–46.

Тезисы докладов:

9. Божок, Т. С. Синтез нуклеозидов 6-фтортимина / Т. С. Божок, Е. Н. Калиниченко // Химия, структура и функции биомолекул : материалы IV междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. акад. А. А. Ахрема, Минск, 17–19 окт. 2012 г. / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси ; редкол.: Ф. А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2012. – С. 24–25.

10. Божок, Т. С. Синтез пиримидиновых 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-D-арабинонуклеозидов в качестве потенциальных противовирусных агентов / Т. С. Божок, Г. Г. Сивец, Е. Н. Калиниченко // Химия фтора : материалы 9-ой Всероссийской конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. акад. А. В. Фокина, Москва, 22–26 окт. 2012 г. / Ин-т элементоорг. соед. им. А. Н. Несмеянова РАН ; редкол.: В. М. Бузник [и др.]. – Москва, 2012. – P-25.

11. Vozhok, T. S. Synthesis of 2'(3')-fluorinated analogues of 5-azacytidine / T. S. Vozhok, E. N. Kalinichenko // Challenges in Organic & Bioorganic Chemistry : abstracts of 14th Tetrahedron Symposium, Vienna, 25–28 Jun. 2013 / Elsevier ; ed.: E. J. Thomas [et al.]. – Vienna, 2013. – P1.112.

12. Божок, Т. С. Азацитидин и его новые фторсодержащие аналоги / Т. С. Божок, Е. Н. Калиниченко // Отечественные противоопухолевые препараты : материалы Белорусско-Российской научно-практ. конф. с междунар. участием, Минск, 23–25 мая 2013 г. / Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С.11.

13. Поиск эффективных гипометилирующих препаратов в ряду нуклеозидных аналогов азацитидина / Т. С. Божок, Е. Н. Калиниченко,

М. Б. Голубева, Б. Б. Кузьмицкий // Белорусские лекарства : материалы междунар. научно-практ. конф., Минск, 27-28 нояб. 2014 г. / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси; под ред. С. А. Усанова. – Минск, 2014. – С. 28–30.

14. Антилейкемическая активность новых фторсодержащих аналогов азациитидина / Т. С. Божок, М. Б. Голубева, Е. Н. Калиниченко, Б. Б. Кузьмицкий, Ю. Ю. Саевич // Химия, структура и функции биомолекул : материалы V междунар. науч. конф., посвящ. 40-летию Инст. биоорг. химии и 85-летию НАН Беларуси, Минск, 4-6 июня 2014 г. / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 37–38.

15. New fluorine-containing analogue of azacitidine: cytotoxic activity and acute toxicity / T. S. Bozhok, M. B. Golubeva, R. D. Zilberman, E. N. Kalinichenko // Drug Discovery Conference : abstracts, Riga, 27–29 Aug. 2015 / Latvian Institute of Organic Synthesis ; ed.: M. Dambrova. – Riga, 2015. – P. 90.

Поданные заявки на выдачу патентов РБ:

16. 4-Амино-1-(2-дезоксидезокси-2-фтор-β-D-арабинофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он, способ его получения и применения : заявка ВУ а20140359 / Е. Н. Калиниченко, Т. С. Божок, М. Б. Голубева, Б. Б. Кузьмицкий. – Оpubл. 27.06.2014.

17. Способ получения 4-амино-1-β-D-рибофуранозил-1,3,5-триазин-2(1H)-она : заявка ВУ а20150554 / Е. Н. Калиниченко, Т. С. Божок, В. А. Степченко, А. Н. Зимагоров. – Оpubл. 12.11.2015.



РЕЗЮМЕ

Божок Татьяна Станиславовна

Синтез и свойства 2'(3')-фторзамещенных пиримидиновых D-нуклеозидов

Ключевые слова: синтез, пиримидиновые D-нуклеозиды, фторнуклеозиды, триазины, гидролитическая стабильность, биологическая активность

Цель работы: разработка методов синтеза новых 2'(3')-фторзамещенных пиримидиновых D-нуклеозидов, модифицированных по гетероциклическому основанию, а также исследование физико-химических свойств синтезированных нуклеозидов.

Методы исследования: современные методы тонкого и препаративного органического синтеза, 1D и 2D ЯМР-, УФ-, ИК-, КД-спектроскопия, масс-спектрометрия, ВЭЖХ.

Объекты исследования: пиримидиновые D-нуклеозиды, модифицированные в углеводной и (или) гетероциклической части молекулы.

Предмет исследования: методы конвергентного синтеза, направленные на получение новых практически важных нуклеозидных аналогов.

Полученные результаты и их новизна: разработаны эффективные методы синтеза новых 2'(3')-фтордезоксинуклеозидных аналогов 6-замещенного тимина. Установлена регио- и стереонаправленность реакции N-гликозилирования 2,4-бис-O-(триметилсилил)-6-фтортимина ацильными производными D-рибозы. Впервые обнаружен способ синтеза пиримидиновых 6,2'-O- α -D-ангидронуклеозидов. Разработаны эффективные методы получения новых 2'(3')-фторсодержащих нуклеозидных аналогов 6-азатимина, 5-метил-6-азацитозина и 5-азацитозина, в том числе нуклеозиды, обладающие высокой противоопухолевой активностью. Впервые получены экспериментальные свидетельства влияния структурно-конформационных особенностей 2'(3')-фтор- и 5'-дезоксинуклеозидов 5-азацитозина на скорость их гидролиза при различных значениях pH.

Рекомендации по использованию: Результаты работы могут быть использованы для получения новых биологически активных соединений с целью создания на их основе химиопрепаратов для лечения онкологических заболеваний. Результаты исследований рекомендуется использовать в производственных технологиях серийного выпуска фармацевтической субстанции азацитидина.

Область применения: органическая и биоорганическая химия, медицина.

РЭЗІЮМЭ

Бажок Таццяна Станіславаўна

Сінтэз і ўласцівасці 2'(3')-фторзамешчаных пірымідзінавых D-нуклеазідаў

Ключавыя словы: сінтэз, пірымідзінавыя D-нуклеазіды, фторнуклеазіды, трыазіны, гідралітычная стабільнасць, біялагічная актыўнасць

Мэта работы: распрацоўка метадаў сінтэзу новых 2'(3')-фторзамешчаных пірымідзінавых D-нуклеазідаў, мадыфікаваных па гетэрацыклічнай аснове, а таксама даследаванне фізіка-хімічных уласцівасцяў сінтэзаваных нуклеазідаў.

Метады даследавання: сучасныя метады тонкага і прэпаратыўнага арганічнага сінтэзу, 1D і 2D ЯМР-, УФ-, КД-, ІЧ-спектраскапія, мас-спектраметрыя, ВЭВХ.

Аб'екты даследавання: пірымідзінавыя D-нуклеазіды, мадыфікаваныя па вугляводнай і (або) гетэрацыклічнай часткі малекулы.

Прадмет даследавання: метады канвергентнага сінтэзу, накіраваныя на атрыманне новых практычна важных нуклеазідных аналагаў.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваны эфектыўныя метады сінтэзу новых 2'(3')-фтордэзоксінуклеазідных аналагаў 6-замешчанага ціміну. Устаноўлена рэгія- і стэрэанакіраванасць рэакцыі N-гліказіліравання 2,4-біс-О-(трыметылсіліл)-6-фторціміну перацільнымі вытворнымі D-рыбозы. Упершыню знойдзены спосаб сінтэзу пірымідзінавых 6,2'-O- α -D-ангідрануклеазідаў. Распрацаваны эфектыўныя метады атрымання новых 2'(3')-фтордэзоксінуклеазідных аналагаў 6-азаціміну, 5-метыл-6-азацытазіну і 5-азацытазіну, у тым ліку нуклеазіды, якія маюць высокую супрацьпухлінную актыўнасць. Упершыню атрыманы эксперыментальныя пацверджання ўплыву структурна-канфармацыйных асаблівасцей 2'(3')-фтор- і 5'-дэзоксінуклеазідаў 5-азацытазіну на хуткасць іх гідролізу пры розных значэннях рН.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: вынікі работы могуць быць выкарыстаны для атрымання новых біялагічна актыўных злучэнняў з мэтай стварэння на іх аснове хіміяпрэпаратаў для лячэння анкалагічных захворванняў. Вынікі даследаванняў рэкамендуецца выкарыстоўваць у вытворчых тэхналогіях серыйнага выпуску фармацэўтычнай субстанцыі азацыдзіну.

Галіна выкарыстання: арганічная і біяарганічная хімія, медыцына.

SUMMARY

Bozhok Tatyana Stanislavovna

Synthesis and properties of 2'(3')-fluoro-substituted pyrimidine D-nucleoside analogues

Key words: synthesis, pyrimidine D-nucleosides, fluorodeoxy nucleosides, triazines, hydrolytic stability, biological activity.

The aim of the research: development of methods for the synthesis of new 2'(3')-fluoro-substituted pyrimidine D-nucleoside analogues, as well as investigation of the physicochemical properties of synthesized nucleosides.

Methods of investigation: modern methods of fine and preparative organic synthesis, 1D and 2D-NMR-, UV-, IR-, CD-spectroscopy, mass-spectrometry, HPLC.

The object of the research: pyrimidine D-nucleosides with a modified carbohydrate and (or) heterocyclic moieties.

The subject of the research: methods of convergent synthesis for obtaining new practically important nucleoside analogues.

Obtained results and their novelty: effective methods for the synthesis of new 6-substituted thymine 2'(3')-fluorodeoxy nucleoside analogues have been developed. The regio- and stereospecificity of the N-glycosylation of 2,4-bis-O-(trimethylsilyl)-6-fluorothymine with acylated D-ribose derivatives has been established. A method for the synthesis of pyrimidine 6,2'-O- α -D-anhydronucleosides was first described. Effective methods for the preparation of new 2'(3')-fluorinated nucleoside analogues of 6-azatimine, 5-methyl-6-azacytosine and 5-azacytosine, including nucleosides with high antitumor activity have been developed. For the first time there was obtained experimental evidence of the influence of the structural-conformational features of the 5-azacytosine 2'(3')-fluoro- and 5'-deoxy-nucleosides on the rate of their hydrolysis at different pH.

Application guidelines: the results of the work can be used to obtain new biologically active compounds in order to create on their basis chemotherapeutic agents for the treatment of cancer diseases. The results of research are recommended to be used in technologies for serial production of pharmaceutical substance azacytidine.

Fields of application: organic and bioorganic chemistry, medicine.

