

## Синтез нових 2',3'-дидезоксипохідних 6-азацитидину — потенційних інгібіторів репродукції ретровірусів

В. Г. Костіна, І. В. Алексєєва, Л. Г. Пальчиковська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Проведено деоксигенування 5-бензоїл-6-азацитидину за участю галоїдвмісних фосфонієвих реагентів. Одержано 2',3'-рибосепоксид, 2',3'-дигалоїд-2',3'-дидезокси- та 2',3'-дидегідро-2',3'-дидезокси-похідні 6-азацитидину. Такий підхід дає можливість у залежності від умов реакції ідентифікувати незалежні шляхи механізму утворення різних дезокси-похідних 6-азацитидину — потенційних противірусних та імуномодулюючих препаратів.*

Вступ. Пошук нових ефективних препаратів, здатних пригнічувати репродукцію ВІЛ, обумовлений значною мінливістю ретровірусів та резистентністю їхніх мутантів до багатьох хіміопрепаратів. Комбінаційна терапія, яка зараз широко застосовується при лікуванні СНІДу, значно уповільнює ці процеси і сприяє подовженню повноцінного життя хворих людей.

Принцип комбінаційної терапії полягає у поєднанні лікарських засобів, що метаболізуються у клітині за участі різних ферментативних циклів.

На сьогодні у світовій клінічній практиці застосовуються 13 ефективних препаратів — інгібіторів ревертази та протеази ВІЛ, шість із них належать до класу модифікованих дезоксинуклеозидів. Це спонукало нас до синтезу потенційних інгібіторів ВІЛ у ряду дезокси-похідних 6-азацитидину (6-АС) [1—4].

Одним з оригінальних методів деоксигенування рибозного фрагмента, на наш погляд, може бути варіант реакції Арбузова, вперше застосований для одержання 2',3'-дидегідро-2',3'-дидезокси-похідних уридину та тимінрибозиду за участі галоїдвмісних похідних фосфору: йодидів трифенілідфосфонію  $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{J}^-$  (I) та трифенілімідазолілфосфонію

$\text{Ph}_3\text{P}^+\text{ImJ}^-$  (II) [5, 6]. Метод відрізняється від відомих доступністю вихідних сполук і мінімізацією схеми хімічного синтезу [7, 8].

Матеріали і методи. У роботі використано сухі розчинники, очищені за методом [9]. Трифеніл-галоїд(імідазоліл)фосфоній галогеніди одержували *in situ*, змішуючи трифенілфосфін з відповідним галогеном. 5'-О-бензоїл-6-азацитидин отримано в умовах часткового гідролізу трибензоїльного похідного 6-АС. Хроматографію в тонкому шарі (ТШХ) проводили на платівках Kieselgel F 254 («Merck», Німеччина) в системі розчинників хлороформ—метанол (9:1 (А), 8:2 (Б)). Продукти синтезу виділяли за допомогою препаративної рідинної хроматографії на силікагелі G-60 («Merck»). Температуру топлення визначали на приладі Боєтіуса (Німеччина).  $^1\text{H}$ -ЯМР спектри одержували на спектрометрі Varian VXP-300 (США) в  $\text{DMSO-d}_6$ ; УФ-спектри — на Specord UV-VIS (Німеччина). Дані елементного аналізу сполук були близькими до розрахованих (відхилення  $\pm 0,3\%$ ).

Синтез 5'-О-бензоїл-2',3'-ангідро- $\beta$ -D-рибофуранозил-6-азацитозину (3). До суспензії реагенту I (2,06 ммоль  $\text{Ph}_3\text{P}$  та 2,06 ммоль  $\text{J}_2$ ) у 3 мл сухого діоксану поступово додавали 0,6 ммоль 5'-О-бензоїл-6-АС (1), 4,12 ммоль імідазолу та 7 мл ацетонітрилу. Реакційну суміш витримували при  $t^\circ$  70—75 °С протягом 4 год до зникнення вихідної

сполуки 1. Реакційну масу випарювали до сухого залишку. Останній розчиняли в 10 мл хлороформу, промивали водою (3 рази по 10 мл). Органічний шар висушували  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , концентрували і наносили на колонку з силікагелем. Продукт вимивали хлороформом. Вихід епоксирибозиду 113 мг (52 %).  $T_{\text{топл}}$  216—218 °C,  $R_f$  0,85 (А). УФ-спектр у метанолі:  $\lambda_{\text{max}}$  270 нм ( $\epsilon$  7900).

*Синтез 5'-О-бензоїл-2',3'-дидегідро-2',3'-дидезокси-6-азацитидину (6).* В а р і а н т 1. До суспензії реагенту I (2 ммоль) у 10 мл хлороформу послідовно додавали 0,6 ммоль 5'-О-бензоїл-6-АС, 4 ммоль імідазолу та кип'ятили протягом 2,5 год. Суміш охолоджували, додавали 1 мл діоксану та 0,9 ммоль реагенту I і залишали до зникнення епоксипохідного 3 (приблизно 24 год, контроль ТШХ). Обробку реакційної суміші здійснювали, як у попередній методиці. Продукт очищали хроматографією на силікагелі у градієнті концентрації (0—6 %) метанолу в хлористому метилени. Вихід 75 мг (40 %).

В а р і а н т 2. До 0,3 ммоль сполуки 3 у 5 мл діоксану додавали 0,45 ммоль  $\text{Ph}_3\text{P}$  та 0,45 ммоль йоду. Суспензію залишали при кімнатній температурі на 48 год до закінчення реакції (ТШХ контроль). Реакційну суміш концентрували, додавали хлороформ (15 мл) і обробляли, як у варіанті 1. Вихід 60 мг (56 %).  $T_{\text{топл}}$  106—107 °C,  $R_f$  0,22 (А), 0,75 (Б). УФ-спектр у метанолі:  $\lambda_{\text{max}}$  269—270 нм ( $\epsilon$  7200).

*Синтез 5'-О-бензоїл-2',3'-дибром-2',3'-дидезокси-6-азацитидину (5b).* До суспензії 2,5 ммоль  $\text{Ph}_3\text{P}$  та 6,0 ммоль  $\text{CBr}_4$  у 4 мл сухого хлороформу додавали 0,6 ммоль 5'-О-бензоїл-6-АС (1). Реакційну суміш кип'ятили протягом 4 год до зникнення вихідної сполуки 1 (ТШХ контроль), охолоджували, промивали водою, сушили і концентрували. Продукт виділяли за допомогою препаративної колонкової хроматографії. Трифенілфосфоксид вимивали системою толуол—ізопропанол, 95:5, а продукт — системою метилен хлористий—ізопропанол, 9:1. Вихід 86 мг (30 %),  $T_{\text{топл}}$  140—145 °C,  $R_f$  0,55 (А).

*Синтез 5'-О-бензоїл-2',3'-дихлор-2',3'-дидезокси-6-азацитидину (5c).* До суспензії 2,5 ммоль  $\text{Ph}_3\text{P}$  та 6,0 ммоль  $\text{CCl}_4$  у 4 мл сухого хлороформу додавали 0,6 ммоль 5'-О-бензоїл-6-АС (1). Реакційну суміш кип'ятили протягом 4 год до зникнення вихідної сполуки 1 (контроль за допомогою ТШХ), охолоджували, промивали водою, сушили та концентрували. Продукт виділяли, як у попередній методиці. Середній вихід цільового продукту 92 мг (40 %).  $T_{\text{топл}}$  200—205 °C,  $R_f$  0,50 (А).

*Синтез 2',3'-дидегідро-2',3'-дидезокси-6-аза-*

*тидину (7).* До 0,5 ммоль продукту 6 додавали 2 мл сухого діоксану, 1,5 мл I N розчину метилату натрію у метанолі та витримували протягом 24 год при кімнатній температурі. Реакційну суміш нейтралізували смолою КУ-2 в  $\text{H}^+$ -формі, фільтрували та концентрували до сухого залишку. Залишок кристалізували з ацетону. Вихід продукту 63 мг (60 %).  $T_{\text{топл}}$  131—133 °C,  $R_f$  0,10 (А), 0,25 (Б). УФ-спектр у воді:  $\lambda_{\text{max}}$  228, 269 нм ( $\epsilon$  8150, 5950).

**Результати і обговорення.** Процес деоксигенування 5'-заміщених урацил- та тимінрибозидів у присутності реагентів I або II включає низку послідовних реакцій  $\text{SN}_2$  заміщення [7, 8]. Проміжні реакційноздатні синтони 2'-квазіфосфонієві солі нуклеозидів перетворюються у відповідні  $\text{O}_2,2'$ -циклонуклеозиди, а потім у 2'-йод-2'-дезоксиди дали в 2',3'-дидегідро-2',3'-дидезокси-піримідинових нуклеозидів. Останні як дуже нестійкі сполуки здатні спонтанно трансформуватися у відповідні дидегідро-дидезокси нуклеозиди з виділенням молекулярного йоду [5, 6].

Аналогічні перетворення повинні відбуватися і при застосуванні йодвмісних реагентів I і II в синтезі дезокси-6-азацитидину. Однак контроль (дані ТШХ) проміжних продуктів реакції 5'-О-бензоїл-6-АС з реагентом II вже на першому етапі деоксигенування показав утворення неочікуваного 2',3'-рибоепоксиду 6-АС (3, схема) на відміну від циклонуклеозидів у випадку уридину та тимінрибозиду [7, 8].

Будову сполуки 3, виділеної за допомогою рідинної хроматографії, підтверджено спектральними методами та методами хімічного аналізу. Механізм утворення епоксипохідного 6-АС обумовлений, на наш погляд, протонуванням N3-положення аглікону молекулою йодистого водню, яка вивільняється при утворенні реагенту II. Це унеможливає на наступному етапі внутрішньомолекулярну  $\text{O}_2,2'$ (3')-циклізацію і в той же час сприяє утворенню 2',3'-рибоепоксиду.

З аналізу експериментальних даних щодо цього етапу реакції деоксигенування з залученням йодвмісних реагентів I та II випливає, що існує пряма залежність між основністю аглікону вихідного нуклеозиду та вірогідністю утворення цикло- або епоксид-зв'язку.

Так, для 6-АС ( $\text{pKa}$  1,86) можлива лише епоксидна структура. З підвищенням основності гетероциклу, наприклад, у випадку 6-азауридину ( $\text{pKa}$  6,7) вже ймовірні обидві циклоструктури, які перебувають у рівновазі [10], а для уридину ( $\text{pKa}$  9,25) та тимінрибозиду ( $\text{pKa}$  9,68) переважає утворення  $\text{O}_2,2'$ -циклонуклеозидів.

Для одержання йодзаміщених дезокси-6-аза-

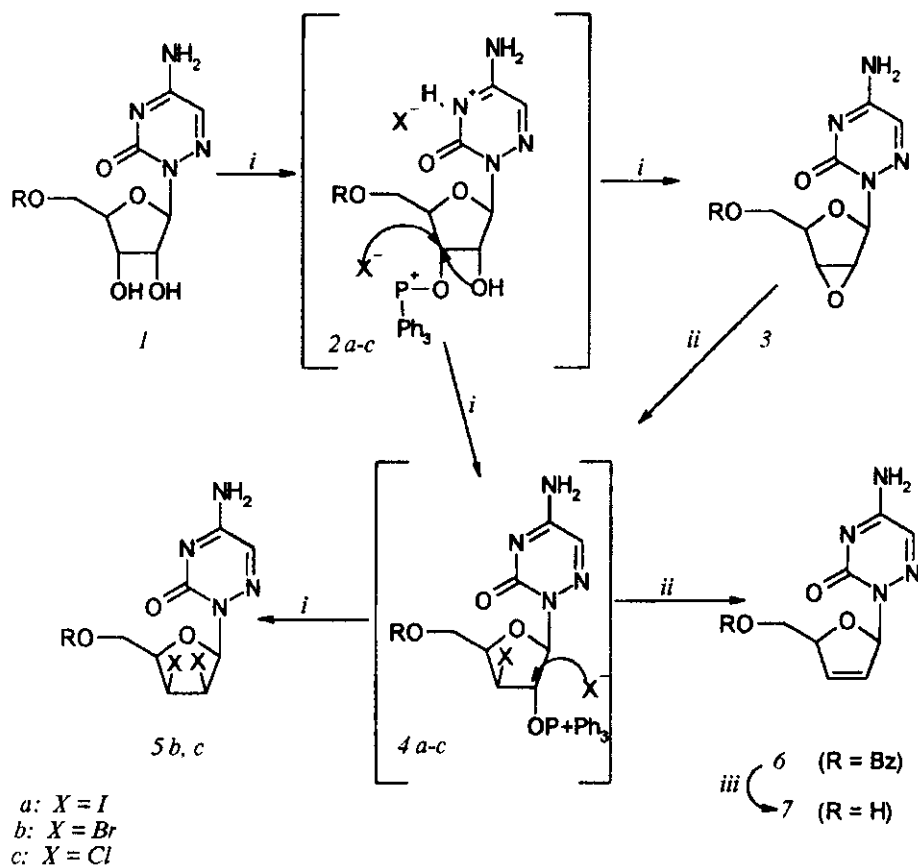


Схема синтезу похідних 6-азацидину: *i* — обробка 1 галоїдвмісним реагентом; *a* —  $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{Im}.\text{I}^-$ ; *b* —  $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{CBr}_3.\text{Br}^-$ ; *c* —  $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{CCl}_3.\text{Cl}^-$  протягом 4 год, 70–75 °С; *ii* —  $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{I}^-$ , 20 °С, 24–48 год; *iii* —  $\text{CH}_3\text{ONa}$  (MeOH + діоксан), 20 °С, 12 год; реагент *I* —  $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{I}^-$ ; реагент *II* —  $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{I}^-$ .

6-АС до 2',3'-епоксинуклеозиду додавали реагент I. Розкриття  $\alpha$ -епоксициклу, ймовірно, проходить з утворенням ізомерних 2'(3')-моноїодпохідних та подальшим їхнім деоксигенуванням за механізмом реакції Арбузова через стадію утворення йодидів квазіфосфонієвих солей (4a) і їх одночасним перегрупуванням у 2',3'-дйод-2',3'-дидезоксиліксифуранозид (5a). Останній завдяки своїй нестабільності перетворюється на нуклеозид з ненасиченим зв'язком (6, 7).

Слід відзначити, що підвищення температури реакції вище кімнатної провокує низку побічних реакцій, які призводять до руйнування фуранозного циклу.

У той же час було показано, що деоксигенування 5-заміщеного 6-АС з використанням бром- або хлорвмісних фосфонієвих реагентів  $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{CBr}_3.\text{Br}^-$  (III),  $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{CCl}_3.\text{Cl}^-$  (IV) проходить з утворенням виключно відповідних галоїдзаміщених 6-АС (5 b, c). ТШХ-моніторинг реакції засвідчив лише

слідові кількості епоксинуклеозиду. Тобто перегрупування квазіфосфонієвих солей іде переважно за механізмом реакції Арбузова. Цей факт можна пояснити, якщо врахувати різницю в нуклеофільних властивостях галогенаніонів, що беруть участь у реакції деоксигенування. Нуклеофільність аніонів хлору і бромі вища, ніж в йод-аніоні, що зменшує кількість можливих інверсій (конкурентних реакцій) в активованого по C2- та C3-атомах рибозного кільця [6]. Кінцевими продуктами розглянутих перетворень були 2',3'-дйод-2',3'-дидезоксинуклеозиди. Будову синтезованих сполук доведено за допомогою ПМР спектрів. Основна характеристика заміщення гідроксильних груп атомами галогенів пов'язана зі слабкопольним зсувом сигналів аномального протону та Н-2', Н-3', Н-4'-протонів у порівнянні з вихідними нуклеозидами. Значення цього зміщення безпосередньо залежить від електронегативності атома галогену (таблиця). Порівняльний аналіз характеристик протонів

<sup>1</sup>H-ЯМР характеристики синтезованих дезоксиформів 6-азацитидину

Сполука	Хімічний зсув протонів, δ, м. д.					
	Протони вуглеводного кільця					Інші протони
	1'-Н	2'-Н	3'-Н	4'-Н	5',5''-Н	
1	6,055 д	4,523 дд	4,483 дд	4,305 м	4,240 м 4,102 м	8,017—7,891 д (2Н, NH <sub>2</sub> ); 7,984—7,501 м (5Н, аром); 7,411 с (1Н, C <sub>5</sub> -Н); 5,361 д (2 <sup>1</sup> -ОН); 5,212 д (3 <sup>1</sup> -ОН)
3	6,954 с	6,342 д	5,969 д	5,050 м	4,396 м 4,303 м	8,0—8,2 д (2Н, NH <sub>2</sub> ); 7,9—7,6 м (5Н, аром); 7,542 с (1Н, C <sub>5</sub> -Н)
5b	6,335 д	5,152 дд	4,887 дд	4,778 м	4,635 м 4,456 м	8,256—8,01 д (2Н, NH <sub>2</sub> ); 8,055—7,576 м (5Н, аром); 7,355 с (1Н, C <sub>5</sub> -Н)
5c	6,238 д	5,321 дд	4,638 дд	4,458 м	4,252 м 4,114 м	8,40—7,962 д (2Н, NH <sub>2</sub> ); 7,783—7,582 м (5Н, аром); 7,470 с (1Н, C <sub>5</sub> -Н)
6	7,042 с	6,332 д	5,924 д	5,045 с	4,375 м 4,296 м	8,02—7,972 д (2Н, NH <sub>2</sub> ); 7,92—7,492 м (5Н, аром); 7,357 с (1Н, C <sub>5</sub> -Н)
7	6,997 с	6,313 д	5,838 д	4,707 уш. с.	3,429 (2Н)	7,974—7,879 д (2Н, NH <sub>2</sub> ); 7,465 с (1Н, C <sub>5</sub> -Н); 4,707 бр. с. (2Н, 5'-ОН, 4'-Н)

Примітка. д — дублет; с — синглет; дд — дублет дублетів; м — нерозділений мультиплет; уш. с. — уширений синглет.

трансформованого вуглеводного залишку з даними для 2',3'-заміщених 2',3'-дидезоксинуклеозидів піримідинів та їхніх азааналогів демонструє їх відповідність [7, 11—14].

У результаті отримано поглиблені дані щодо процесу деоксигенування 6-АС та механізму незалежних і узгоджених реакцій в умовах перегрупування квазіфосфонієвих солей за Арбузовим.

Практичним наслідком цієї роботи вбачається створення методів синтезу рибоепоксидів, які є зручними синтонами для введення різноманітних замісників у 3'-(транс)-положення вуглеводного фрагмента, та дидезоксизаміщених похідних 6-азануклеозидів — перспективних біологічно активних препаратів.

V. G. Kostina, I. V. Alexeeva, L. I. Palchikovskaya

Synthesis of novel 2',3'-dideoxy-6-azacytidine derivatives — potential retroviral reproduction inhibitors

Summary

This paper deals with the synthesis of the novel 2',3'-dihalo-2',3'-dideoxy- and 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-analogues of 6-azacytidine as potential antiviral substances. The compounds were prepared by means of the appropriate reagents — triphenylphosphonium halogen salts. The first step of the 6-azacytidine conversion results in 2',3'-epoxynucleosides as against deoxygenation of uridine and thymidine, when O<sub>2</sub>, 2'-cyclonucleosides are generated.

V. G. Kostina, I. V. Alexeeva, L. I. Palchikovskaya

Синтез нових 2',3'-дидезоксиформів 6-азацитидина — потенціальних інгібиторів репродукції ретровірусів

Резюме

Проведено деоксигенування 5-бензоіл-6-азацитидина з участю галогенсодержащих фосфонієвих реагентів. Отримано 2',3'-рибозепоксид, 2',3'-дигалоген-2',3'-дидезокси- і 2',3'-дидегідр-2',3'-дидезоксиформів 6-азацитидина. Таким чином дає можливість в залежності від умов реакції ідентифікувати незалежні механізми утворення різних дезоксиформів 6-азацитидина — потенціальних протівірусних і імунomodulatory препаратів.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Краевский А. А. Молекулярные основы поиска препаратов лечения СПИДа. Достижения и вероятные перспективы // Молекуляр. биология.—1999.—33, № 3.—С. 343—352.
2. De Clercq E. Antiviral activity spectrum of nucleoside and nucleotide analogues // Nucleosides and Nucleotides.—1991.—10, N 2.—Р. 176—180.
3. De Clercq E. HIV inhibitors targeted at the reverse transcriptase // AIDS Res. Hum. Retroviruses.—1992.—8, N 2.—Р. 119—134.
4. Mizuno Y., Itoh T., Nomura A. Azanucleosides and deazanucleosides of biological interest // Heterocycles.—1982.—17.—Р. 615—644.
5. Шаламай А. С. Йодування вуглеводного фрагмента піримідинових нуклеозидів як перспективний метод одержання протівірусних препаратів // Біополімери і клітина.—1998.—14, № 4.—С. 371—380.

6. *Moffatt J. J.* Chemical transformation of the sugar moiety of nucleosides.—New York, 1979.—127 p.
7. *Костина В. Г., Шаламай А. С., Усенко Л. С.* Синтез 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиуридина с участием трифенилфосфониевых йодидов // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 4.—С. 100—106.
8. *Костина В. Г., Шаламай А. С., Усенко Л. С.* Изучение механизмов йодирования 5'-О-замещенных пиримидин-нуклеозидов в условиях реакции Арбузова // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 3.—С. 246—251.
9. *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика.—М.: Мир, 1976.—541 с.
10. *Beranek J., Sorm F.* Synthesis of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-6-azaisocytosine // Collect. Czech. Chem. Commun.—1968.—33, N 4.—P. 913—923.
11. *Tai-Shun Lin, Jing-Hua Yang, You-Song Gao.* Synthesis of 2',3'-unsaturated and 2',3'-dideoxy analogs of 6-azapyrimidine nucleosides as potential anti-HIV agents // Nucleosides and Nucleotides.—1990.—9, N 1.—P. 97—108.
12. *Robins M. I., Fouron I., Mengel R.* Nucleic acid related compounds. Adenosine 2',3'-ribo-epoxide. Synthesis, intramolecular degradation, and transformation into 3'-substituted xylofuranosyl nucleosides and its lyxo-epoxide // J. Org. Chem.—1974.—39, N 11.—P. 1564—1570.
13. *Mitchell W. L., Ravenscroft P., Hill M. L., Knutsen L. J. S., Newton R. F., Scopes D. I. C.* Synthesis and antiviral activity of 5-Halovinyl-6-aza-2'-deoxyuridines // Nucleosides and Nucleotides.—1985.—4, N 1, 2.—P. 173—175.
14. *Wieczorkowski J., Sorm F., Beranek J.* Nucleic acid components and their analogues. Synthesis of 1-(2',3'-epoxy- $\beta$ -D-lyxofuranosyl)-6-azaisocytosine // Collect. Czech. Chem. Commun.—1968.—33, N 4.—P. 924—930.

УДК 547.963.32:577.113.4  
Надійшла до редакції 19.12.2000