

Глікозидні аналоги 6-азацитидину: синтез і протиаденовірусна активність

І. В. Алексєєва, Л. Г. Пальчиковська, Л. М. Носач, Л. С. Усенко,
В. Л. Жовновата, **Н. С. Дяченко**

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна
E-mail: L.Palchykovska@imbg.org.ua

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

За спрощеним варіантом «силільної конденсації» синтезовано низку N1-глікопіранозидних і N1-глікофуранозидних аналогів 6-азацитидину (6-АС) та досліджено їхню протиаденовірусну активність у порівнянні з базовою молекулою 6-АС. Показано, що до антиаденовірусної дії 6-АС причетне збереження D-рибофуранозного фрагмента. Заміна рибофуранози на рибопіранозу або на інший цукор (D-ксилозу, D-глюкозу, L-арабінозу) призводить до втрати аналогом біологічної активності, характерної для базової сполуки.

Вступ. Синтетичні азапіримідинові (тріазинові) нуклеозиди і нуклеотиди, як було встановлено, здатні впливати на біосинтез і біотрансформацію нуклеїнових кислот, виконуючи важливу функцію у регуляції біохімічних процесів [1–3]. Досягнутий останнім часом успіх у хіміотерапії вірусних інфекцій пов'язаний, безперечно, з дослідженнями противірусної дії аномальних нуклеозидів. На основі аналогів природних нуклеозидів створено і впроваджено в медичну практику понад 20 лікарських засобів, які використовують при лікуванні, насамперед, хворих, інфікованих вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) та вірусами родини герпесу [4].

6-Азацитидину (6-АС) притаманний широкий спектр біологічної активності, а саме — протипухлинна, противірусна, протимікоплазмозна та імуномодельова дія [5–9]. Поглиблений конформаційний аналіз молекули 6-АС методом *ab initio* виявив міцний внутрішньомолекулярний водневий зв'язок O5'Н...O2, що, на нашу думку, є одним із чинників, які обумовлюють біологічну поведінку цього аномального нуклеозиду [10]. Попередні дослідження протиаденовірусної активності низки

N1-глікозидних аналогів 6-АС показали перевагу рибонуклеозиду перед його дезоксіаналогами і свідчать про те, що головну роль в активності цього ряду сполук відіграє саме 5'ОН група [11]. Для подальшого дослідження взаємозв'язків між структурою і функціональною активністю аналогів 6-АС вперше синтезовано і проаналізовано на протиаденовірусну дію нові глікозиди 6-азацитозину, що містять залишки інших цукрів, серед яких ізомери D- та L-рибози і D-глюкоза.

Матеріали і методи. В роботі використано органічні розчинники та силілувальні реагенти — триметилхлорсилан (ТМХС) і гексаметилдисилазан (ГМДС) вітчизняного виробництва, D/+/-вуглеводи — рибоза, ксилоза, глюкоза — фірми «Adler-shof» (Німеччина) та L-арабіноза («Реахим», Росія), тетрачлорид олова («Janssen», Бельгія), силікагель G-60 для препаративної хроматографії та платівки для хроматографії у тонкому шарі (ТШХ) фірми «Merck» (Німеччина). 5-Метилмеркапто-1,2,4-тріазин-3(2H)-он синтезовано за методом [11]. 1,2,3,5-Тетра-О-ацетил-рибофуранозу, 1,2,3,4-тетра-О-ацетильні похідні ксилопіранози і арабінопіранози отримано за розробленими методиками [12]. 1,2-Діацетил-3,5-добензоїлксилофуранозу синтезовано, як описано у роботі [13].

© І. В. АЛЕКСЄЄВА, Л. Г. ПАЛЬЧИКОВСЬКА, Л. М. НОСАЧ,
Л. С. УСЕНКО, В. Л. ЖОВНОВАТА, **Н. С. ДЯЧЕНКО**, 2004

Спектри ^1H ЯМР розчинів N1-глікозидів у DMSO- d_6 («Fluka», Німеччина) реєстрували на спектрометрі VXR-300 («Varian», США) з використанням внутрішнього стандарту — тетраметилсилану. УФ спектри поглинання водних розчинів нуклеозидів записували на спектрофотометрі «Spectrum M40» («Zeiss Jena», Німеччина).

Одержання N1- α -L- і N1- β -D-глікопіранозидів 6-азацитозину (загальна методика). До суспензії триазинової основи (3,0 ммоль) у 25 мл ацетонітрилу додавали 3,3 ммоль перацильованого цукру, 24 ммоль (0,52 мл) ГМДС, 4,8 ммоль (0,6 мл) ТМХС та 4,8 ммоль (0,6 мл) тетраклориду олова. Реакційну суміш перемішували в атмосфері аргону при кімнатній температурі протягом 4–10 год. Контроль за перебігом реакції здійснювали методом ТШХ у системі хлороформ:метанол (95:0,5). Осад видаляли, а фільтрат випаровували на роторі до маслоподібного залишку. Останній розчиняли в 100 мл хлороформу і послідовно промивали водою, насиченим розчином ацетату натрію і знову водою. Органічний шар сушили безводним сульфатом натрію, концентрували і наносили на хроматографічну колонку для виділення нуклеозидного продукту. Ацильований N-глікозид розчиняли в 10 мл спирту, до розчину додавали 40 мл NH_4OH і витримували при кімнатній температурі упродовж 16–18 год. Продукт виділяли і очищували кристалізацією із спирту.

N1- β -D-ксилофуранозид 6-азацитозину (IVa). Ацильований ксилофуранозид триазинової основи одержували аналогічно вищенаведеному способу при тому ж співвідношенні реагентів. Після очищення за допомогою препаративної (колоночної) хроматографії на силікагелі продукт реакції обробляли 25 %-м водним розчином аміаку (16 год, 20 °C) і виділяли дибензоатне похідне нуклеозиду. Бензоїльні групи деблокували метилатом натрію. Цільовий ксилофуранозид (IVa) кристалізували з водного спирту.

Визначення протиаденовірусної активності глікозидних аналогів 6-АС. Використано еталонний штам аденовірусу людини типу 5 та перевивні епітеліальні лінії клітин Her-2 і HeLa. Протиаденовірусну активність синтезованих речовин визначали за пригніченням кількості інфікованих клітин у досліді (інфіковані клітини, оброблені речовинами) порівняно з контролем (необроблені інфіковані клітини) і виражали у відсотках. Інфіковані клітини візуалізували за наявністю в ядрах характерних ДНК-вмісних включень, які виявляли методом люмінесцентної мікроскопії клітин, флюорохромовааних акридиновим оранжевим, як описано в [7]. Мінімальною інгібуючою концентрацією (МІК)

вважали ту, за якої речовина зменшувала кількість інфікованих аденовірусом клітин на 50 %.

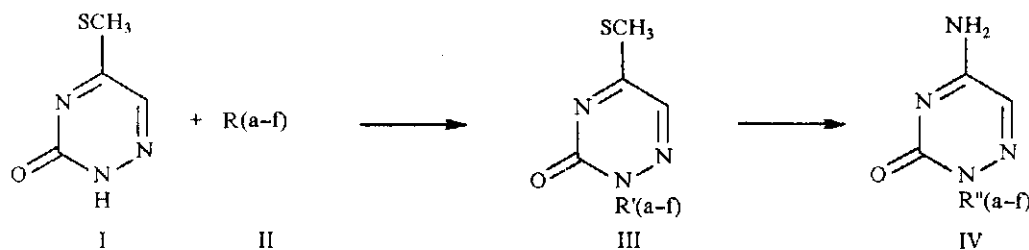
Результати і обговорення. Раніше у дослідженнях серії дезоксирибозидних 6-азацитозину доведено необхідність наявності 5'ОН групи для збереження антиаденовірусної активності цих сполук. Елімінація усіх гідроксильних груп у фурановому циклі цукрового фрагмента молекули нуклеозиду призводить до втрати антиаденовірусної активності [11]. Характер структурних варіацій вуглеводної частини нуклеозиду у представленій роботі стосувався кількості та розташування гідроксильних груп у використаних енантіомерних формах пентоз і гексоз, у тому числі і ОН групи в положеннях 5' або 6'. Сукупність цих ознак, як відомо, формує просторовий стан молекули в цілому. Виходячи з цього завдання дослідження полягало у синтезі низки глікопіранозидних і глікофуранозидних аналогів 6-АС і їхнього біотестування у системі аденовірус—клітина.

Для одержання глікозидних аналогів 6-АС застосовано спрощений варіант «силільної конденсації» [11, 14], який дозволяє отримувати ацильовані триазинові нуклеозиди з передбаченою структурою. За цим методом у реакцію вводять «вільну», неактивовану основу (у нашій роботі — 5-метилмеркаптотриазин) та найширше коло відповідно захищених цукрів як у фуранозній, так і піранозній формах. Раніше нами показано [15], що можливості цього так званого «одностадійного» синтетичного підходу, який поєднує обидва процеси — силілування триазинової основи та глікозилування, — досить широкі.

Синтез здійснювали в абсолютному ацетонітрилі за присутності силілувальних агентів та надлишку каталізатора відносно основи. Використано перацильовані похідні трьох D-цукрів (D-рибоза, D-ксилоза і D-глюкоза) з однаковою просторовою конфігурацією C2-замісника і одного представника L-цукрів (L-арабіноза) із зворотною C2-ацилоксифункцією (схема).

Перетворення під впливом каталізатора ацильованих D-цукрів у активовану форму, тобто в 1,2-ацилоксонієвий катіон з тотожною циклічною просторовою структурою, мало забезпечити формування відповідних глікозидів з β -D-конфігурацією (за SN2 механізмом глікозилування [16]). І, навпаки, перетворення похідного α -L-арабінози в циклічний ацилоксонієвий іон, що стерично блокує атаку силільної основи з протилежного, ніж у похідних D-цукрів, положення, сприяє отриманню сполук з α -конфігурацією глікозидного зв'язку.

Ацетильовані глікозидні похідні метилмеркаптотриазину переводили у цільові продукти оброб-



де R(a-f) – ацильовані цукри, R'(a-f) – ацильований цукровий залишок, R''(a-f) – деацильований цукровий залишок

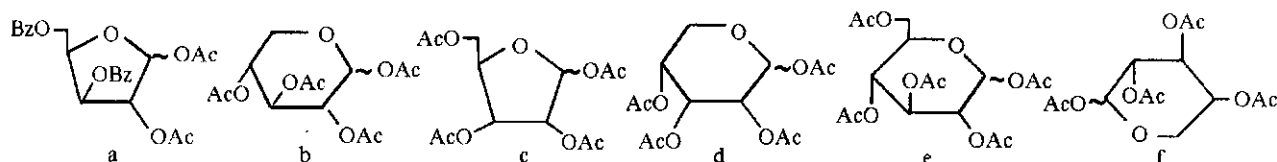


Схема синтезу N1-глікозидів 6-азацитозину

Таблиця 1
Фізико-хімічні характеристики N1-глікозидів 6-азацитозину

Сполука	Найменування	Вихід, %	Ттопл, °С	УФС, λ_{max} , нм (ϵ)	Спектр ^1H ЯМР, δ , м. ч. (J, Гц)	
					NH_2	CH_1' (J1'-2')
IVa	β -D-ксилофуранозид 6-азацитозину	74	235–236	262 (8000)	8,046; 7,925	5,710 д (9,0)
IVb	β -D-ксилопіранозид 6-азацитозину	82	262–265	260 (7800)	7,975; 7,869	5,418 д (9,0)
IVc	β -D-рибофуранозид 6-азацитозину	76	222–225	264 (7200)	8,010; 7,906	6,001 д (3,9)
IVd	β -D-рибопіранозид 6-азацитозину	58	240–242	263,5 (6900)	7,843; 7,717	5,689 д (9,2)
IVe	β -D-глюкопіранозид 6-азацитозину	57	250–253	260 (7150)	7,948; 7,849	5,471 д (9,5)
IVf	α -L-арабінопіранозид 6-азацитозину	61	240–242	264 (7700)	7,881; 7,759	5,916 д (5,6)
V	6-азацитидин, тетраацетат*	96	148–150	265 (11600)	11,600	6,216 д (3,2)

Примітка. *Дані представлено згідно з [20].

кою водним розчином аміаку. При цьому одночасно відбувалося амінування основи та деацетилювання захисних груп цукрів. Бензоїльний захист (сполука IIIa) деблокували розчином метилату натрію у метанолі. Синтезовані сполуки кристалізували із суміші води та етанолу. Отримано безбарвні, з високою температурою топлення речовини, добре розчинні у воді та нижчих спиртах.

Виходи нуклеозидів у розрахунку на триазинову основу були меншими, ніж для 6-АС, синтезованого за тих же умов, і складали 56–62 %. Фізико-хімічні характеристики N1-глікозидних аналогів 6-АС подано в табл. 1.

Регіо- та стереоспецифічність реакції глікозильовання встановлювали за допомогою даних ЯМР і УФ спектроскопії. Відсутність у аналогів 6-АС в спектрах ЯМР сигналу протона N-H триазинового

кільця в області слабого поля (11–12 м. ч.) підтверджує N1-положення цукрового залишку у синтезованих сполук. У той же час для досліджуваних глікозидів спостерігається значна варіабельність положення сигналів аномерного ($\text{C1}'\text{H}$) протона. Зауважимо при цьому, що $\text{H1}'$ -протон 6-АС найбільш дезекранований відносно аномерних протонів інших сполук (значення хімізсуву дорівнює 6,0 м. ч., табл. 1). Останнє може бути спричинене, на наш погляд, втягненням його у внутрішньомолекулярний зв'язок, а саме — з групою $\text{C2}=\text{O}$ або N6 атомом аглікону. Така інтерпретація свідчить на користь попередніх квантово-хімічних характеристик 6-АС в ізольованому стані, де було виявлено міцний внутрішньомолекулярний $\text{H1}'\text{-N6}$ зв'язок з енергією $-4,4$ ккал/моль [17]. Утворення подібного водневого зв'язку можна припустити і

Таблиця 2

Вплив N1-глікозидних аналогів 6-азацитидину (6-АС) на репродукцію аденовірусу людини типу 5 у культурі клітин

Концентрація, мг/мл	Пригнічення кількості інфікованих клітин N-глікозидами, %							Тетраацетил 6- АС	6-dAC*
	IVa	IVb	IVc	IVd	IVe	IVf			
125	0	0	100	0	15	44	Нд	100	
16	0	0	100	0	0	15	Нд	99	
8	0	0	100	0	0	5	100	41	
0,5	0	0	61	0	0	0	100	2	

Примітка. *6-Аза-2'-дезоксцитидин. Нд — не досліджували.

для сполуки IVf з близьким значенням сигналу C1'-H протона (5,9 м. ч.). Константа спин-спінової взаємодії ($J_{1,2}$ — другий інформативний у структурному плані параметр) аномального протона з протоном C2' атома знаходиться у вузькому діапазоні значень (9,0—9,5 Гц) для низки D-глікопіранозидів (сполуки IVb, d, e), а також ксилофуранозиду IVa. Це обумовлено *транс*-діаксіальним розміщенням протонів H1' та H2' і відповідає β -конфігурації глікозидного центра цих сполук [18, 19]. Для α -L-арабінопіранозиду (IVf) константа $J_{1,2}$ за своїм значенням відповідає аксіально-екваторіальному розташуванню зазначеної протонної пари [18, 19].

За даними УФ спектрів (наявність у аналогів типових для 6-АС зсувів максимуму поглинання при зміні рН середовища), підтверджено позиційну ідентичність цукрового фрагмента у всіх синтезованих за наведеною вище схемою сполук.

Результати проведених противірусних досліджень наведено в табл. 2. Вони свідчать про те, що N1-глікозидні аналоги 6-АС, які замість рибіофуранози мають інші цукри, а саме — ксилозу (у фуранозній та піранозній формах), рибіопіранозу і глюкопіранозу, неактивні стосовно аденовірусу типу 5 навіть у концентраціях, що перевищують МІК 6-АС у десятки разів.

Незначну активність проявляє L-арабінопіранозид 6-азацитозину, який зменшує кількість інфікованих клітин менш ніж на 50 % лише у максимальній нетоксичній концентрації — 125 мкг/мл, у той час як МІК 6-АС складала 0,5 мкг/мл [11]. Слід зауважити, що депо-форма 6-АС, його тетраацетильне похідне, зберігала активність базової молекули. МІК тетраацетил-6-азацитидину становила 0,125 мкг/мл, тобто була у чотири рази меншою порівняно з 6-АС.

Таким чином, дослідження антиаденовірусної активності глікозидних аналогів 6-АС засвідчують, що в антиаденовірусній дії 6-азацитидину має зна-

чення збереження у вуглеводному фрагменті його молекули залишку D-рибофуранози. Заміна його на рибіопіранозу або на інший цукор — D-ксілозу, L-арабінозу, D-глюкозу призводить до втрати вивченої нами біологічної активності 6-АС.

Слід зазначити, що піранозний цикл досить гнучкий і для нього спостерігається значно більше, ніж для фуранозного, можливих конформаційних переходів. Для стереоізомерних сполук IV(b, d, f) з піранозною формою цукру сітка Н-зв'язків, що стабілізують конформацію нуклеозидів з *суп*-орієнтацією, можливо, дещо послаблена. Саме відсутність C5'ОН групи позбавляє молекулу аналога найміцнішого внутрішньомолекулярного водневого зв'язку з карбонілом у положенні 2 аглікону. На нашу думку, Н-зв'язки — N6...C1'-H, C2'H...O2 та C1'H...O2 стабілізують конформацію, дещо відмінну від *суп*-конформації 6-АС. В разі ксилофуранозиду IVa, незважаючи на присутність C5'-ОН групи, *транс*-діаксіальне розміщення відинальних C2'- та C3'-гідроксилів якимось чином змінює систему Н-зв'язків у молекулі і, як наслідок, спричинює втрату ксилофуранозидом антиаденовірусної активності.

Висновки. Вперше за спрощеним методом «силільної конденсації» синтезовано нові глікозидні аналоги 6-АС. На модельній системі аденовірус—клітина проведено дослідження антивірусної дії отриманих сполук у порівнянні з 6-АС. Дані тестування показали значне послаблення антиаденовірусної активності в ряду 6-АС-тетраацетат > 6-АС > 6-dAC > арабінопіранозид-6-азацитозин > глюкопіранозид-6-азацитозину.

У рибіопіранозиду, ксилопіранозиду, ксилофуранозиду 6-азацитозину антиаденовірусна дія відсутня. На нашу думку, послаблення або відсутність антиаденовірусної активності у глікозидних аналогів 6-азацитидину викликано значною відмінністю їхньої просторової структури, а також конформацією, яка реалізується у біологічній системі.

I. V. Alexeeva, L. I. Palchikovskaya, L. N. Nosach, L. S. Usenko, V. L. Zhovnovataya, N. S. Dyachenko

The glycosilic analogues of 6-aza-cytidine: synthesis and antiviral activity

Summary

A number of N1-glycopyranosyl and N1-glycofuranosyl 6-azacytidine analogues were synthesized by one-step «silylic condensation» method. Antiadenovirus activity of these compounds in comparison with parent 6-azacytidine was studied. Preserving D-ribofuranosylic fragment in the analog molecule has been shown necessary for this biological activity. Commutation of this sugar moiety into D-xylose, D-glucose, L-arabinose or even commutation of D-ribofuranosylic fragment into ribopyrano ring in 6-azacytidine molecule leads to the loss in antiadenovirus activity.

И. В. Алексеева, Л. И. Пальчиковская, Л. Н. Носач, Л. С. Усенко, В. Л. Жовновата, Н. С. Дяченко

Гликозидные аналоги 6-азацитидина: синтез и антиадееновирусная активность

Резюме

Упрощенным методом «силильной конденсации» синтезирован ряд N1-гликопиранозидных и N1-гликофуранозидных аналогов 6-азацитидина (6-АС) и изучена их антиадееновирусная активность в сравнении с ключевым соединением — 6-азацитидином. Показано, что для проявления аналогом антиадееновирусного действия необходимо сохранение D-рибофуранозного фрагмента молекулы. Замена его другим моносахаридом (D-ксилозой, D-глюкозой, L-арабинозой) или даже замена фуранозной формы на пиранозную в D-рибоном фрагменте 6-АС приводит к потере антиадееновирусной активности.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Roy-Burman P. Mechanism of action of pyrimidine analogs // Analogues of nucleic acid components.—Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1970.—P. 42—49.
- Преображенская М. Н., Мельник С. Я. Аналоги компонентов нуклеиновых кислот — ингибиторы нуклеинового обмена // Итоги науки и техники.—М.: ВИНТИ, 1984.—С. 59—70 (Биоорг. химия; Т. 1).
- Mizuno Y., Itoh T., Nomura A. Azanucleosides and deazanucleosides of biological interest // Heterocycles.—1982.—17.—P. 615—644.
- Boucher Ch. A. B., Galasso G. A. Practical guidelines in antiviral therapy.—Amsterdam: Elsevier, 2002.—344 p.
- Alexeeva I., Dyachenko N., Nosach L., Zhovnovataya V., Rybalko S., Lozitskaya R., Fedchuk A., Lozitsky V., Gridina T., Shalamay A., Palchikovskaya L. 6-Azacytidine-compound with wide spectrum of antiviral activity // Nucleosides, Nucleotides and Nucl. Acids.—2001.—20, N 4—7.—P. 1147—1152.
- Петруша Н. А. Некоторые токсико-фармакологические свойства 6-азацитидина // Фармакология и токсикология.—1987.—№ 2.—С. 75—76.
- Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Шаламай А. С., Алексеева И. В., Кушко Л. Я., Озвинчук И. И., Жовновата В. Л., Бутенко С. И., Петровская И. А., Дранник Г. Н. Антиадееновирусное и иммуностимулирующее действие 6-азацитидина // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 1.—С. 75—85.
- Скрипаль И. Г., Бабичев В. В., Безуглий С. В., Егоров О. В., Коробкова Е. С., Малиновская Л. П., Панченко Л. П., Токовенко И. П., Шаламай А. С., Алексеева И. В. Ингибиторное действие 6-азацитидина на молликуты и его предполагаемый механизм // Микробиол. журн.—1993.—55, № 2.—С. 99—104.
- Абдуллаева М. В., Фролов А. Ф., Алексеева И. В., Пальчиковская Л. И., Федорова Н. Е. Ингибирующее действие 6-азацитидина на цитомегаловирусную инфекцию человека в клеточной системе // Биополимеры и клетка.—2004.—20, № 4.—С. 337—342.
- Платонов М. О., Говорун Д. М., Алексеева И. В., Судак О. О., Бойко Ю. В., Пальчиковська Л. Г. Неемпіричний квантово-хімічний конформаційний аналіз 6-азацитидину — модифікованого нуклеозиду широкого спектра біологічної дії // Доп. НАН України.—2004.—№ 3.—С. 163—169.
- Alexeeva I., Palchikovskaya L., Shalamay A., Nosach L., Zhovnovataya V., Povniitsa O., Dyachenko N. 4-Amino-acid derivatives of 6-azacytidine: Structure-activity relationship // Acta Biochim. Pol.—2000.—47, N 1.—P. 95—101.
- Методы исследования углеводов / Под ред. А. Я. Хорлина.—М.: «Мир», 1975.—445 с.
- Gosselin G., Imbach J.-L. Nucleosides de synthese XXII: obtention, comme synthons oligoxylo-nucleotidiques, de D-xylofuranosyl adenines specifiquement substitués // J. Heterocyclic Chem.—1982.—19.—P. 597—602.
- Пат. України № 32901. Спосіб одержання 2-β-D-рибофуранозиду 5-аміно-1,2,4-триазин-3(2H)-ону (6-азацитидину) / І. В. Алексеева, Л. Г. Пальчиковська // Бюл. № 1.—2003.
- Пальчиковская Л. И., Алексеева И. В., Шаламай А. С. Тетрагидрофуранильные производные 6-замещенных 3,5-диоксо- и 3,5-тиоксо-1,2,4-триазинов — структурные аналоги азапиримидиновых нуклеозидов // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 6.—С. 82—86.
- Niedballa U., Vorbruggen H. A general synthesis of N-glycosides. VI. On mechanism of the stannic chloride catalyzed silyl Hilbert-Johnson reaction // J. Org. Chem.—1976.—41.—P. 2084—2088.
- Мишук Я. Р., Самійленко С. П., Алексеева І. В., Пальчиковська Л. Г., Потягайло А. Л., Шаламай А. С., Говорун Д. М. Структура 6-азацитидину. Визначальна роль внутрішньомолекулярних водневих зв'язків: Тез. доповідей II з'їзду УБФТ.—Харків, 1998.—С. 53.
- Imbach J.-L. The determination of anomeric configuration of D-ribofuranosyl nucleosides by PMR spectroscopy // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1975.—255.—P. 177—183.
- Zemlicka J., Horwitz P. Factors influencing the H6 chemical shift in pyrimidine nucleosides // J. Amer. Chem. Soc.—1975.—97, N 14.—P. 4089—4095.
- Чернецький В. П., Алексеева И. В. Аномальные нуклеозиды. VII. Синтез 6-азацитидина и его производных // Химия гетероцикл. соединений.—1967.—№ 6.—С. 1109—1113.

УДК 547.963.32:615.28
Надійшла до редакції 27.12.03