

## 5-Амінозаміщені триазинові нуклеозиди та їхні фуранідильні аналоги: синтез і первинний скринінг на клітинних моделях пухлин

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

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

E-mail: L.Palchykovska@imbg.org.ua

---

*Спрощеним методом силільної конденсації вперше синтезовано нову серію 5-амінопохідних триазинових нуклеозидів та їхніх фуранідильних аналогів. Первинний скринінг цих сполук у концентрації  $10^{-4}$  М на клітинних моделях пухлин виявив цитостатичний ефект лише для епоксипохідного 6-азацитидину (6-АС). Модифікація нуклеозиду по екзоаміногрупі аглікону чи заміна його цукрового залишку на тетрагідрофуранове кільце призводять до несподіваного підвищення мітотичної активності у клітинах тестових систем. Виникнення біологічної дії нового типу автори пояснюють взаємодією 5-амінозаміщених триазинових нуклеозидів та їхніх аналогів з клітинними мішенями, відмінними від таких для 6-АС.*

---

*Ключові слова: 6-азацитидин, триазинові нуклеозиди, синтез, структура, мітотична активність.*

---

Вступ. Робота продовжує започатковане раніше вивчення взаємозв'язку між структурою та активністю у серії триазинових нуклеозидів та їхніх фуранідильних аналогів з модифікацією амінофункції гетероциклічної основи різними ефекторними групами.

6-Азацитидин (6-АС) є базовою молекулою для представників зазначеного класу речовин. Проведено численні дослідження противірусної дії 6-АС та його модифікованих похідних відносно аденовірусів людини, родини герпесвірусів (HSV, VEB, CMV), грипу та ін. [1–5]. Показано, що зміни структури як глікозидного фрагмента, так і структури триазинового аглікону ведуть до зниження противірусної активності відповідних похідних порівняно з 6-АС [2, 6].

Не менш інтенсивно вивчалися протипухлинні властивості власне 6-АС [7–11]. Встановлено сут-

тєве пригнічення розвитку злоякісних пухлин і різних штамів лейкозів, особливо у сполученні 6-АС з низкою клінічних препаратів [9]. Депоформи та деякі модифікації 6-АС по аглікону досліджували значно менше: виявлено, що їхня дія не перевищувала рівень протипухлинного впливу 6-АС [7, 8].

Підвищений інтерес до С5-амінозаміщених триазинових нуклеозидів та їхніх фуранідильних аналогів нині зумовлений не лише потребами створення нових біологічно активних речовин чи наміром удосконалити традиційні методи нуклеозидного синтезу [12], але й бажанням з'ясувати, як структурні зміни базової молекули відбиваються на її біологічній активності.

Матеріали і методи. У роботі використано комерційні реагенти і розчинники марки «хч» вітчизняного виробництва.

Перебіг реакцій і чистоту отриманих речовин контролювали методом тонкошарової хроматографії

(ТШХ) на пластинках фірми «Merck» (Німеччина) у системі розчинників хлороформ:метанол у співвідношенні 9:1 і 14:1. Препаративну хроматографію цільових продуктів виконували на колонках, заповнених силікагелем G-60 фірми «Merck» у системах розчинників хлороформ:метанол (9:1) та ізопропанол:толуол:аміак (3:2:1). Спектри УФ-поглинання та  $^1\text{H}$  ЯМР синтезованих сполук реєстрували на приладах «Specord M-40» (Німеччина) і «VXR-300 Varian» (США).

Первинний скринінг синтезованих сполук здійснено у Національному інституті раку, США (National Cancer Institute, USA) в рамках Програми розробки нових терапевтичних засобів для лікування раку. Протестовано 12 сполук у концентрації  $10^{-4}$  М на трьох клітинних лініях пухлин: Lung (NCI-H460), Breast (MCF7), CNS (SF-268).

Синтез нової серії 5-N-заміщених нуклеозидів триазинового ряду проводили за спрощеною схемою [11, 13], а заміщення 5-метилмеркаптогрупи триазинової основи відповідним аміном — за методикою [2].

При конденсації триазинових основ з 1-ацетокситетрагідрофураном притримувалися співвідношення реагентів, яке рекомендоване у роботі [13].

*Загальна методика синтезу рибозидів 5-N-моно- та 5-N-дизаміщених 1,2,4-триазин-3(2H)-ону.* Суспензію 3 ммоль ацильованого рибофуранозиду 5-метилмеркапто-1,2,4-триазин-5(4H)-ону, отриманого за методом [6], у 8 мл етанолу перемішували при температурі 25 °С (в разі алкіламінів) або кип'ятили (у випадку ариламінів) протягом декількох годин з надлишком відповідного аміну до завершення реакції заміщення. Реакційну суміш випаровували у вакуумі до маслоподібного залишку та позбавлялися від надлишку аміну. Ацильований нуклеозид витримували близько 16 год у водному розчині аміаку (10 мл) при температурі 18 °С. Кінцевий продукт виділяли і кристалізували з водного спирту. Фізико-хімічні характеристики синтезованих нуклеозидів подано у табл. 1.

*Синтез аномерних N-2-тетрагідрофуранільних похідних 5-N-моно- та 5-N-дизаміщених 1,2,4-триазин-3(2H)-ону.* До суспензії відповідного амінотриазину (10 ммоль) у 60 мл ацетонітрилу додавали силілувальні реагенти — гексаметилдисилазан (8 ммоль) і триметилхлорсилан (8 ммоль) та каталізатор  $\text{SnCl}_4$  (7,5 ммоль). Реакційну суміш перемішували до повного розчинення компонентів, охолоджували до 5 °С і за відсутності вологи

порціями вводили розчин ацетокситетрагідрофурану (15 ммоль) у 10 мл ацетонітрилу. Перемішування продовжували близько 4 год (контроль ТШХ) за кімнатної температури. Після стандартної обробки реакційної суміші індивідуальний цільовий продукт виділяли методом препаративної хроматографії або кристалізацією. Характеристики фуранідильних похідних наведено у табл. 1.

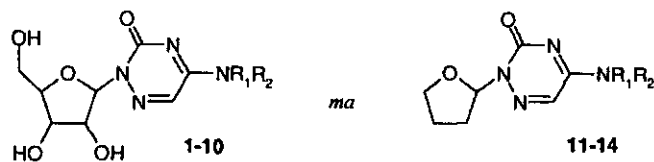
**Результати і обговорення.** *Хімічний синтез.* При плануванні синтезу 5-N-заміщених 6-азануклеозидів та їхніх фуранідильних аналогів було вирішено скористатися спрощеним варіантом силільної конденсації як одним із найраціональніших.

Схема синтезу нуклеозидів дещо відрізняється від такої для їхніх фуранідильних аналогів. Враховуючи значну лабільність псевдоглікозидного зв'язку в останніх [11, 13], ми відмовилися від «комбінаторного підходу», який дозволяє отримати серію аналогів на основі базової сполуки, і вводили до реакції конденсації з ацетатом тетрагідрофурану триазинову основу з відповідним C5-амінозамісником. Технологічні ускладнення процесу силільної конденсації, що виникали внаслідок зменшення реакційної здатності 5-амінотриазинів порівняно з 5-метилмеркаптотриазиним, призвели лише до помірному виходу цільових продуктів. Це спонукало нас до подальшої розробки і отримання деяких фуранідильних аналогів (13, 14) у контрольованих умовах амінування за схемою синтезу нуклеозидних аналогів, яка виявилася раціональнішою і ефективною. У табл. 1 представлено фізико-хімічні характеристики нових (отриманих за наведеною схемою) і синтезованих нами раніше нуклеозидів [14].

Будову отриманих сполук підтверджено спектральними методами. Хімічні зсуви у  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах нуклеозидів та мультиплетність сигналів протонів збігаються з очікуваними. Для сполук другої серії — фуранідильних похідних триазину — у спектрі ЯМР спостерігаються деякі характерні особливості: сигнал більш дезекранованого аномерного протона реєструється у вигляді двох дублетів внаслідок розщеплення  $\text{H}1'$  на протонах  $\text{H}2'$  та  $\text{H}2''$  з різними константами. Хімічні зсуви протонів аміногрупи сполук обох серій практично збігаються, що свідчить про несуттєвість впливу фуранового кільця і рибозного фрагмента на заміщену аміногрупу. Проте для групи дизаміщених амінопохідних (сполуки 2, 3, 8 і 11) величина сигналу протонів при атомі C6 (8,0 м. ч.) засвідчує, що

Таблиця 1

Деякі фізико-хімічні параметри синтезованих нами триазинових нуклеозидів і їхніх фуранідильних аналогів



№ Сполуки	NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	Вихід, %	Т <sub>топл.</sub> , °С	УФ-спектр (H <sub>2</sub> O), λ <sub>max</sub> , нм	<sup>1</sup> H ЯМР, δ, м. ч., (J, Гц)		
					N5H	C6H	C'Н
1	NHCH <sub>3</sub>	73	219—221	202,0 272,3	8,512д	7,498с	5,978д (3,6)
2		58	148—150	219,0 293,1	—	8,071с	5,953д (3,2)
3		56	123—125	224,7 293,9	—	8,070	5,939д (4,0)
4		62	134—136	28,5	8,873д	7,503с	5,949д (4,0)
5		47	257—258	212,3 304,0	7,968д	7,792с	5,998д (3,6)
6		53	140—145	212,4 288,5	9,682ус	7,753с	5,956д (3,6)
7		49	Аморфна	209,7 267,3	8,945д	7,537с	5,954д (3,6)
8		64	Аморфна	215,0 285,9	—	8,074с	5,945д (3,2)
9		67	228—230	233,0 311,3	10,275с	7,702с	6,002д (3,6)
10	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	70	240—242	200,0 267,5	8,363т	7,546с	5,936д (3,6)
11		43	150—152	213,0 291,0	—	7,988с	6,321дд (6,4; 4,0)
12		45	260—262	287,7	8,857д	7,502с	6,320дд
13		37	257—261	212,1 288,0	—	—	—
14	NH <sub>2</sub>	60	221—223	268,0	7,904с 7,804с	7,428с	6,301дд (5,2; 4,8)

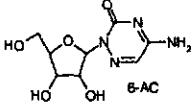
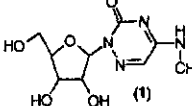
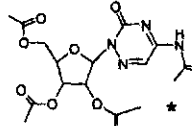
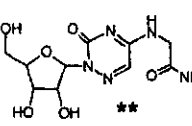
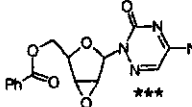
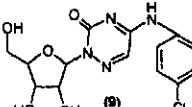
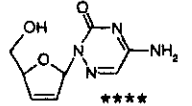
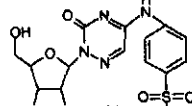
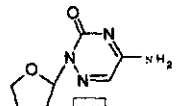
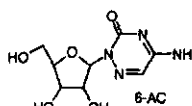
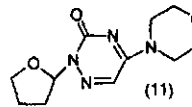
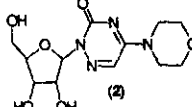
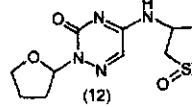
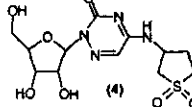
вони мають досить жорсткий біциклічний аплікон; згаданий сигнал знаходиться у більш слабкому полі, ніж у інших нуклеозидів, що є характерним для жорстких молекулярних структур [15].

*Біологічне дослідження.* 6-АС, як відомо [1—10], є ефективним інгібітором вірусної інфекції і

має значну протипухлинну дію. Аналіз даних щодо біологічної активності заміщених по екзоциклічній аміногрупі похідних 6-АС та аналогічно заміщених його фуранідильних аналогів, отриманих при дослідженні їхньої протипухлинної активності, дозволив виявити цікаву закономірність.

Таблиця 2

Мітотична активність 6-АС та його аналогів (рівень активності подано у % відносно контролю) на трьох лініях ракових клітин

Молекулярна структура	MCF7	NCI-H460	SF-268	Молекулярна структура	MCF7	NCI-H460	SF-268
 6-АС	<50	—	—	 (1)	65	75	79
 *	97	116	96	 **	79	74	86
 ***	75	31	96	 (9)	102	92	98
 ****	111	100	96	 (6)	125	110	93
 (14)	147	121	100	 6-АС	< 50	—	—
 (11)	127	121	101	 (2)	134	129	102
 (12)	120	127	113	 (4)	124	125	102

Примітка. У дужках зазначено порядковий номер сполук, які наведено в табл. 1; структури взято з робіт \*[7], \*\*[2], \*\*\*, \*\*\*\*[16].

Як видно з даних табл. 2, наявність будь-якого (алкіл, арил, ацил) замісника в екзоциклічній аміногрупі аглікону спричиняє суттєве зниження пригнічувальної активності порівняно з 6-АС. У N-заміщених нуклеозидів інгібіторні властивості зменшуються практично до нуля, як у *para*-хлорфенільного похідного 6-АС (9). Натомість для морфолінового (2) і особливо сульфоланового (4) похідних 6-АС з'являється значний стимулювальний ефект. Подібний вплив виявлено раніше у деяких алкіламінозаміщених 6-АС щодо росту калусної тканини рослин [17].

Втрачаючи інгібіторні властивості, як це відбувається в разі втрати противірусної дії глікозидними аналогами 6-АС [6], фуранідильне похідне 6-азацитозину (14) набуває значної мітотичної активності. Стосовно його заміщених похідних (11—13), то введення ефекторних груп у незначній мірі впливає на рівень стимулювальної активності сполуки 14.

Якщо порівнювати глікозидні та фуранідильні аналоги з однаковими замісниками, то чітко видно, що представникам обох груп притаманна близька за рівнем стимулювальна активність.

Треба також підкреслити, що різні за своєю хімічною природою перетворення — введення ефекторної групи в екзоциклічну аміногрупу рибонуклеозиду чи безпосередня заміна цукрового залишку на насичене фуранове кільце — викликають одну й ту саму біологічну відповідь, а саме: стимуляцію мітотичної активності.

Слід звернути увагу також і на залежність ступеня активності від роду і виду клітинних тест-систем, тобто на селективність їхньої дії.

Спіраючись на дані проведеного тестування та їхній аналіз нами зроблено припущення про те, що зміна архітектури молекули 6-АС шляхом використаних нами модифікацій індукує у досліджуваних сполук спорідненість до клітинних мішеней, які впливають на регуляцію мітотичної активності.

**Висновки.** Запропоновані нами модифікації двох ключових структурних елементів молекули 6-АС — глікозидного фрагмента та екзоциклічної аміногрупи призводять до втрати інгібіторної дії та появи значної мітотичної активності у дослідях з модельними лініями клітин. Це можна пояснити спорідненістю досліджуваних сполук до клітинних мішеней, відмінних від таких для 6-АС. Виявлений біологічний ефект, особливо фуранидильного аналога 6-АС, слід перевірити на інших клітинних об'єктах з огляду на його можливе застосування у біотехнологічних процесах.

Автори щиро вдячні С. М. Ярмолюку за сприяння в проведенні біологічних досліджень у Національному інституті раку (США) в рамках Програми розробки нових терапевтичних засобів для лікування раку.

*I. V. Alexeeva, L. G. Palchikov's'ka, L. S. Usenko, V. G. Kostina*

5-Aminosubstituted triazine nucleosides and their furanidylic analogues: synthesis and primary screening on tumor cell models

#### Summary

*A number of new N-substituted triazine nucleosides and their furanidyl analogues were synthesized using a simplified silyl condensation method. The primary screening of these compounds at  $10^{-4}$  M concentration on human tumor cell models revealed a cytostatic effect only for the epoxy derivative of 6-azacytidine. It was shown that nucleoside modification at aglycone exocyclic amino group or sugar residue substitution with tetrahydrofuran ring led to unexpected stimulation of the mitotic activity of the cells tested. The observed new type of biological action can be explained by the interaction of 5-aminosubstituted nucleosides and their furanidyl analogues with cellular targets other than those for 6-azacytidine.*

*Key words: 6-azacytidine, the triazine nucleosides, synthesis, structure, mitotic activity.*

*И. В. Алексеева, Л. И. Пальчиковская, Л. С. Усенко, В. Г. Костина*

5-Аминозамещенные триазиновые нуклеозиды и их фуранидильные аналоги: синтез и первичный скрининг на клеточных моделях опухолей

#### Резюме

*Упрощенным методом силильной конденсации синтезирована новая серия 5-аминозамещенных триазиновых нуклеозидов и их фуранидильных аналогов. Первичный скрининг этих соединений в концентрации  $10^{-4}$  М на клеточных моделях опухолей выявил цитостатический эффект только у эпоксипроизводного 6-азацитидина (6-АС). Показано, что модификация нуклеозида по экзоаминогруппе агликона или же замена его сахарного остатка на тетрагидрофурановое кольцо приводят к неожиданному повышению митотической активности клеток тестовых систем. Появление биологического действия нового типа авторы объясняют взаимодействием 5-аминозамещенных триазиновых нуклеозидов и их фуранидильных аналогов с клеточными мишенями, отличными от таковых для 6-АС.*

*Ключевые слова: 6-азацитидин, триазиновые нуклеозиды, синтез, структура, митотическая активность.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Alexeeva I., Palchikovskaya L., Shalamay A., Nosach L., Zhovnovataya V., Povnitsa O., Dyachenko N. N4-Amino-acid derivatives of 6-azacytidine: Structure-activity relationship // *Acta Biochim. Pol.*—2000.—47, N 1.—P. 95—101.
3. 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.
4. Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Шаламай А. С., Алексеева И. В., Кушко Л. Я., Озвинчук И. И., Жовноватая В. Л., Бутенко С. И., Петровская И. А., Дранник Г. Н. Антиаденовирусное и иммуностимулирующее действие 6-азацитидина // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 1.—С. 75—85.
5. Фролов А. Ф., Радолицкая Л. С., Чернецкий В. П. Действие аномальных нуклеозидов на экспериментальную гриппозную инфекцию белых мышей // *Вирусы и вирус. заболевания: Респ. сб.—Киев, 1986.—Вып. 14.—С. 3—6.*
6. Алексеева І. В., Пальчиковська Л. Г., Усенко Л. С., Носач Л. М., Жовновата В. Л., Дяченко Н. С. Глікозидні аналоги 6-азацитидину: синтез і протиаденовірусна активність // *Биополимеры и клетка.*—2004.—20, № 5.—С. 435—439.
7. Система создания противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. Н. Н. Блохина, Ч. Г. Зуброда.—М.: Медицина, 1977.—352 с.
8. Beranek J. A study on structure-activity relationships of nucleoside analogues // *Drugs Exp. Clin. Res.*—1986.—12, N 4.—P. 355—366.
9. Петруша Н. А., Алексеева И. В., Чернецкий В. П. Усиление противоопухолевого эффекта 6-меркаптопурина аза-

- пиримидиннуклеозидами // Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей.—Черноголовка: Изд-во ред.-изд. отдела ИХФ АН СССР, 1980.—Т. 1.—С. 82—84.
10. *Петруша Н. А.* Некоторые токсико-фармакологические свойства 6-азацитидина // Фармакология и токсикология.—1987.—№ 2.—С. 75—76.
  11. *Алексеева И. В., Пальчиковская Л. Г., Шаламай А. С., Огняник С. С., Моргарт Н. В., Петруша Н. А.* Синтез и биологическая активность N<sup>1</sup>-замещенных 6-азацитозинон // Хим.-фарм. журн.—1994.—№ 4.—С. 16—18.
  12. *Nucleic acid chemistry: improved and synthetic procedures, methods and techniques / Eds L. B. Townsend, R. S. Tipson.*—New York: Wiley & Sons, 1986.—P. 3.—337 p.
  13. *Пальчиковська Л. Г., Алексеева І. В., Шаламай А. С.* Тетрагідрофуранільні похідні 6-заміщених 3,5-діоксо- і 3,5-тіоксо-1,2,4-триазинів — структурні аналоги азапіримідинових нуклеозидів // Біополімери і клітка.—1996.—12, № 6.—С. 82—86.
  14. *Чернецкий В. П., Семенов Д. В., Бурлий Н. Г.* N4-алкиларилпроизводные 6-азацитидина // Укр. хим. журн.—1975.—41, № 5.—С. 512—516.
  15. *Воловенко Ю. М., Дубинина Г. Г.* Синтез конденсированных пирроло[b] пиазинов // Химия гетероцикл. соединений.—1999.—№ 9.—С. 1234—1238.
  16. *Костіна В. Г., Алексеева І. В., Пальчиковська Л. Г.* Синтез нових 2,3-дидезоксипохідних 6-азацитидину — потенційних інгібіторів репродукції ретровірусів // Біополімери і клітка.—2001.—17, № 6.—С. 573—578.
  17. *Левенко Б. А., Семенов Д. В., Кунах В. А., Алпатова Л. К., Чернецкий В. П.* Изучение влияния производных азацитидина на рост изолированных тканей растений // Эксперим. генетика растений.—Киев: Наук. думка, 1982.—С. 65—74.

УДК 547.874 + 615.277  
Надійшла до редакції 09.06.04